



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS
ORGÁNICOS DE LA PLANTA *Xylosma flexuosa*
PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD HERBICIDA: *LUPENOL*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
CRISTINA LEÓN VÁZQUEZ



MÉXICO D. F.

2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	Prof. Blas Lotina Hennsen
Vocal	Prof. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Prof. José Fausto Cruz
1 ^{er} Suplente	Prof. Vanessa Rebeca Maya Ampudia
2 ^o Suplente	Prof. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Sitio de realización de la tesis:

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

Asesor:

Dr. Blas Lotina Hennsen

Supervisor Técnico:

M. en C. Beatriz King Díaz

Sustentante:

Cristina León Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de formarme como profesionista, como universitario y como humano.

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

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

Al Dr. Blas Lotina Hennsen por todo el apoyo, tanto humano como académico y su valiosa asesoría durante la realización de este trabajo de tesis, y sin la cual no habría sido posible completarla.

A la M. C. Beatriz King Díaz, por todo el conocimiento aportado, por sus consejos, por su alegría y entusiasmo con el que trabaja y transmite, y sobre todo por hacer del laboratorio un lugar de trabajo muy placentero, respetuoso y amigable.

Al programa PAPIIT IN205806-3 por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al personal académico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM: M. en C. Georgina Duarte Lisci, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, Q.F.B. Marisela Gutiérrez y Q. Alejandrina Acosta, por el registro de los espectros para el análisis espectroscópicos y espectrométricos.

A la M. en C. Imelda Velázquez Montes por las facilidades otorgadas en la realización de la revisión bibliográfica.

DEDICATORIAS

A ti forjador de grandes hombres y mujeres, ejemplo de enseñanza, disciplina, lealtad, honradez, tenacidad y amor: Celso[†].

A mi papá Albino, gracias por no dejarme claudicar, ser un ejemplo a seguir y por tus valores inculcados, a ti mamá, que entre tantas profesiones y oficios que ejerces siempre tuviste tiempo para ayudarme. A ustedes que han estado en los momentos más importantes de mi vida, en los más hermosos y los más difíciles, con todo mi amor y agradecimiento por el apoyo incondicional les dedico esta tesis.

A mis hermanas Martha, Laura y Marcela por su comprensión, cariño y ayuda en cualquier sentido, a lo largo de mi vida.

A mis nenas Isaldy y Zara que son la luz y el camino en mi vida, mi motivación, mi ilusión y mi alegría.

A mis profesores y familia en general, que de alguna manera han contribuido a la realización de esta meta, a todos los anteriores les dedico mi esfuerzo y alegría en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas	IV
Lista de figuras	V
Lista de espectros	VI
Lista de abreviaturas	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Familia Flacourtiaceae	4
2.2. Género <i>Xylosma</i>	4
2.3. Características de la especie <i>Xylosma flexuosa</i>	4
2.3.1. Clasificación botánica	5
2.3.2. Nombres comunes de <i>Xylosma flexuosa</i>	5
2.3.3. Nombre botánico	5
2.3.4. Sinónimos	6
2.3.5. Descripción	6
2.3.6. Distribución geográfica	7
2.4. Fotosíntesis	8
2.4.1. Fotosistema II	9
2.4.2. Fotosistema I	10
2.4.3. El complejo citocromo b ₆ /f	10
2.4.4. Acoplamiento del flujo de electrones a la síntesis de ATP	12
2.5. Maleza	12
2.6. Herbicidas	13
2.7. Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis	13

CONTENIDO

	Página
2.8. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	13
2.9. Germinación	15
2.9.1. Medición de la germinación	15
2.10. Características generales de lupenol	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo principal	17
3.1.2. Objetivos particulares	17
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	18
4.1. Material vegetal	18
4.2. Preparación de los extractos	18
4.3. Fraccionamiento y análisis cromatográfico	18
4.4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de tallos <i>Xylosma flexuosa</i>	19
4.5. Aislamiento del Lup-20(29)-en-3β-ol	22
4.6. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los metabolitos obtenidos	22
4.7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto CHCl ₃ de tallos de <i>Xylosma flexuosa</i>	23
4.8. Aislamiento de los cloroplastos	25
4.9. Cuantificación de la clorofila	25
4.10. Medición de la síntesis de ATP	26
4.11. Medición de la velocidad del transporte de electrones	27
4.12. Medición de la Mg ²⁺ -ATPasa	27
4.12.1. Activación de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa	28
4.12.2. Hidrólisis de ATP y cuantificación de fosfatos	28

	Página
4.13. Ensayos in vivo de <i>Lolium multiflorum</i> (pasto) y <i>Trifolium alexandrinum</i> (trébol) y <i>Echinochloa crusgalli</i> (capín)	29
4.14. Medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII	29
4.15. Determinación de la biomasa seca	30
4.16. Germinación in Vitro de <i>Lolium multiflorum</i> (pasto) y <i>Trifolium alexandrinum</i> (trébol) y <i>Echinochloa crusgalli</i> (capín)	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Efecto de los extractos orgánicos en la germinación de <i>Lolium multiflorum</i> (pasto) <i>Trifolium alexandrinum</i> (trébol) y <i>Echinochloa crusgalli</i> (capín)	32
5.2. Medición de la fluorescencia de la clorofila a en trébol pasto y capín	34
5.3. Biomasa de los extractos orgánicos activos de <i>X. flexuosa</i>	38
5.4. Determinación del extracto orgánico más activo como inhibidor de la síntesis de ATP	40
5.5. Caracterización del Lup-20(29)-en-3 β -ol	40
5.6. Efecto inhibitorio del lupenol sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca	43
5.7. Efecto del lupenol en el transporte de electrones en la fotosíntesis	43
5.8. Efecto del lupenol en la actividad ATPasa	45
5.9. Análisis cromatográfico del extracto CHCl ₃ de tallos de <i>Xylosma flexuosa</i>	46
6. CONCLUSIONES	49

CONTENIDO

	Página
7. BIBLIOGRAFÍA	50
8. APÉNDICE	54
8.1. Medios	54
8.2. Espectros	58

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Fracciones de la columna cromatográfica abierta del extracto hexánico de tallos	21
Tabla 2. Efecto de las fracciones elegidas sobre la Síntesis de ATP	22
Tabla 3. Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta del extracto clorofórmico de tallos de <i>Xylosma flexuosa</i>	24
Tabla 4. Efecto de las fracciones elegidas sobre la Síntesis de ATP	25
Tabla 5. Biomasa seca de <i>Trifolium alexandrinum</i> (trébol) a diferentes concentraciones después de 15 días de tratamiento	39
Tabla 6. Valores de I ₅₀ de los extractos orgánicos de tallos y hojas en la síntesis de ATP	40
Tabla 7. Análisis espectroscópico de la fracción 4	42
Tabla 8. Efecto del Lup-20(29)-en-3β-ol sobre los CF ₁ aislados de cloroplastos y activados con luz (Mg ²⁺ ATPasa) y calor (Ca ²⁺)	46
Tabla 9. Análisis espectroscópico de la fracción 7 del extracto CHCl ₃ de tallos de <i>X. flexuosa</i>	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Xylosma flexuosa</i>	2
Figura 2. Distribución de <i>Xylosma flexuosa</i> en la República Mexicana	7
Figura 3. Esquema del cloroplasto. Micrografía electrónica (a) y diagrama esquemático (b) de un cloroplasto de maíz	11
Figura 4. Representación esquemática de la membrana tilacoidal	14
Figura 5. Actividad de los extractos hexánico, CHCl ₃ y MeOH de tallos de <i>Xylosma flexuosa</i> en la germinación y crecimiento de las plántulas de <i>Lolium multiflorum</i>	33
Figura 6. Actividad de los extractos hexánico, CHCl ₃ y MeOH de <i>Xylosma flexuosa</i> (tallos) en la germinación y crecimiento de las plántulas de <i>Echinochloa crusgalli</i>	34
Figura 7. Gráfica de radar mostrando el efecto de 50 DCMU μ M en las hojas de trébol	36
Figura 8. Gráfica de radar mostrando el efecto de DCMU a 50 μ M en las hojas de capín	38
Figura 9. Plantas de <i>Trifolium alexandrinum</i> después de 15 días de ser asperjadas con el extracto CHCl ₃ de tallos de <i>X. flexuosa</i> a 50 y 100 ppm	39
Figura 10. Estructura de Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupenol)	43
Figura 11. Efecto de lupenol en la síntesis de ATP de cloroplastos aislados de hojas de espinaca	44
Figura 12. Efecto de lupenol en el transporte de electrones medido de agua a MV en cloroplastos aislados de hojas de espinaca	45
Figura 13. Cromatograma de gases de la fracción 7	66

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectro de IR de lupenol	58
Espectro 2. Espectro de RMN ¹ H del lupenol	59
Espectro 3. Espectro RMN ¹³ C del lupenol	60
Espectro 4. Espectro de masas del lupenol	61
Espectro 5. Espectro de HSQC del lupenol	62
Espectro 6. Espectro de COSY	63
Espectro 7. Espectro de IR de la mezcla de de la fracción 7	64
Espectro 8. Espectro de RMN ¹ H de la fracción 7	65
Espectro 9. Espectros de masas de los componentes de la fracción	66

LISTA DE ABREVIATURAS

A_0	Aceptor de electrones primario del Fotosistema I
A_0^-	Aceptor de electrones primario del Fotosistema I reducido
A_1	Filoquinona
ABS/RC	Tamaño efectivo de la antena en el centro de reacción
AcOEt	Acetato de etilo
ADP	Adenosina bifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CF_0	Parte lipofílica del complejo CF_1CF_0 -ATPasa
CF_1	Parte hidrofílica del complejo CF_1CF_0 -ATPasa
CG-EM	Cromatografía de gases - espectrometría de masas
Chl	Clorofila
$CHCl_3$	Cloroformo
CH_3OH	Metanol
COSY	Espectroscopía de correlación
Cit b_6/f	Complejo Citocromo b_6/f
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DCMU	3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6-Dicloro fenol-indofenol
Dlo/RC	Disipación efectiva de la energía como calor en un centro de reacción activo
DMSO	Dimetilsulfóxido
dV/dt_0	Valor que indica el funcionamiento de la enzima que fotoliza el agua

ABREVIATURAS

ETo/RC	Transporte de electrones en el centro de reacción activo
eV	Electrón Volt
FAD	Flavin adenina dinucleótido
Fd	Ferredoxina
F ₀	Fluorescencia inicial
FM	Fórmula molecular
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HEPES	(N-[hidroxietil]piperazina-N'-[ácido etanosulfóxido])
Hex-AcOEt	Mezclas de hexano - acetato de etilo
HMBC	Correlación heteronuclear de múltiples ligaduras
HSQC	Espectroscopia de correlación carbono-hidrógeno
Hz	Hertz
IR	Espectroscopia infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KCl	Cloruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
Kn	Constantes de excitación vía no fotoquímica
KOH	Hidróxido de potasio
Kp	Constantes de excitación vía fotoquímica
<i>m</i>	Multiplete
M ⁺	Ion molecular
MES	(Ácido sulfónico 2-[morfolino]etano)
mg	Miligramos
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Cloruro de Magnesio Hexahidratado
MHz	Mega Hertz
mM	Mili molar
ms	Mili segundos
MV	1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridinium dicloro "Metil viologeno"
<i>m/z</i>	Relación masa-carga

ABREVIATURAS

N	Número de recambio de Q_A , indica cuántas veces Q_A es reducido desde el $t = 0$ hasta $t = F_{max}$
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
NADP ⁺	Nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidado
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
nm	Nanómetros
NOESY	Espectroscopía incrementada del efecto nuclearoverhauser
PC	Plastocianina
p.f.	Punto de fusión
PHI(Eo)	Indica la probabilidad de que un fotón atrapado por el centro de reacción transporte un electrón más allá de Q_A
PHI(Po)	Probabilidad de que un fotón absorbido por las clorofilas sea atrapado por el centro de reacción el PSII
Pi	Fosfato inorgánico
PI(abs)	Performance index, eficiencia fotosintética
ppm	Partes por millón
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PSIo	Indica la probabilidad de que un exciton atrapado por el centro de reacción transporte un electrón mas allá de Q_A
p/v	Relación peso-volumen
P ₆₈₀	Centro de reacción del PSII
P ₇₀₀	Centro de reacción del PSI
Q_A	Aceptor primario de electrones del Fotosistema II
Q_A^-	Aceptor primario de electrones reducido del Fotosistema II
Q_B	Aceptor secundario de electrones de Fotosistema II
Q_B^-	Aceptor secundario de electrones reducido de Fotosistema II

ABREVIATURAS

Q _B H ₂	Plastohidroquinona
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
S	Singulete
Sa	Singulete ancho
SiMo	Silicomolibdato de sodio
Sum K	Suma de K _p + K _n
TCA	Ácido tricloroacético
TMS	Tetrametilsilano
Tricina	N-[2-Hidroxi-1,1-bis (hidroximetil)etil]glicina
TRo/RC	Máxima velocidad de excitón atrapado por el centro de reacción
Umas	Unidades de masa atómica
UV	Luz ultravioleta
V _J	Fluorescencia variable relativa al tiempo 2 ms
V _{máx}	Frecuencia Máxima
v/v	Relación volumen-volumen
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micro mol

RESUMEN

En el presente trabajo, se investigó la planta *Xylosma flexuosa* (Kuntch) Hemsl colectada en el estado de Guerrero, como fuente de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. Este proyecto se inició con la obtención de los extractos orgánicos (hexano, CHCl₃ y MeOH) de las partes aéreas de la planta. Se ensayó el efecto de los extractos orgánicos *in vitro*, en la germinación de semillas de las plantas *Lolium multiflorum* (pasto), *Trifolium alexandrinum* (trébol) y *Echinochloa crusgalli* (capín); así como en la síntesis de ATP, en cloroplastos aislados de hojas de espinaca. *In vivo*, se ensayaron los extractos al asperjarse en plantas crecidas en el invernadero, de *L. multiflorum*, *T. alexandrinum* y *E. crusgalli*. Los extractos que resultaron activos como inhibidores de alguna de las actividades medidas (extractos hexánico y CHCl₃ de tallos), se fraccionaron por cromatografía por método biodirigido, hasta obtener el compuesto o los compuestos puro/s activo/s, lo que culminó con la caracterización química y bioquímica del triterpenoide Lup-20(29)-en-3β-ol (lupenol) (Figura 10), aislado del extracto hexánico, siendo la primera vez que este compuesto se encuentra en esta especie, además de una mezcla de ácidos grasos aislados del extracto clorofórmico. El lupenol inhibe la fotofosforilación en cloroplastos de espinaca y se comporta como inhibidor de la transducción de energía al inhibir la actividad ATPasa y no inhibir el transporte de electrones en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado).

1. INTRODUCCIÓN

La extraordinaria biodiversidad de plantas que existe en México, representa indudablemente, uno de los recursos naturales más importantes del mundo, la cual es necesaria conocer y estudiar para su conservación y aprovechamiento racional. El porcentaje de especies estudiadas desde los puntos de vista químico y biológico, es relativamente bajo y sin embargo, en los últimos años, la investigación científica de los recursos naturales en México, se ha caracterizado, por un avance notable y sostenido en el estudio químico de muchas especies, en especial de plantas que son usadas en las prácticas medicas populares, tan sólo un reducido número de compuestos aislados de estas plantas e identificados químicamente, han sido evaluados para determinar sus propiedades biológicas. (Bye *et al.*, 1995, Mata *et al.*, 1996).

De lo anterior se desprende, que el potencial que ofrecen las plantas de México como una fuente de nuevos principios activos, incluyendo aquellos con propiedades herbicidas, aún no se ha explorado adecuadamente. (Rojas *et al.*, 2002).

Dentro de este contexto, es importante el incremento de programas de investigación multidisciplinarios dirigidos a la exploración del potencial herbicida de especies selectas de la biodiversidad de México y de productos derivados de las mismas, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad.

Es importante subrayar, que la búsqueda de herbicidas naturales se encuentra plenamente justificada, y aunque la mayoría de los pesticidas actuales son altamente eficaces para combatir las diferentes plagas que afectan a los cultivos de importancia económica, muchos de ellos producen daños irreversibles al ecosistema debido al alto grado de contaminación que ocasionan en los suelos al acumularse, lixiviarse, contaminar el agua o volatilizándose, además de que inducen la resistencia en malezas (Justum *et al.*, 1997).

Aunado a lo antes mencionado, el crecimiento demográfico genera necesidades alimentarias que plantea problemas básicos de aumento en la producción agrícola, y para ello pueden seguirse dos rutas: por expansión del área de tierra cultivada o mediante el aumento en la productividad del cultivo.

Debido a que las tierras fértiles de cultivo están disminuyendo por la expansión del área urbana, se sugiere que la estrategia para aumentar la producción de alimentos es la búsqueda del incremento de la productividad agrícola (Lotina *et al.*, 1989).

El presente estudio está dirigido hacia la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios naturales con actividad herbicida, los cuales pretenden ser una alternativa para la producción de herbicidas que puedan suplantar a los que ya existen en el mercado, con el objeto de disminuir la contaminación ambiental. Para ello, por un fraccionamiento biodirigido se analizó la planta *Xylosma flexuosa* para obtener los constituyentes químicos responsables de la actividad herbicida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Flacourtiaceae

La familia Flacourtiaceae está constituida aproximadamente por 85 géneros y 800 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo.

Varios representantes de esta familia se reconocen como de valor medicinal, alimenticio u ornamental y algunas especies, tienen un alto contenido de taninos. (Calderón *et al.*, 1996).

2.2. Género *Xylosma*

Xylosma agrupa alrededor de un centenar de especies, 49 de ellas se encuentran en Latinoamérica, principalmente en Centro y Sudamérica. El estudio del género se ha dificultado por las grandes variaciones morfológicas que presentan las especies, como resultado de su adaptación a las condiciones ecológicas de los lugares en donde crecen (Morales *et al.*, 2002). La separación de las especies es difícil, pues los caracteres de las flores no son muy constantes, al mismo tiempo, las hojas y otras estructuras vegetativas tampoco ayudan, ya que entre individuos de la misma especie, pero de diferente sexo, muestran variaciones notables (Gutiérrez, 1986).

2.3. Características de la especie *Xylosma flexuosa*

Usos: el tallo se utiliza como aditivo en la elaboración del pulque.

Manejo: La especie no tiene un manejo específico en el bosque.

Recolecta: El aprovechamiento de la especie es generalmente doméstico.

Comercialización: La planta es de autoconsumo y ocasionalmente se vende en mercados locales (Figura 1) (Calderón *et al.*, 1996).

2.3.1. Clasificación botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Violales

Familia: Flacourtiaceae

Género: *Xylosma*

Especie: *Xylosma flexuosa*

2.3.2. Nombres comunes de *Xylosma flexuosa*

- Granadillo, Granjeno, Tejocotillo (Michoacán)
- Acahual, Manzanillo (Veracruz)
- Hichichiltemel (San Luis Potosí)
- Abrojo (Distrito Federal)
- Coronilla (Oaxaca)
- Palo de brujo Tuxtla Gutiérrez (Chiapas)
- Yisimbolón Sureste de San Cristóbal (Chiapas)
- Capulín de corona (Tamaulipas)
- Espina de la corona, huiscarol, tsak k'iith, wi'chunun (lengua huasteca), Biscorón, Limoncillo, nombres registrados fuera de la zona del Bajío (Martínez, 1979).

2.3.3. Nombre botánico

Myroxylon flexuosum (H.B.K.) Kuntze (Martínez, 1969).

2.3.4. Sinónimos

Flacourtia flexuosa HBK., *Myroxylon flexuosum* (HBK.) Kuntze.

2.3.5. Descripción

Son árboles o arbustos de 2 a 7 m de altura, con tallos de color provistos de espinas y ramas flexuosas o rectas con espinas de 1 a 10 cm. de largo. Tiene hojas lustrosas en el haz; flores masculinas con 5 (7) sépalos, verdosos o amarillentos. Las flores femeninas tienen sépalos 5 (7), ovados de 2 a 2.5 mm de largo. Sus frutos son globosos, 5 a 6 mm de diámetro y semillas son ovoides (Figura 1). Forma parte del bosque tropical caducifolio, tropical subcaducifolio y mesófilo de montaña florece de noviembre a abril y fructifica de enero a julio (Morales *et al.*, 2002).



Figura 1. *Xylosma flexuosa*.

Trabajos previos han reportado el aislamiento, en el extracto metanólico de *Xylosma flexuosa*, los siguientes compuestos (rel)-2-([2,6-dibenzoyl]- β -glucopiranosiloxi)-5-hidroxi-benzoil-1*R*,2*R*,6*R*-trihydroxy-3-oxociclohex-4-enoate (xilomin), y tres glicósidos conocidos como salirespolido, poliotrisosido y 2'-benzoilpoliotrisosido (Gibbons *et al.*,1995).

2.3.6. Distribución geográfica

En la República Mexicana se encuentra en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Figura 2). Fuera de la República Mexicana, se le puede encontrar en gran parte en Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela y Curaçao (Morales *et al.*, 2002).

Actualmente, por su distribución y abundancia no se considera vulnerable a la extinción.



Figura 2. Distribución de *Xylosma flexuosa* en la República Mexicana (Calderón1996).

2.4. Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso fisicoquímico mediante el cual la energía de la luz solar es transformada en energía química, y es utilizada por los sistemas biológicos (Alberts *et al.*, 1989; Darnell *et al.*, 1990; Stryer, 1995; Barber, 1998). Como resultado de este proceso, las plantas, las algas y ciertos tipos de bacterias, liberan oxígeno molecular a la atmósfera y sintetizan carbohidratos a partir del dióxido de carbono que toman de la misma.

El proceso de la fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, los cuales son organelos que contienen una doble membrana una externa y otra interna, separadas por un espacio intermembranal. El sistema interior del cloroplasto se denomina estroma, dentro del cual se encuentran una serie de sacos apilados llamados tilacoides (Figura 3e). En los tilacoides se llevan a cabo las reacciones de transferencia de electrones, llamadas “reacciones luminosas”.

Durante esta fase se deposita energía solar en forma de ATP y de NADPH. La energía de la luz solar excita a un electrón en la clorofila *a*, promoviendo su transferencia a través de una cadena de reacciones de oxidación y reducción en la membrana tilacoidal.

Este proceso de transporte de electrones impulsa un flujo de protones a través de la membrana tilacoidal, generando un gradiente electroquímico que hace posible la síntesis de ATP. El ATP y NADPH son los productos finales de la fase luminosa y son empleados para reducir el CO₂ y sintetizar glucosa, almidón y sacarosa en las hojas de la planta (fase oscura), desde donde son transportadas a otros tejidos para ser utilizadas como una fuente de moléculas orgánicas y de energía para el crecimiento.

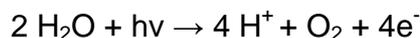
Las membranas tilacoidales de las plantas superiores, contienen dos fotosistemas diferentes, fotosistema I y el fotosistema II, cada uno de ellos con su propio centro de reacción, llamados P₇₀₀ y P₆₈₀, los cuales son activados con una longitud de onda de 700 nm para el fotosistema I y 680 nm para el fotosistema II.

El tercer complejo es el citocromo *b₆/f*, que sirve como interconexión entre ambos fotosistemas (Figura 4).

2.4.1. Fotosistema II

La absorción de un fotón de luz, de longitud de onda menor a 680 nm, por el fotosistema II, produce la excitación de una molécula de clorofila *a* de su centro de reacción. A partir de esta clorofila excitada, P_{680}^* , se produce la separación de un electrón transfiriéndolo a la feofitina (una clorofila sin Mg^{2+}), originándose la forma oxidada P_{680}^+ . Los electrones requeridos para regenerar P_{680} se obtienen a partir de la oxidación de dos moléculas de agua. Tan pronto como se extraen los electrones, la enzima libera O_2 , los electrones se transfieren desde el agua al cluster de manganesos, después a Z (un residuo de tirosina) hasta el centro de reacción P_{680}^+ .

Los cuatro protones liberados por la oxidación del agua permanecen en el lumen tilacoidal.



La feofitina que recibió el electrón del centro de reacción excitado, (P_{680}^*), a su vez lo cede al aceptor primario Q_A (quinona A), que actúa como acarreador de un electrón y generándose Q_A^- . Subsecuentemente el electrón es transferido a una segunda quinona, Q_B , generando así un radical aniónico semiquinona Q_B^- . Esta especie reducida parcialmente, permanece unida al sitio de unión en la enzima, hasta que recibe un segundo electrón de Q_A , cuando Q_B ha adquirido los dos electrones también toma dos protones del agua para obtener su forma completamente reducida, Q_BH_2 (quinol). Esta molécula se disocia de su proteína y se difunde a través del centro de reacción, los electrones de Q_BH_2 son transferidos a través de los acarreadores unidos a través de la membrana hasta $NADP^+$, reduciéndolo a $NADPH$ y liberando H^+ .

Estos protones, en conjunto con los liberados a partir del agua, generan el gradiente electroquímico que es utilizado para la síntesis de ATP. El herbicida DCMU (3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea), compite con Q_B por su sitio de unión en el FSII, así bloquea el transporte de electrones fotosintético.

Los electrones de Q_BH_2 pasan del citocromo b_6/f a la plastocianina (PC), una proteína que contiene cobre como cofactor redox, acarreadora de electrones, soluble y móvil. Los electrones son transferidos desde PC a un segundo fotosistema, el fotosistema I.

2.4.2. Fotosistema I

Los eventos fotoquímicos que siguen de la excitación del PSI son similares a aquellos del PSII (Figura 4). Primero, la luz es capturada por alguna de las aproximadamente 200 moléculas de clorofila *a* y *b*, o adicionalmente por los pigmentos accesorios que sirven como antena. El centro de reacción P_{700}^* pierde un electrón al donarlo al aceptor A_0 (una forma especial de clorofila, funcionalmente análoga a la feofitina del PSII), creando A_0^- y P_{700}^+ , de nuevo, a excitación da resultado en una separación de carga en el centro de reacción. P_{700}^+ es un oxidante fuerte el cual fácilmente adquiere un electrón de la PC.

Filoquinona A_1 acepta un electrón de A_0^- y lo pasa a una proteína hierro- azufre; de aquí, el electrón se mueve a la ferredoxina (Fd), otra proteína hierro-azufre unida a la membrana tilacoidal. La ferredoxina de espinacas contiene un centro 2Fe-2S. El átomo de Fe de la ferredoxina, transporta un electrón vía Fe^{2+} a Fe^{3+} .

El cuarto acarreador de electrones en el PSI es una flavoproteína llamada ferredoxina-NADP⁺ oxido reductasa, la cual transfiere su electrón al NADP⁺.

2.4.3. El complejo citocromo b_6/f

Como resultado de la excitación de P_{680} , los electrones almacenados en

Q_BH_2 son acarreados a P_{700} vía un ensamble de proteínas integrales conocido como complejo citocromo b_6/f y la plastocianina, una proteína soluble (Figura 4). El complejo citocromo b_6/f purificado contiene un citocromo tipo b con dos grupos hemo (citocromo b_{563}), una proteína hierro-azufre y un citocromo f , también llamado citocromo c_{552} el flujo de electrones proveniente de Q_BH_2 a través del complejo citocromo b_6/f hasta citocromo f no es conocido.

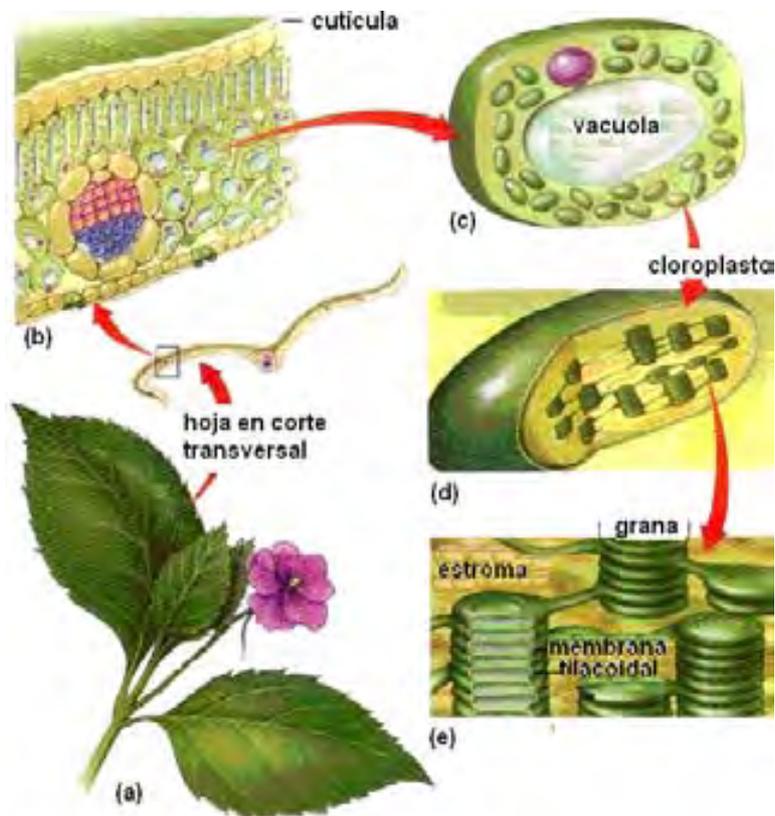


Figura 3. Esquema del cloroplasto. Micrografía electrónica (a) y diagrama esquemático (b) de un cloroplasto de maíz.

2.4.4. Acoplamiento del flujo de electrones a la síntesis de ATP

La ATP sintetasa, localizada principalmente en las regiones no apiladas de los cloroplastos y también llamada *complejo CF₀-CF₁*, su función principal conocida es la síntesis de ATP, al utilizar un gradiente de protones. El transporte de electrones da como resultado, un movimiento neto de protones a través de la membrana, del exterior al interior de la membrana tilacoidal, además de los cuatro protones liberados por la oxidación del agua que permanecen en el lumen tilacoidal (Figura 4), lo que genera un gradiente electroquímico y un gradiente de pH a través de la membrana. La unidad CF₀ que consta de cuatro tipos de subunidades, conduce los protones hacia fuera de la membrana tilacoidal, la unidad CF₁ cataliza la formación de ATP a partir de ADP y Pi. El CF₁ se encuentra en la superficie del estroma de la membrana tilacoidal, por lo cual el ATP sintetizado se libera en el espacio del estroma, al igual que el NADPH formado por el fotosistema I.

De esta manera, los productos de las reacciones luminosas de la fotosíntesis se ubican adecuadamente para las reacciones subsecuentes que tienen lugar en la oscuridad, en las que el CO₂ se transforma en carbohidratos. La fotofosforilación requiere membranas tilacoidales intactas, impermeables a protones. La fotofosforilación puede ser desacoplada del flujo de electrones promoviendo el pasaje de electrones a través de la membrana.

2.5. Maleza

La Sociedad Norteamericana de Ciencias de las Malezas (WSSA) define a las malezas como aquellas plantas que crecen donde no son deseadas. Las malezas se caracterizan por competir con los cultivos por agua, nutrientes y luz; además pueden ser hospederos de plagas y enfermedades, y reducen la calidad del producto cosechado e interfieren con las labores de cosecha (Kogan *et al.*, 2003).

2.6. Herbicidas

Los herbicidas son productos químicos que se utilizan para alterar la fisiología de la planta por un periodo de tiempo relativamente largo, afectando severamente su crecimiento u ocasionando su muerte.

Los plaguicidas son productos que se utilizan para controlar las plagas, y los herbicidas son plaguicidas que se utilizan para controlar las malezas. La mayoría de los herbicidas son compuestos orgánicos, además del carbono, la mayoría de los compuestos herbicidas contienen hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y en menor proporción algunos contienen cloro, fósforo, azufre y flúor (Kogan *et al.*, 2003).

2.7. Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso metabólico afectado por una gran variedad de herbicidas, la mayoría de ellos ejerce su efecto a través de la inhibición del transporte de electrones fotosintético en el lado reductor del fotosistema II, esto es inactivan o eliminan a alguno de los intermediarios del transporte de electrones en el lado reductor de este sistema. Otros inhiben la fotofosforilación o síntesis de ATP interaccionando a nivel de la enzima H^+ -ATPasa, o bien actúan como desacoplantes y aceptores de electrones (Moreland, 1980; Corbett, 1984). Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis son los más estudiados por su baja toxicidad en mamíferos (Lotina *et al.*, 1989).

2.8. Fluorescencia de la clorofila a

La energía luminosa es absorbida por moléculas de clorofila *a* y *b* para la fotosíntesis. Sin embargo, una porción de luz absorbida se pierde como calor o por reemisión como fluorescencia. Un fotón de luz roja contiene suficiente energía para excitar una molécula de clorofila *a* a su primer estado excitado, llamado singulete.

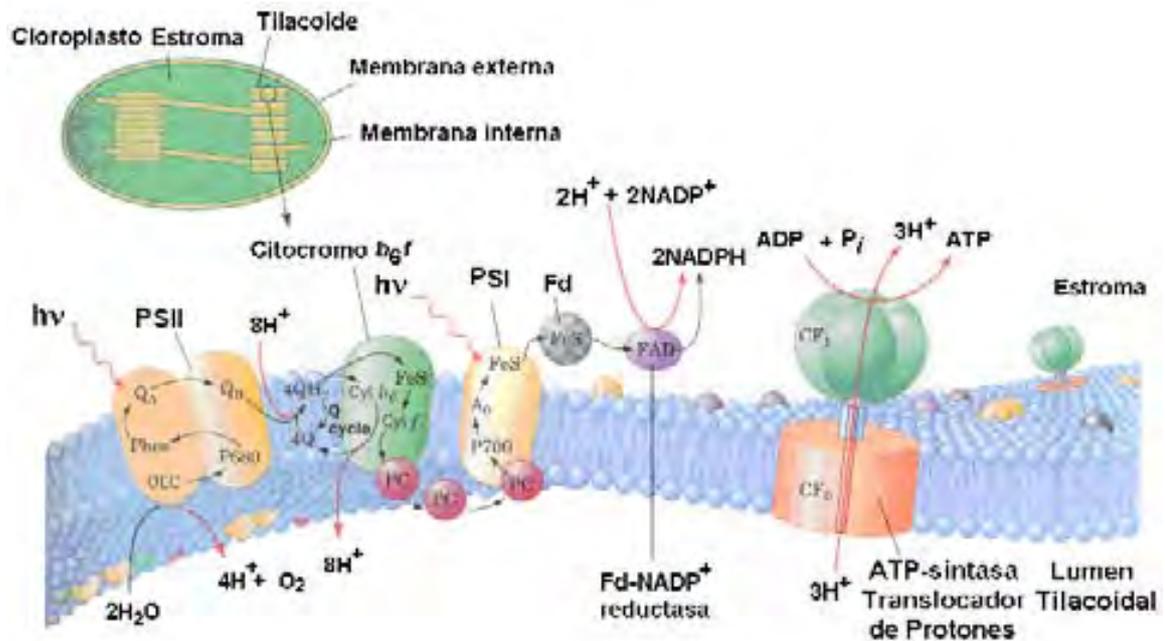


Figura 4. Representación esquemática de la membrana tilacoidal que muestra los componentes de su cadena de transporte electrónico. El sistema consta de tres complejos proteicos: el PS II, el complejo citocromo b_6/f y el PS I, que se encuentran conectados eléctricamente con acarreadores móviles mediante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

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

2.9. Germinación

La germinación empieza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y finaliza cuando empieza la elongación del eje embrionario, llamado radícula. Esto incluye numerosos eventos como: la hidratación de las proteínas, cambios a nivel estructural, en la respiración, la síntesis de macromoléculas y el crecimiento celular, ninguno de estos eventos constituye por sí la germinación. (Black y Bewley, 1994), pero sus efectos combinados transforman a un embrión deshidratado con un metabolismo lento y casi indetectable, en un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento. La germinación en su sentido estricto no incluye el crecimiento de la plántula, el cual comienza cuando la germinación termina. Los procesos que ocurren en la plántula naciente, tal como la movilización de las principales reservas de almacenamiento, no son parte de la germinación, son eventos postgerminatorios (Black y Bewley, 1994).

2.9.1. Medición de la germinación

Los medios por los cuales se puede determinar que la germinación ha progresado es la medición de la toma de agua y la respiración. Estas medidas dan solo una indicación aproximada del estado de germinación alcanzado.

La emergencia del eje (la radícula) nos permite reconocer cuando la germinación ha sido completa. El grado de avance de la germinación en una población de semillas se expresa en porcentaje de germinación en función de tiempo.

2.10. Características generales de lupenol

El lupenol es un triterpeno con formula molecular $C_{30}H_{50}O$, y con peso de 426 g/mol (Chapman 1992), sus sinónimos son fagarsterol, lupeol y monogynol. Se ha aislado de varias especies de plantas, entre estas, algunas son: *Celastrus scandens*, *Lophopetalum toxicum*, *Maytenus octagona*, *Vernonia cinerea* y *Salacia reticulata* (Chapman *et al.*, 1992).

Sus usos son: agente anti-inflamatorio (Hodges, 2003), antioxidante (Sultana, 2003), antimutagénico (Saleem, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo principal*

Por medio de un estudio sistemático y química y biodirigido obtener de la planta *Xylosma flexuosa* metabolitos secundarios con posible actividad herbicida.

3.1.2. *Objetivos particulares*

Evaluar el efecto de los extractos orgánicos de *Xylosma flexuosa* en ensayos *in vitro* e *in vivo* sobre malezas monocotiledóneas y dicotiledóneas

A partir de las evaluaciones preliminares de la actividad de diferentes extractos orgánicos en la síntesis de ATP, obtener el extracto orgánico activo de *Xylosma flexuosa* activo.

Haciendo uso de la técnica de fraccionamiento biodirigido a partir del extracto activo, se obtendrán metabolitos secundarios de la planta *Xylosma flexuosa*.

Caracterizar la estructura química del o de los metabolitos obtenidos de *Xylosma flexuosa* con posible actividad herbicida.

Evaluar la actividad de los metabolitos aislados con potencial actividad herbicida a través del ensayo de cernimiento, la síntesis de ATP.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. *Material Vegetal*

La planta *Xylosma flexuosa* fue recolectada en el campo de aviación, un kilómetro al noroeste de la carretera a Zochipala municipio de Leonardo Bravo Guerrero. La identificación de la especie fue realizada por la M.C. Nelly Diego y Biólogo J. R. de Santiago, del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM, con registro del herbario SCME 056775. El material vegetal se secó a temperatura ambiente.

4.2. *Preparación de los extractos*

Se emplearon 2 g de las partes aéreas de las plantas secas y molidas, las cuales se maceraron por 24 hrs. con 50 mL de hexano; el producto obtenido se filtró y se concentró al vacío obteniéndose el extracto hexánico; el residuo vegetal se secó y se le adicionaron 50 mL de CHCl_3 y se maceró por 24 hrs. y se siguió el mismo procedimiento que para la obtención del extracto hexánico, posteriormente se sometió a una maceración adicional con MeOH. Finalmente el residuo vegetal se desechó.

4.3. *Fraccionamiento y análisis cromatográfico*

Los extractos hexánico y clorofórmico fueron adsorbidos de modo independiente en el 100% de su peso en gel de sílice, y aplicados a una columna cromatográfica que contenía 45 g y 75 g de gel de sílice respectivamente. Se utilizaron como eluyentes para la columna mezclas de hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones de menor a mayor polaridad y finalizando con acetona. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina en placas

de aluminio recubiertas con sílica gel de 0.25 mm de espesor y reuniéndose las que mostraron similitud en contenido metabólico.

Como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV modelo UVSL-25 Mineralight® (onda corta 254 nm y onda larga 366 nm) y se revelaron utilizando sulfato cérico amoniacal (Apéndice) como agente cromógeno; para el desarrollo de color, las placas se colocaron en una parrilla eléctrica a 100°C aproximadamente. Las fracciones similares en composición fueron reunidas.

4.4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de tallos *Xylosma flexuosa*

Por orden de polaridad, primero se obtuvo el extracto hexánico y después el clorofórmico. De 517 g de tallos de la planta de *X. flexuosa* se obtuvieron 4.3 g de extracto hexánico con un rendimiento del 0.83%. El diagrama 1 muestra el ensayo biodirigido realizado con *Xylosma flexuosa*.

El extracto hexánico fue fraccionado con un gradiente hexano: AcOEt de diez en diez, empezando con hexano al 100%, continuando con una mezcla hexano: AcOEt 90:10 y así sucesivamente hasta llegar a AcOEt 100%, y por último con acetona al 100 %. Del fraccionamiento primario se obtuvo un total de 419 fracciones de 100 mL cada una, las cuales, por análisis cromatográfico en capa fina fueron reunidas en 12 fracciones de acuerdo a sus características cromatográficas similares. En la Tabla 1 se muestran las fracciones obtenidas así como los sistemas de elución empleados.

Continuando con el ensayo biodirigido, de las 12 fracciones reunidas, solo se ensayó el efecto de 8 fracciones en la síntesis de ATP debido a la cantidad menor en miligramos que se obtuvieron. Los valores de I_{50} de las fracciones, obtenidos en la síntesis de ATP se muestran en la Tabla 2.

De las fracciones probadas, la numero 11 presentó la mayor actividad inhibitoria en la síntesis de ATP con un I_{50} de 20.97 ppm, aunque con menor

DESARROLLO EXPERIMENTAL

cantidad de extracto. Por ello se decidió purificar la fracción 4, pues de ésta precipitaron en forma espontánea 5 mg de cristales, dada la cantidad de muestra obtenida y su valor de I_{50} , se decidió a purificar dicha fracción. Del resto de las muestras más activas, o eran una compleja mezcla de compuestos, o la cantidad de muestra obtenida es menor a la requerida para los ensayos.

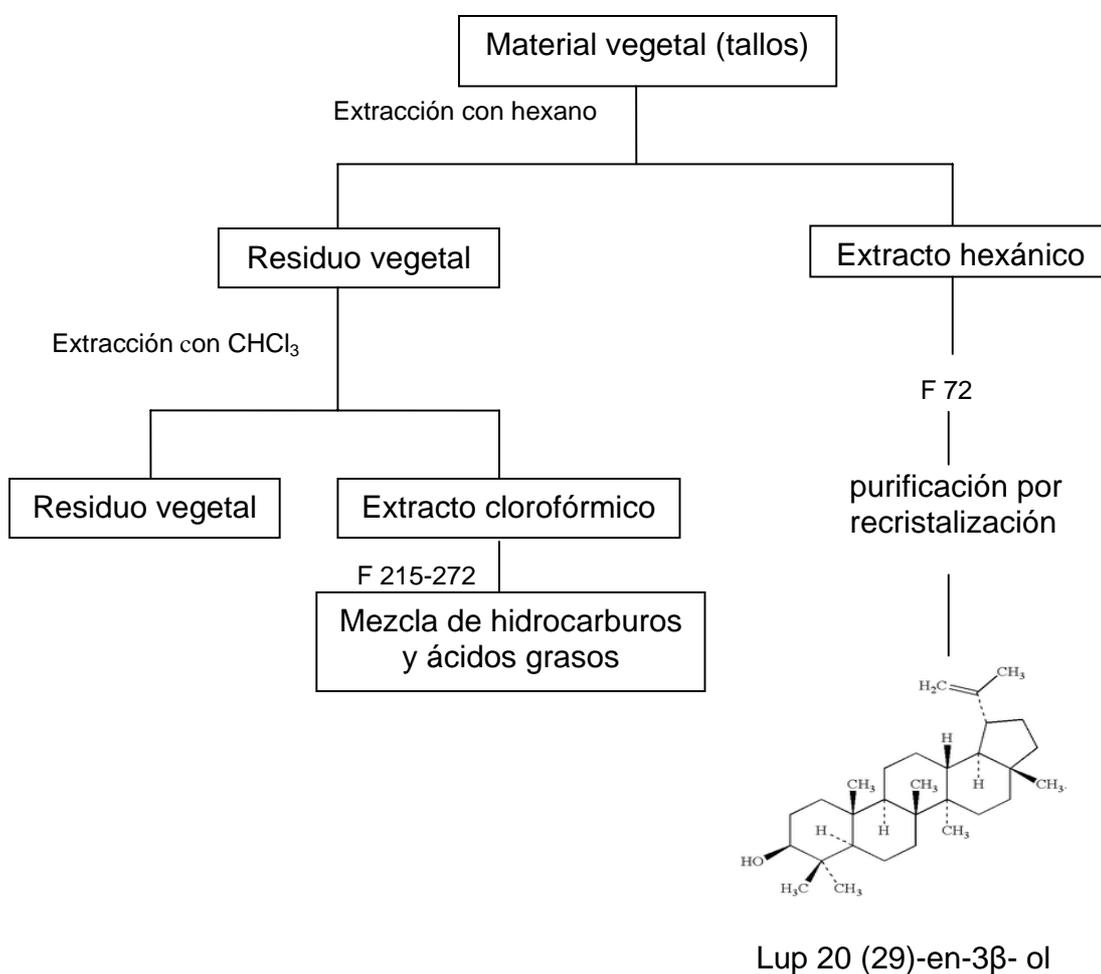


Diagrama 1. Ensayo biodirigido de *Xylosma flexuosa*.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Tabla 1. Fracciones de la columna cromatográfica abierta del extracto hexánico de tallos.

Clave	Núm. de fracciones	Proporción (v/v)	Eluyente
F1	1-69	100	Hexano
F2	70		
F3	71		
F4	72	90:10	Hexano:AcOEt
F5	73-74		
F5	75-79		
F7	80-104	80:20	Hexano-AcOEt
F8	105-113		
F9	114-168	70:30	Hexano-AcOEt
F10	169-231		
	232-275	60:40	Hexano-AcOEt
	276-307	50:50	Hexano-AcOEt
F11	308-326	40:60	Hexano-AcOEt
	327-355	20:80	Hexano-AcOEt
	356-365	10:90	Hexano-AcOEt
F12	366-381	100	AcOEt
	382-419	100	Acetona

Tabla 2. Efecto de las fracciones elegidas sobre la Síntesis de ATP.

FRACCIÓN	I₅₀ (ppm)
F2	No inhibe
F3	25.82
F4	117
F5	No inhibe
F6	26.31
F9	36.9
F10	No inhibe
F11	20.97

4.5. Aislamiento del Lup-20(29)-en-3 β -ol

De la fracción 4 eluída con hexano:acetato de etilo 90:10, espontáneamente precipitaron cristales de color blanco.

Estos cristales fueron purificados por recristalización con acetona R.A, obteniéndose 0.0562 g de cristales bien definidos que en una cromatografía en capa fina solo se observó una mancha al visualizarse con luz UV y revelando una orilla de la cromatoplaque con sulfato cérico amoniacal.

4.6. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los metabolitos obtenidos

Todos los análisis espectrométricos se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR Perkin-Elmer, 1605. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico se determinaron en un equipo JEOL JMS-SX102A Hewlett Packard

5890 serie II, mediante introducción directa a 70 eV.

Los espectros de RMN se determinaron a 300 MHz y 75.3 MHz para ^1H y ^{13}C respectivamente, en un equipo de alta resolución Varian (Unity-Inova) 400, dependiendo del caso, y se empleó CDCl_3 como disolvente. Los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm), referidos a tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

4.7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto CHCl_3 de tallos de *Xylosma flexuosa*

El fraccionamiento del extracto clorofórmico de tallos generó un total de 712 fracciones primarias de 100 mL cada una, que se reunieron en 18 subfracciones de acuerdo a la similitud en su contenido metabólico comprobado por el análisis cromatográfico posterior (Tabla 3).

El extracto clorofórmico fue fraccionado en sus componentes por medio de una columna cromatográfica de gel de sílice, empleando como disolventes de elución mezclas de hexano-AcOEt de polaridad creciente (100-0 a 0-100 v/v); de la fracción F7 eluida con sistema 70:30, precipitó espontáneamente un sólido amarillo que presentó actividad en la síntesis de ATP con un valor de $I_{50} = 44.5$ (Tabla 4), el cual estuvo constituido por una mezcla de hidrocarburos y ácidos grasos.

El cromatograma en capa fina de gel de sílice mostró una mancha homogénea no visible al UV pero que reveló al aplicarle sulfato cérico amoniacal.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Tabla 3. Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta del extracto clorofórmico de tallos de *Xylosma flexuosa*.

Clave	Núm. de fracciones	Proporción (v/v)	Eluyente
F1	1-26		
F2	27-43	90:10	Hexano-AcOEt
F3	44-161		
F4	162-174		
F5	175-202	80:20	Hexano-AcOEt
F6	203-214		
F7	215-272	70:30	Hexano-AcOEt
F8	273-318		
F9	319-361	60:40	Hexano-AcOEt
F10	362-387	50:50	Hexano-AcOEt
F11	388-432		
F12	433-459	40:60	Acetona
F13	460-508	30:70	Hexano
F14	509-604	20:80	Hexano-AcOEt
F15	605-642	AcOEt 100%	Hexano-AcOEt
F16	643		
F17	644-695	Acetona	Hexano-AcOEt
F18	696-712	MeOH	Hexano-AcOEt

Tabla 4. Efecto de las fracciones elegidas sobre la Síntesis de ATP.

FRACCIÓN	I₅₀ (ppm)
1	No inhibe
3	23.07
4	No inhibe
7	44.5
12	No inhibe
10	No inhibe

4.8. Aislamientos de los cloroplastos

Los cloroplastos se obtuvieron a partir de 40 g de hojas de espinaca frescas (*Spinacea oleraceae* L.) verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío y en la oscuridad. Las hojas se lavaron con suficiente agua para eliminar la tierra, se les retiró la nervadura central y el ápice. Posteriormente se fragmentaron y se colocaron en una licuadora (Modelo L-21, Osterizer) con 250 mL de medio de aislamiento para cloroplastos (Apéndice) a 4°C. La molienda se efectuó cuidadosamente, para evitar el daño mecánico de los cloroplastos. El homogeneizado se filtró a través de 8 capas de gasa, el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, en una centrífuga Sorval® Modelo Super T21, DUPONT. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en un máximo de 2 mL de medio de aislamiento de cloroplastos (Apéndice).

4.9. Cuantificación de la clorofila

La clorofila se cuantificó según el método de Arnon (1949), el cual consiste en aforar a un volumen de 5 mL con acetona una alícuota de 30 µL de cloroplastos resuspendidos, después se incuban en la oscuridad a 0°C por 5 min y se centrifugan 5 minutos a 4000 rpm en una centrífuga clínica (centrífuga modelo EBA

8SHettich), para eliminar las membranas y proteínas precipitadas. El contenido de clorofila se cuantificó midiendo la absorbancia del sobrenadante a dos longitudes de onda, 663 y 645 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU650, la concentración de la clorofila se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

[Chl] = μg de clorofila por mL

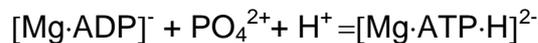
A = Absorbancia a las longitudes de onda indicadas.

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

4.10. Medición de la síntesis de ATP

La medición se realizó con un micro electrodo Orion, Mod 8103 Ross conectado a un potenciómetro Corning, Modelo 12 con escala expandida (Dilley 1972, Morales-Flores *et al.*, 2007), Los cambios de pH observados, se registraron en una aparato Gilson.

En la cubeta de reacción se agregaron 3 mL de medio bomba (Apéndice), 30 μL de ADP y 30 μL de fosfato inorgánico (Pi), (se ajustó el pH a 8 con KOH y HCl a concentraciones 1.0, 0.1, 0.001 N) más 60 μg Chl., la mezcla se iluminó por 1 minuto, resultando en el consumo escalar de H^+ por ATP como se observa en la siguiente reacción:



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

4.11. Medición de la velocidad del transporte de electrones

La determinación de la velocidad del transporte de electrones se midió en tres diferentes condiciones (basal, fosforilante y desacoplado), utilizando un oxímetro YSI (Yellow Spring Instrumental) modelo 5300, con un electrodo tipo Clark. Para el transporte de electrones basal se agregaron 3 mL de medio de transporte de electrones (Apéndice) a la cubeta de reacción y 60 µg de Chl, se iluminó por 3 minutos empleando una lámpara de proyector de 150 Watts. El flujo de electrones fotosintético no-cíclico se monitoreo en presencia de metil viológeno (MV) que es un aceptor artificial de electrones.

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

Para la medición del transporte de electrones desacoplado se utilizó el mismo medio que para el transporte basal más 6 mM de NH_4Cl (Calera *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1971).

En todos los casos los controles se realizaron al inicio y final de cada experimento, la velocidad obtenida se comparó con al velocidad del control (Izawa, 1973; Dilley, 1972).

4.12. Medición de la Mg^{2+} -ATPasa

La actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Mills y colaboradores (1980). Los cloroplastos se aislaron con la metodología indicada en el inciso 5.5. con la variante que el medio de aislamiento se cambió por el medio de aislamiento para ATPasa (Apéndice) y el sedimento obtenido se lavó con 2 mL de medio de resuspensión para ATPasa (Apéndice) y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 1 min., posteriormente se resuspendieron con 1 mL de medio de resuspensión para ATPasa (Apéndice).

Se cuantificó la concentración de clorofila como en el punto 4.9.

4.12.1. Activación de la enzima Mg^{2+} -ATPasa

Para la activación de la enzima, se adicionaron 0.1 mL de la suspensión de cloroplastos (300 μ g de Chl) a una mezcla de 0.25 mL de medio de activación I y 0.65 mL de medio de activación II (Apéndice). Posteriormente, la mezcla se iluminó durante 2 min. con un haz luminoso filtrado a través de un lente de Izawa y con agitación suave para obtener cloroplastos activados.

4.12.2. Hidrólisis de ATP y cuantificación de fosfatos

0.1 mL de cloroplastos activados se agregaron a 0.9 mL del medio de hidrólisis (Apéndice). La hidrólisis de ATP se realizó en la oscuridad y con agitación suave durante 1 minuto. La reacción se detuvo al adicionaron 500 μ L de TCA al 20 %.

Las proteínas precipitadas con TCA se eliminaron por centrifugación durante 5 min. a 5000 rpm en una centrífuga clínica (modelo EBA 8S Hettich). El sobrenadante se utilizó para la cuantificación del fosfato liberado, por el método colorimétrico de Sumner, (1942), como se describe a continuación:

A 1 mL de sobrenadante se le adicionaron 250 μ L de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ al 6.6 %, 250 μ L de H_2SO_4 7.5 N y 0.3 mL de agua destilada. La mezcla resultante se agitó y de inmediato se adicionaron 200 μ L de $FeSO_4$ al 10% (p/v en agua acidulada; H_2SO_4 7.5 N), la mezcla anterior se dejó en reposo durante 20 min.; transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman (modelo DU 650). Simultáneamente, se realizó una curva patrón con KH_2PO_4 empleando un rango de concentraciones de 0.5 μ M a 1 μ M. los datos de absorbancia a 650 nm se graficaron con concentraciones crecientes de KH_2PO_4 y de esta curva se extrapolaron los valores de absorbancia

del fosfato liberado al llevarse a cabo la hidrólisis de ATP.

4.13. Ensayos *in vivo* de *Lolium multiflorum* (pasto) y *Trifolium alexandrinum* (trébol) y *Echinochloa crusgalli* (capín)

Se midió el efecto de los extractos orgánicos de tallos y hojas de *X. flexuosa*, en tres especies de cernimiento de plantas: *Lolium multiflorum* (mono dicotiledónea), *Trifolium alexandrinum* (eudicotiledóneas) y *Echinochloa crusgalli* (mono dicotiledónea). Para ello se sembraron 25 semillas de cada maleza en macetas del mismo tamaño y a la misma profundidad. Fueron regadas con agua cada tercer día y se mantuvieron a una temperatura aproximada 30 °C, con iluminación normal día/noche.

A los 20 días de crecimiento, se seleccionaron las plantas de tamaño uniforme y se dividieron en dos grupos, uno control y otro experimental. Las plantas se rociaron con un aspersor, para ello, se pesaron 10 mg de cada uno de los extractos secos y se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfóxido 99.5% GC (DMSO, Sigma), obteniendo una concentración de 10,000 ppm de extracto. A partir de esta solución, se tomaron alícuotas para obtener concentraciones finales de 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm en agua y se les agregó 5 µL de Tween 20R al 0.05% como coadyuvante para romper la tensión superficial. Aproximadamente, 5 mL de cada disolución de los extractos orgánicos, fue asperjada en las hojas de las plantas mono y dicotiledóneas. Se emplearon tres controles, un negativo (tratadas con agua), uno con DMSO a 100 ppm y uno con Tween 20R al 0.05% y un control positivo con el herbicida DCMU 50 µM.

4.14. Medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII

En todas las plantas se monitoreo la emisión de fluorescencia a las 24, 48 y 72 horas, con un fluorómetro Handy PEA (Plant Efficient Analyser Hansatech Ltd.,

King's Lynn, England,). La cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII se registró en las hojas de trébol, pasto y capín, previamente adaptadas a la oscuridad por un periodo de 5 minutos, después se les aplicó luz de longitud de onda de 680 nm con una densidad de flujo fotónico de $3000 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mediante una fuente de 3 fotodiodos, y registrar simultáneamente la fluorescencia del fotosistema II con un fotodetector, la duración del pulso de luz fue de dos segundos.

Los datos se procesaron con los programas Handy PEA y Biolyzer, (Maldonado-Rodriguez, 2002).

4.15. Determinación de la biomasa seca

Después de 20 días de tratamiento con los extractos orgánicos de tallos y hojas de *Xylosma flexuosa*, las plantas donde se observó necrosis, fueron cosechadas desde su raíz y secadas dentro de una cámara de incubación (Lab-Line Instruments Inc., Ambi-Hi-Lo Chamber) a una temperatura de 30° C hasta obtener un peso constante.

4.16. Germinación in Vitro de *Lolium multiflorum* (pasto) y *Trifolium alexandrinum* (trébol) y *Echinochloa crusgalli* (capín)

Para determinar el efecto de los extractos en la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *Lolium multiflorum*, *Trifolium alexandrinum*, y *Echinochloa crusgalli*, se escogieron 30 semillas por planta y se lavaron con agua e hipoclorito al 10%, para evitar la contaminación, la siembra se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar (Veco) que se limpió previamente con etanol para crear un ambiente estéril. Para poner a germinar las semillas se prepararon 72 cajas Petri de 10 cm de diámetro, a las que se les colocó en su interior un círculo de papel filtro para cubrir la superficie, se envolvieron en papel periódico y se colocó

DESARROLLO EXPERIMENTAL

en una autoclave para esterizarlas. Para cada extracto se emplearon 12 cajas Petri por semilla, de las 12 cajas, tres fueron controles y se les agregó a cada una 10 mL de agua destilada y estéril y las 30 semillas correspondientes. Después, a las nueve cajas restantes se les agregó, 10 mL de agua, 30 semillas, y 12.5 ppm, 25 ppm, y 50 ppm respectivamente de los extractos de hojas y de tallos de *Xylosma flexuosa*. Por último, las cajas se sellaron usando parafilm y se colocaron dentro de una cámara de incubación (Lab-Line Instruments Inc., Ambi-Hi-Lo Chamber) a 27 °C, el trébol tardó en germinar 5 días, el pasto y capín 9 días.

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

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de los extractos orgánicos de *X. flexuosa* en la germinación de *Lolium multiflorum* (pasto) *Trifolium alexandrinum* (trébol) y *Echinochloa crusgalli* (capín)

De los resultados obtenidos, solamente se muestran los datos de los extractos que presentaron mayor inhibición en la germinación de las semillas y elongación de los tallos y las raíces de las plántulas mono y eudicotiledóneas.

En la Figura 5 se observa que el extracto CHCl₃ de tallos a la concentración de 50 ppm, inhibió la elongación de los tallos y de la raíz de *Lolium multiflorum* en 44% y un 20% aproximadamente, sin afectar la germinación. A 25 ppm la inhibición fue menor, 10% aprox. para la elongación de los tallos y la germinación, y en este caso tampoco se afectó la elongación de la raíz. El extracto metanólico de tallos también afectó a las plántulas de *Lolium* pero en menor proporción (menos del 20%). El extracto hexánico no presentó actividad inhibitoria en ninguna de las tres actividades medidas, al contrario, se favoreció el crecimiento del tallo y la germinación (Figura. 5). Por lo tanto el extracto más activo como inhibidor de la elongación de los tallos fue el clorofórmico.

En la Figura 6 se observa que los tres extractos de tallos, inhiben la elongación de los tallos de *Echinochloa crusgalli*, siendo el más activo el extracto clorofórmico con una inhibición del 25 %. Sin embargo, el extracto metanólico es el más activo al inhibir, además de la longitud de los tallos, la elongación de la raíz en un 60 % a 50 ppm; y la germinación en un 25 % a 25 ppm, pero esta inhibición se revierte con 50 ppm del extracto. El extracto hexánico inhibió la elongación de tallos en un 23 % a 25 ppm y la elongación de la raíz en un 40% a 25 ppm, en ambos casos la inhibición se revierte a 50 ppm.

Los resultados en semillas de trébol no se presentan porque ninguno de los extractos ensayados presentó efecto en las actividades medidas.

Los resultados presentados arriba, sugieren que solamente los extractos de los tallos de la planta *Xylosma flexuosa* presentan actividad inhibitoria en la elongación de tallos y raíces, siendo el extracto clorofórmico de tallos, el más activo en las plántulas de *L. multiflorum*, y en las plántulas de *E. crusgalli*, seguido por el extracto hexánico. Además su actividad es independiente de la concentración. Los resultados indican que el extracto clorofórmico y el hexánico de tallos son selectivos para inhibir la germinación y el crecimiento de las plántulas monocotiledóneas al no afectar el trébol (eudicotiledóneas).

Lolium multiflorum

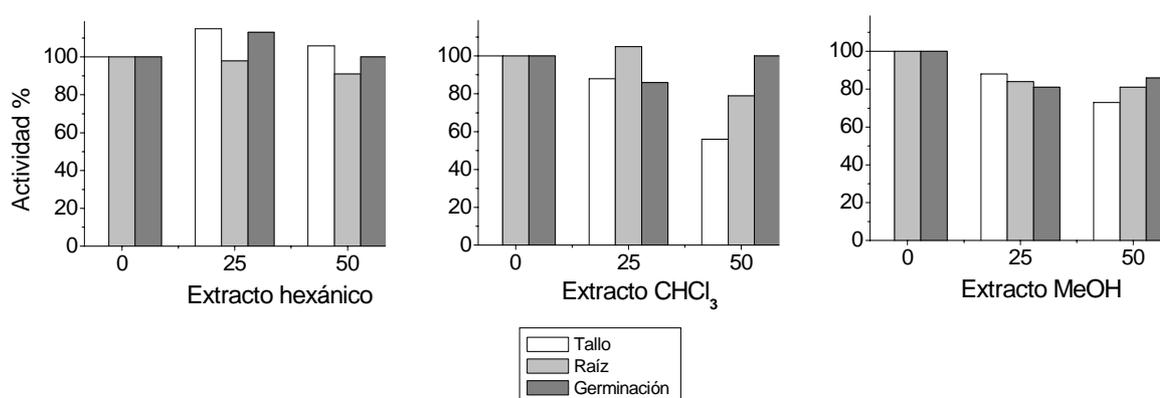


Figura 5. Actividad de los extractos hexánico, CHCl₃ y MeOH de tallos de *Xylosma flexuosa* en la germinación y crecimiento de las plántulas de *Lolium multiflorum*.

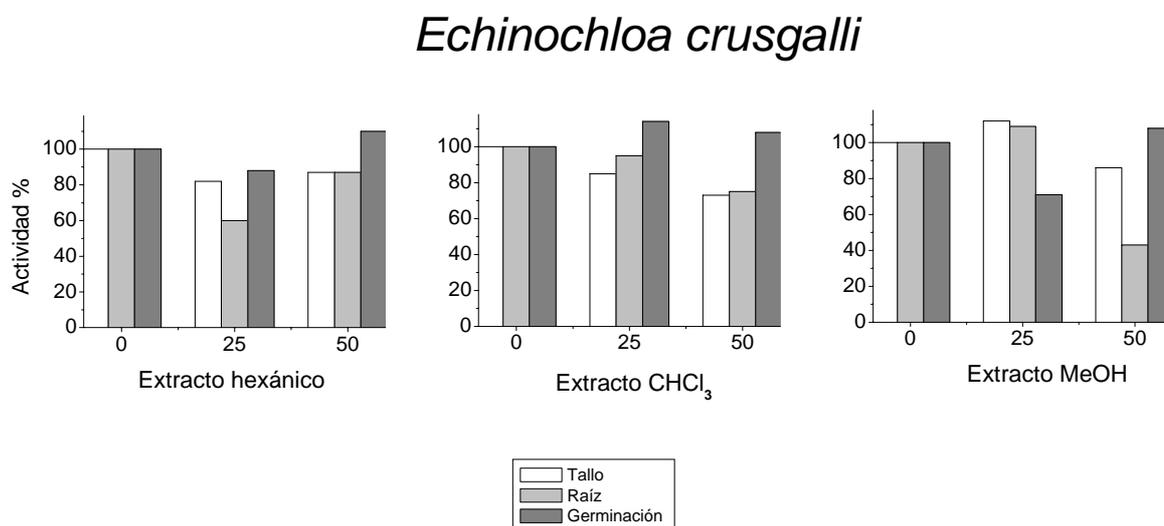


Figura 6. Actividad de los extractos hexánico, CHCl₃ y MeOH de *Xylosma flexuosa* (tallos) en la germinación y crecimiento de las plántulas de *Echinochloa crusgalli*.

5.2. Medición de la fluorescencia de la clorofila a en trébol pasto y capín

Se registró el efecto de los extractos orgánicos de la planta *X. flexuosa* en la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a de las hojas de las plantas de trébol, pasto y capín crecidas por 20 días en el invernadero y asperjadas. Las mediciones se hicieron a las 24, 48 y 72 horas después de asperjadas con los extractos. Los datos se procesaron con los programas Handy PEA y Biolyzer (Strasser *et al.*, 1995).

En la Figura 7 se muestra el efecto de los extractos hexánico y clorofórmico de tallos en la fluorescencia de la clorofila a de las hojas de trébol, comparado con el efecto de 50 μ M de DCMU, como se puede observar el efecto de los extractos y del DCMU es mayor a las 72 horas, afectándose la eficiencia fotosintética, el área y

la capacidad del excitón para mover un electrón más allá de Q_A , con un comportamiento similar al DCMU. Los extractos de cloroformo, hexano y metanol de hojas, así como el extracto metanólico de tallos no afectaron a las plantas de trébol por lo que no se presentan los datos.

En la Figura 7, panel B, se observa que a las 24 hrs., en 12.5 ppm de extracto $CHCl_3$ de tallos muestra un efecto muy diferente al que presenta el DCMU en las hojas de trébol, los parámetros que disminuyen comparado al control son: la fluorescencia inicial, F_0 ; la fluorescencia variable a los 2 ms, V_J ; el tamaño de la antena que disminuyen y por ello ABS/RC disminuye y por lo tanto el número de fotones que absorbe también disminuye, es decir la energía atrapada por centro de reacción, TRo/RC ; la disipación de energía en forma de calor, Dlo/RC ; y el funcionamiento de la enzima que fotoliza el H_2O (dV/dto) disminuye en un 40 %. Estos datos nos indican que el lado donador de electrones del PSII se ve afectado. Sin embargo, el transporte de electrones se mantiene constante y N (el número de veces que se reoxida Q_A) aumenta, lo que indica que la eficiencia de la fotoquímica primaria también se ve disminuida. A las 48 hrs. la planta se recupera parcialmente según los datos de fluorescencia (Figura 7, panel B). Sin embargo a las 72 hrs. nuevamente se empieza a dañar el PSII y por lo tanto la eficiencia fotosintética se ve disminuida en un 50%, pero en este caso en una forma similar al DCMU que afecta a las planta de trébol (Figura 7, panel A y B).

El extracto hexánico de tallos también afectó las plantas de trébol, como se observa en la Figura 7, panel C, en donde se observa que a las 24 horas los efectos del extracto no son notables, sin embargo, a las 48 y 72 horas se nota un efecto parecido al que muestra el DCMU, aunque con menor potencia. Las plantas de trébol fueron afectadas solamente por los extractos clorofórmicos y hexánicos de tallos. El extracto MeOH no mostró efecto (datos no mostrados).

RESULTADOS

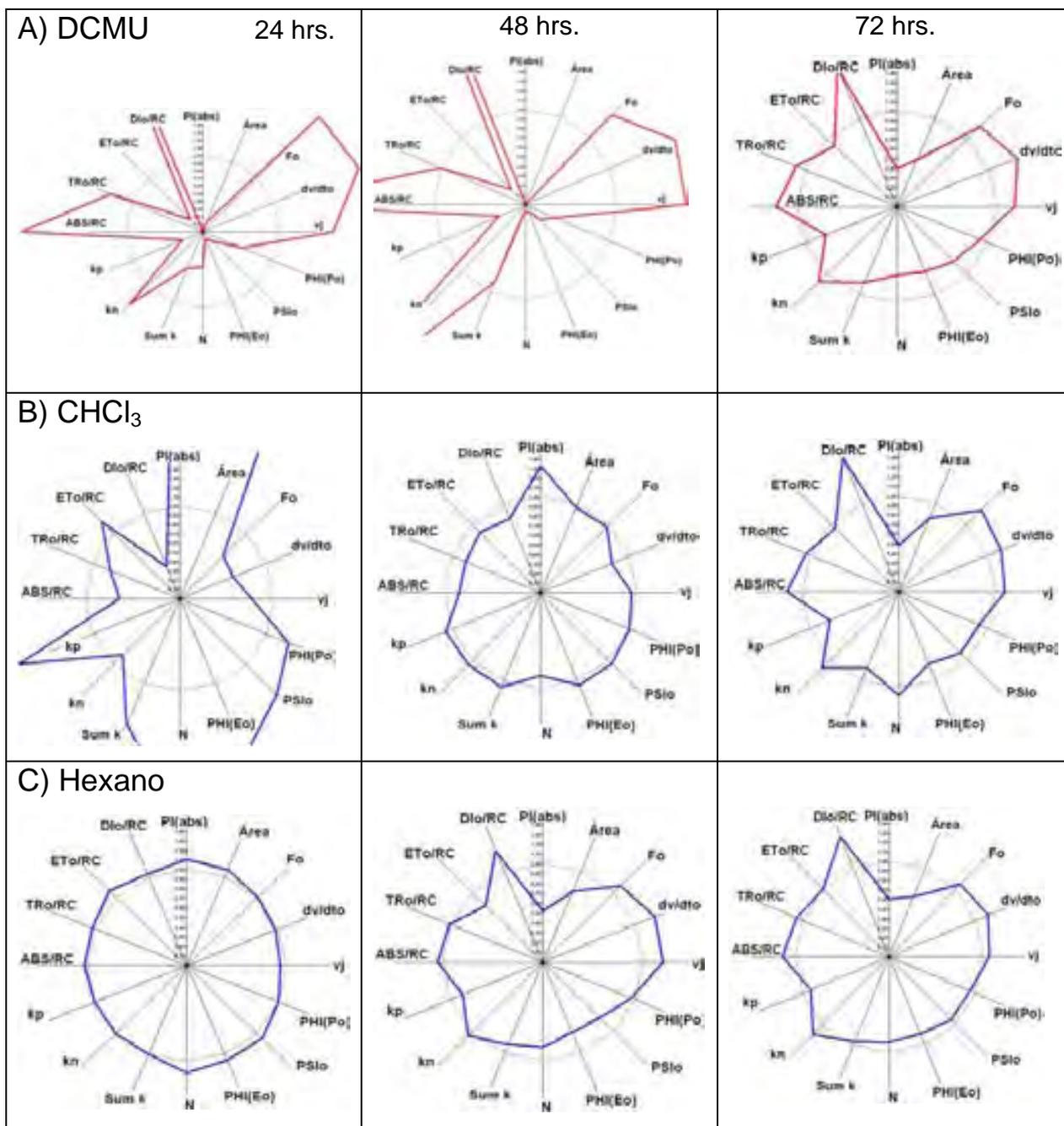


Figura. 7. Gráfica de radar mostrando el efecto de 50 μM de DCMU en la fluorescencia de la clorofila *a* de las hojas de trébol (panel A), con 12.5 ppm del extracto clorofórmico de tallos (panel B) y con 12.5 ppm del extracto hexánico de tallos (panel C), a las 24, 48 y 72 horas después de que se asperjaron. El círculo punteado representa el control.

RESULTADOS

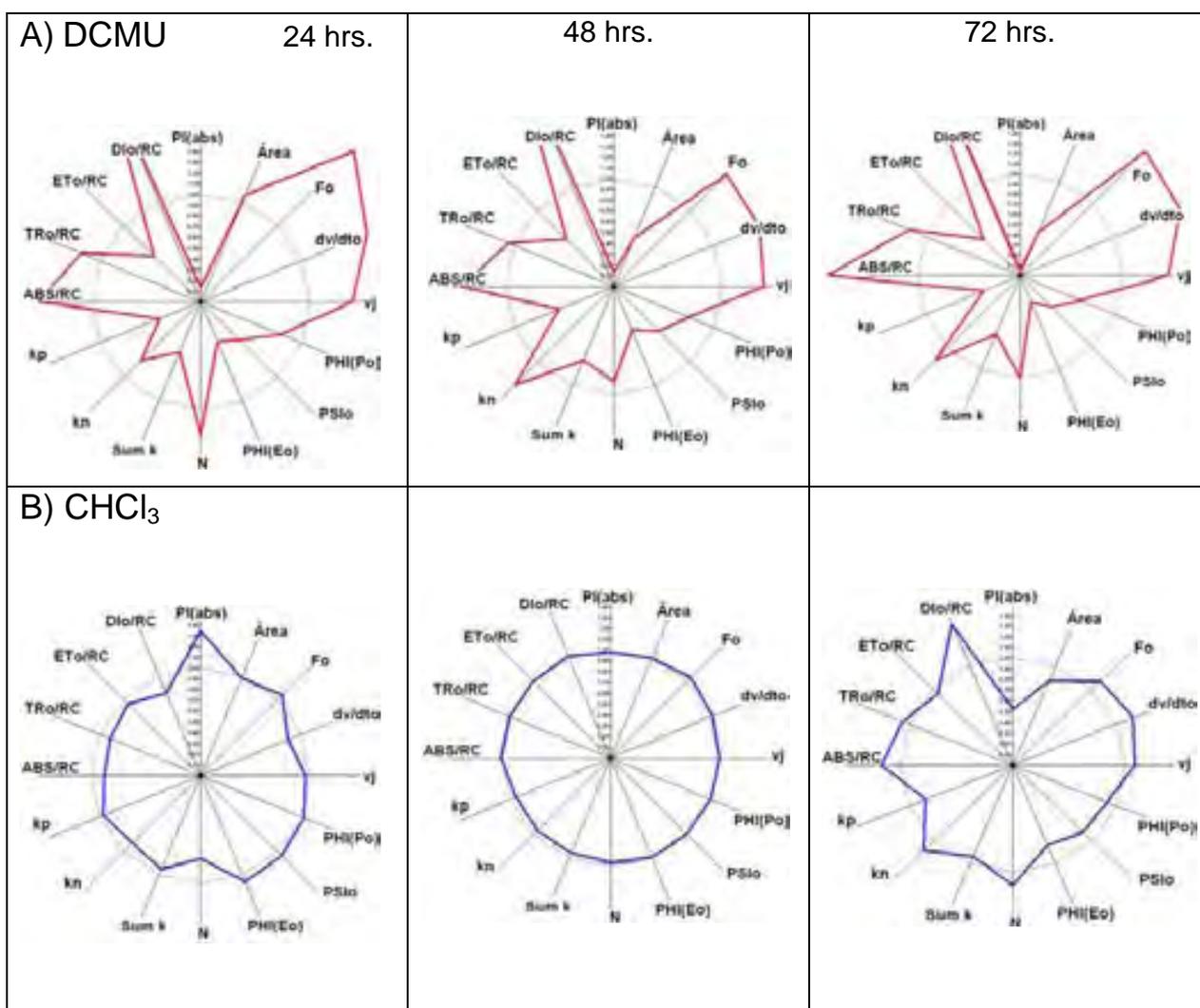


Figura 8. Gráfica de radar mostrando el efecto de DCMU a 50 μ M en las hojas de capín (panel A), y con 12.5 ppm del extracto clorofórmico de hojas (panel B), a las 24, 48 y 72 horas después de que se asperjaron. El círculo punteado representa el control.

De los extractos ensayados en las plantas de *E. crusgalli* se observó que solamente el extracto CHCl₃ de hojas afectó la fotosíntesis, a las 24 hrs; este efecto fue ligero, como se observa en la Figura 8 panel B. A las 48 hrs., la planta se recuperó, sin embargo, a las 72 hrs. se ve inhibido en donde PI (abs.) (la eficiencia

fotosintética) disminuyó en un 50 %; el área sobre la curva 20%, y PHI(Po) y PHI/Eo disminuyen ligeramente. Sin embargo la disipación de la energía y calor (Dlo/RC) aumentan un 40 %, así los datos indican que tiene un comportamiento, similar a DCMU (Figura 8 panel A). De los extractos que no mostraron efecto en las plantas de *E. crusgalli*, no se muestran los datos.

Las plantas de *Lolium multiflorum* no fueron afectadas por ninguno de los extractos ensayados (datos no mostrados).

Los resultados muestran que, de todos los extractos ensayados, solo los extractos de CHCl₃ y hexano de tallos afectaron la cinética de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* en trébol; por otro lado, el extracto clorofórmico de hojas solo afectó a la fluorescencia de la clorofila *a* de las hojas de capín, por lo que se sugiere, que los extractos clorofórmico y hexánico de tallos son selectivos para malezas eudicotiledóneas, (ya que no afectan al pasto y al capín). Sin embargo el extracto CHCl₃ de hojas afectó solamente a las plantas de *E. crusgalli* por lo que no se puede decir que sea selectivo para monocotiledóneas porque no afectó a *L. multiflorum*.

5.3. Biomasa de los extractos orgánicos activos de *X. flexuosa*

Al asperjar las plantas con los extractos orgánicos, algunas de ellas mostraron necrosis en sus hojas como se muestra en la Figura 9, por lo que se les determinó la biomasa seca para ver si se recuperaban del efecto de los extractos o también se afectaba su crecimiento. De los datos de biomasa seca de las plantas se observa, que los extractos clorofórmico y metanólico de tallos, inhiben el crecimiento de las plantas de trébol (42 y 47 % a 100 ppm, respectivamente), en una forma dependiente de la concentración (Tabla 5).

Los resultados de la medición de la emisión de la fluorescencia junto con los de biomasa seca sugieren que los metabolitos que contienen estos extractos actúan como herbicidas post-emergentes.

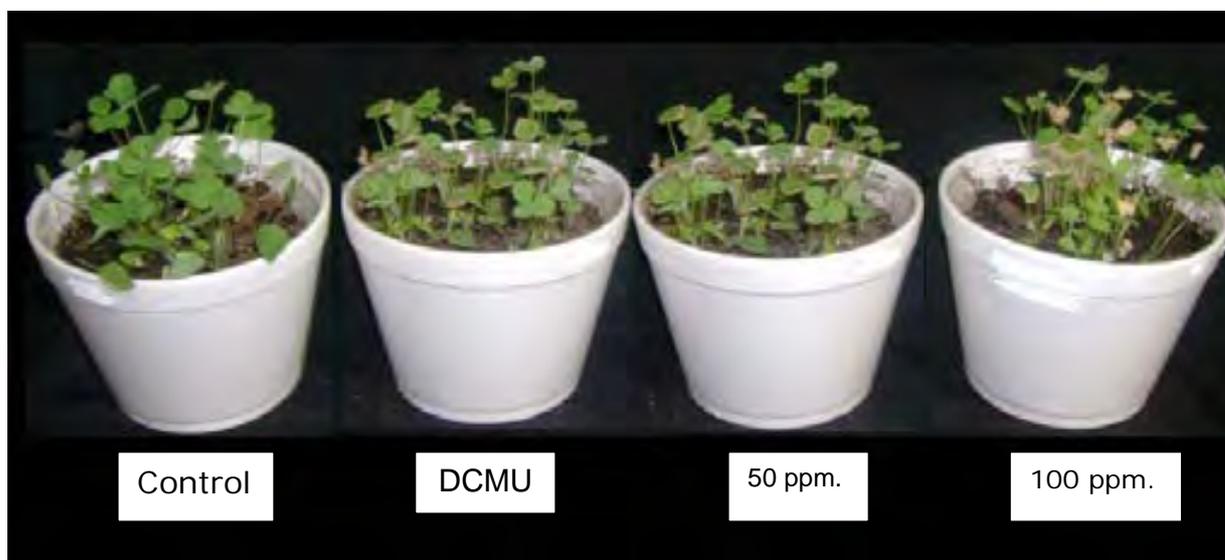


Figura 9. Plantas de *Trifolium alexandrinum* después de 15 días de ser asperjadas con el extracto CHCl_3 de tallos de *X. flexuosa* a 50 y 100 ppm. Como control positivo se usó DCMU a 50 μM .

Tabla 5. Biomasa seca de *Trifolium alexandrinum* (trébol) a diferentes concentraciones después de 15 días de tratamiento.

Tratamiento	Conc. [ppm]	gramos	%
Control Negativo		0.4192	100
Extracto CHCl_3 de tallos	50	0.3027	72
	100	0.2413	58
Extracto MeOH de tallos	50	0.2489	59
	100	0.2217	53

5.4. Determinación del extracto orgánico más activo como inhibidor de la síntesis de ATP

Los extractos se probaron en el ensayo de cernimiento, la síntesis de ATP de cloroplastos aislados. Los extractos clorofórmicos de tallos y hojas resultaron ser más activos como inhibidores de esta actividad, con valores de I_{50} de 18.5 y 18.4 ppm para ambos extractos; después les siguen en actividad, el extracto hexánico de tallos y el de hojas con valores de I_{50} de 34.5 y 79.0 ppm. Los extractos metanólicos de tallos y hojas no presentaron efecto inhibitorio (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de I_{50} de los extractos orgánicos de tallos y hojas en la síntesis de ATP.

	Extracto	I_{50} (ppm)
Tallos	Hexano	34.5
	CHCl ₃	18.5
	MeOH	No inhibe
Hojas	Hexano	79
	CHCl ₃	18.4
	MeOH	No inhibe

5.5. Caracterización del Lup-20(29)-en-3 β -ol

De la fracción 4 del extracto hexánico de tallos eluída con hexano: AcOEt 90:10 espontáneamente precipitó cristales de color blanco con actividad en la síntesis de ATP (I_{50} = 117 ppm). Se obtuvieron 0.0562g de cristales bien definidos que en una cromatografía en capa fina solo se observó una mancha.

La identificación estructural de los cristales se realizó mediante el análisis de sus constantes espectroscópicas (IR, RMN $^1\text{H}^{13}\text{C}$) y espectrométricas (EM), con las cuales se identificó el compuesto lup-20(29)-en-3 β -ol (lupenol), de acuerdo a las características que se describen en la Tabla 7 y que se discuten abajo.

El espectro IR (Espectro 1) muestra señales en 3342 cm^{-1} para vibraciones de tensión de grupos $-\text{OH}$, en 3066 cm^{-1} para carbono-hidrógeno insaturado (estrechamiento), en 2943 y 2870 cm^{-1} para carbono-hidrógeno alifático (estrechamiento), en 1639 cm^{-1} para carbono-carbono insaturado (estrechamiento), en 1453 cm^{-1} vibraciones de deformaciones asimétrica para $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$, en 1379 cm^{-1} , deformación simétrica de CH_3 , en 1190 cm^{-1} vibración para grupos gem dimetilo, en 1042 cm^{-1} , para vibración de tensión C-O (Tabla 7).

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- ^1H) (Espectro 2), mostró señales de hidrógenos alifáticos, de hidrógenos en carbono base de oxígeno e hidrógenos vinílicos. El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (Espectro 3), mostró señales que correspondieron a 6 carbonos cuaternarios, 6 carbonos terciarios, 11 carbonos secundarios y 7 metilos angulares en los que suman 30 átomos de carbono, uno de ellos base de oxígeno (Tabla 7).

Lo anterior se correlacionó con la existencia de un compuesto de tipo triterpenoide con fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$.

La suma de los pesos atómicos de los grupos hasta aquí mencionados dio como resultados 426 umas, que coincidió con el valor para el peso molecular observado en el espectro de masas del compuesto (Espectro 4).

De acuerdo a la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, el compuesto contiene seis insaturaciones y por la presencia de 7 metilos angulares (dos de ellos geminales, Espectro 4) y de las dos señales finas en 4.68 (doblete) y 4.56 ppm (doblete-cuarteto) asignados a un grupo metileno terminal con un metilo- sustituyente, se infirió para este compuesto una estructura con un esqueleto pentacíclico y un doble enlace exo cíclico típico de un triterpenoide de tipo lupano. El análisis del resto de las señales y la integración de los resultados espectroscópicos de IR, RMN ^1H y de

RESULTADOS

Tabla 7. Análisis espectroscópico de la fracción 4.

p.f.	200-201 °C
FM	C ₃₀ H ₅₀ O
IR, $\nu_{\text{máx}}$ (pastilla), cm ⁻¹ (Espectro 1)	3342, 3066, 2943, 2870, 1639, 1453, 1452, 1379, 1190, 1042.
RMN- ¹ H, (CDCl ₃ , 300 MHz) (Espectro 2)	4.68 (1H, $J=2.4$ Hz, H _a -29), 4.56 (1H, m, H _b -29), 3.18 (1H, dd, $J=5.2, 11.4$ Hz H-3), 2.37 (1H, m, H-19), 1.9 (1H, m, H-21a), 1.71 (1H, m, H-15), 1.67 (3H, s, H-30), 1.35 (1H, m, H-22b), 1.03 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24).
RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75.5 MHz) (Espectro 3)	150.98 (C-20), 109.32 (C-29), 79.03 (C-3), 55.30 (C-5), 50.48 (C-9), 48.30 (C-18), 48(C-19), 43.01 (C-17), 42.86 (C-14), 40.86 (C-8), 40.02 (C-22), 38.88 (C-4), 38.88 (C-1), 38.09 (C-13), 37.2 (C-10), 35.61 (C-16), 34.31 (C-7), 29.88 (C-21), 27. (C-23), 27.47 (C-15), 27.44 (C-2), 25.18 (C-12), 20.95 (C-11), 19.31 (C-30), 18.34 (C-6), 16.12 (C-25), 15.99 (C-26), 15.37 (C-24), 14.56 (C-27).
CG-EM, m/z (rel.int.%) (Espectro 4)	426(M ⁺ , C ₃₀ H ₅₀ O, 3.3), 315 (2.3), 257 (1.91), 204 (11.8).

¹³C (experimentos HSQC (Espectro 5), COSY (Espectro 6) y HMBC) permitió establecer para este compuesto la estructura del lup-20(29)-en-3 β -ol. Así la señal en δ_{H} 3.18, δ_{C} 79.03 se asignó al hidrógeno de la posición 3, la señal múltiple en 2.37 ppm, al hidrógeno alílico en la posición 19; de las siete señales para metilos, la localizada en 1.67 correlacionó en el espectro COSY con los hidrógenos vinílicos (Espectro 6) por lo que se asignó este metilo la posición 30. La comparación de los resultados.

espectroscópicos y espectrométricos con los de la literatura confirmó la identificación del compuesto (Atta-ur, 1994). En la Figura 10 se muestra la estructura del triterpeno lupenol.

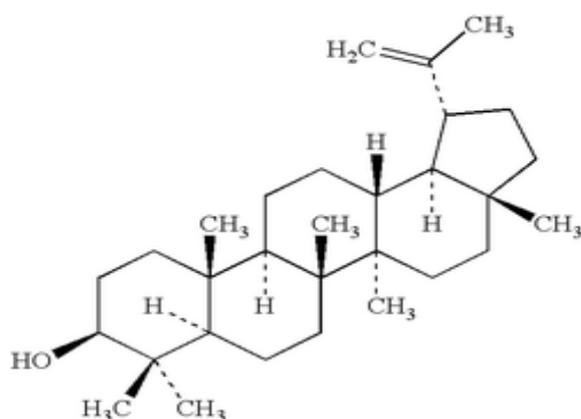


Figura 10. Estructura de Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupenol).

5.6. Efecto inhibitorio del Lupenol sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca

El compuesto puro lupenol se ensayó en la síntesis de ATP para determinar su efecto. En la Figura 11 se observa que lupenol inhibió la síntesis de ATP con un valor de I_{50} de 117 ppm, lo que indica que la fracción 4 estaba compuesta solamente por lupenol y algunas trazas de contaminantes.

5.7. Efecto del lupenol en el transporte de electrones en la fotosíntesis

La fotofosforilación dependiente de la luz está acoplada al transporte de electrones, así, la formación de ATP puede ser inhibida por bloqueo del transporte

de electrones por inhibición directa de la H⁺-ATPasa, o por el desacoplado del proceso de síntesis de ATP del transporte de electrones (Good, 1981).

Para determinar el mecanismo de acción del lupenol se evaluó su efecto sobre el transporte de electrones no cíclico de agua a MV en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado), los resultados muestran que el lupenol no inhibió el transporte de electrones desacoplado, y los transportes basal y fosforilante si fueron inhibidos parcialmente por lupenol en un 20 y 17 % respectivamente (Figura 12).

Estos datos sugieren que el lupenol se comporta como un inhibidor de la transducción de energía, al inhibir la fotofosforilación y no inhibir el transporte de electrones desacoplado.

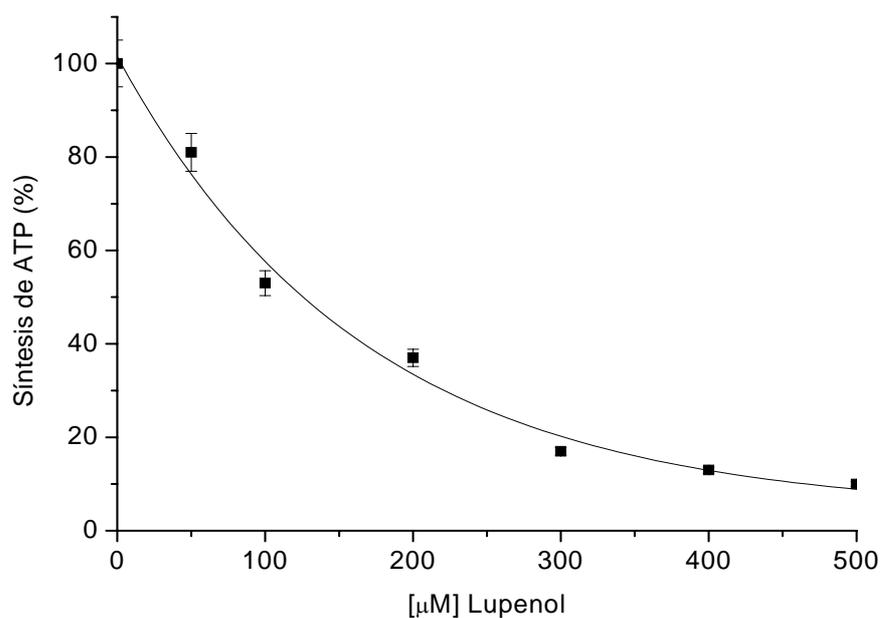


Fig. 11. Efecto del lupenol en la síntesis de ATP de cloroplastos asilados de hojas de espinaca. Los datos son el resultado de tres réplicas. Control = 1360 μM de ATP/mg de Chl x h.

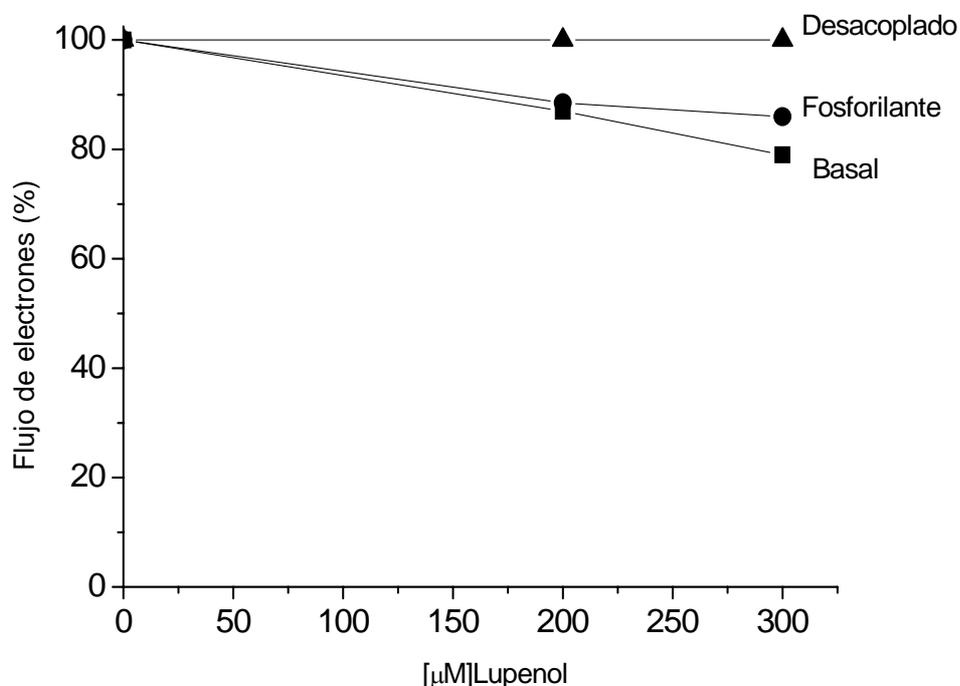


Figura 12. Efecto de lupenol en el transporte de electrones medido de agua a MV en cloroplastos aislados de hojas de espinaca. Basal (■), Fosforilante (●), y desacoplado (▲). El valor de los controles en $\mu\text{equiv. e}^- / \text{mg Chl} \times \text{h}$ fue de 624, 930 y 835, respectivamente para los transportes basal, fosforilante y desacoplado.

5.8. Efecto del lupenol en la actividad ATPasa

Para corroborar el comportamiento de lupenol como inhibidor de la transducción de energía, se midió su efecto en la actividad ATPasa. Los resultados muestran que el lupenol inhibe la actividad ATPasa en un 35 % a 100 μM , sin embargo a 200 μM inhibe en un 15 % y a 300 μM se revierte casi por completo la inhibición (Tabla 8), lo que indica que el lupenol a bajas concentraciones se comporta como inhibidor de la transducción de energía, y a altas concentraciones desacopla la fotofosforilación.

Por otra parte, CF₁ se aisló de la membrana tilacoidal, y se ensayó el efecto del lupenol en los CF₁ aislados, midiéndose la actividad de la ATPasa dependiente de Ca²⁺ y activada con calor. Los datos muestran que el lupenol no inhibe esta actividad dependiente de calcio al contrario la aumenta (Tabla 8). Por tanto estos resultados sugieren que la inhibición se encuentra en la H⁺-ATPasa dependiente de Mg²⁺ a bajas concentraciones. Por lo que se corrobora que el lupenol se comporta como inhibidor de la transducción de energía.

Tabla 8. Efecto del Lup-20(29)-en-3β-ol sobre los CF₁ aislados de cloroplastos y activados con luz (Mg²⁺ ATPasa) y calor (Ca²⁺).

Lup-20(29)-en-3β-ol [μM]	Mg²⁺- ATPasa (%)	Ca²⁺- ATPasa (%)
Control	100	100
100	65	182
200	86	178.3
300	98	178.8

5.9. Análisis cromatográfico del extracto CHCl₃ de tallos de *Xylosma flexuosa*

De la fracción F7 eluida con sistema 70:30, precipitó espontáneamente un sólido amarillo que presentó actividad en la síntesis de ATP con un valor de I₅₀ = 44.5, el cual estuvo constituido por una mezcla de hidrocarburos y ácidos grasos de acuerdo a la interpretación de los resultados de los experimentos espectroscópicos como a continuación se detalla (Tabla 9).

El cromatograma en capa fina de gel de sílice mostró una mancha homogénea no visible al UV pero que revelo al aplicarle sulfato cérico amónico. El espectro en el IR (Espectro 7) del mencionado sólido mostró señales para grupos hidroxilo en 3438 cm^{-1} y gran cantidad de señales de metilos, metilenos y metinos ($2955\text{-}1376\text{ cm}^{-1}$). Un grupo carbonilo de ácido fue evidente por la absorción en 1733 cm^{-1} en combinación con los grupos hidróxilo presentes en el espectro. La combinación de grupos hidróxilo se observo en las absorciones para la vibración C-O en 1205 , 1190 y 1178 cm^{-1} y la presencia en el compuesto de grupos $\text{-CH}_2\text{-}$ en un arreglo superior a 4 átomos de carbono lineales por las absorciones en 729 y 719 cm^{-1} (Tabla 9).

En el espectro de RMN de hidrógeno (Espectro 8) se observaron señales para grupos metileno terminales base de hidróxilos en una cadena hidrocarbonada (4.05 , triplete), en 2.28 ppm la señal triplete se asignó a grupos metileno vecinos a grupos carbonilo; en 1.61 ppm, se observó una señal multiplete que junto con la señal intensa en 1.25 ppm como singulete ancho, se asignó a gran cantidad de grupos metileno en una cadena hidrocarbonada y finalmente en 0.88 ppm (tabla 9) se observo un triplete un poco deforme asignado a grupos metilo terminales de una o varias cadenas hidrocarbonadas probablemente pertenecientes a hidrocarburos y ácidos grasos en mezcla. Sin embargo, el cromatograma de gases correspondiente (Figura 13 y Espectro 9) mostró una mezcla de por lo menos ocho componentes los cuales de acuerdo a la fragmentación de cada uno de éstos, por la pérdida consecutiva de 14 unidades de masa correspondieron a los hidrocarburos y ácidos grasos aparentes en los espectros en el IR y de RMN (Espectros 7 y 8).

Al resto de las fracciones no se les midió el efecto en la síntesis de ATP, debido a que la cantidad de muestra fue insuficiente para llevar a cabo el experimento. En cuanto a la fracción 3, que presentó el doble de actividad que la fracción 7, los espectros de IR, Masas y RMN ^1H mostraron una mezcla muy compleja de ácidos grasos más un triterpeno (datos y espectros no mostrados), por lo que se sugiere buscar otra técnica como cromatografía de líquidos para su

RESULTADOS

separación y hacer un batch de la fracción pues la cantidad de muestra también fue insuficiente para otros experimentos.

Tabla 9. Análisis espectroscópico de la fracción 7 del extracto CHCl_3 de tallos de *X. flexuosa*.

IR, $\nu_{\text{máx}}$ (pastilla), cm^{-1} (Espectro 7)	3438, 2955, 2917, 2848, 1733, 1472, 1462, 1376, 1205, 1190, 1178, 729, 719.
RMN- ^1H , (CDCl_3 , 300 MHz) (Espectro 8)	4.05 (t, $J= 6.6$ Hz), 2.28 (t, $J= 7.8$ Hz), 1.61 (m), 1.25 (sa), 0.88.

6. CONCLUSIONES

1. Los extractos clorofórmico y hexánico de tallos son selectivos para inhibir la germinación y el crecimiento de las plántulas monocotiledóneas. Además de los ensayos *in vitro*, se puede decir que estos extractos tienen actividad alelopática al disminuir las curvas de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* junto con los de biomasa seca. Se sugiere que estos extractos son potenciales para actividad herbicida.

2. Por medio del fraccionamiento biodirigido se aisló del extracto hexánico de tallos por primera vez, el compuesto Lup 20 (29)-en-3 β -ol (lupenol).

3. Del extracto clorofórmico de tallos se aisló una mezcla compleja de hidrocarburos y ácidos grasos.

4. El compuesto Lup 20 (29)-en-3 β -ol (lupenol) mostró actividad inhibitoria en la fotosíntesis comportándose como inhibidor de la transducción de energía a nivel de CF₁ a baja concentración (100 μ M).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (1989). *Molecular Biology of the Cell*, 2nd. edition, Garland Publishing, Inc., USA: pp. 366-380; 736-740.
- Atta-ur R. (1994). Handbook of Natural Products. Pentacyclic triterpenoids. Holanda, pp. 1038-1040.
- Barber, J. (1998). Photosystem two. *Biochimica et Biophysica Acta* 1365, pp. 269-277.
- Black M. and Bewley J. D. (1994). Seeds: Germination, Structure, and Composition. In: SEEDS. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York, pp. 1-30.
- Bolhár-Nordenkamp HR and Öquist G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall DO, Scurlock JMO (eds) Photosynthesis and production in a Changing Environment. A Field and laboratory Manual. Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC and Long RC SP. Chapman and Hall, London, UK pp 193-205.
- Bye R., Linares E., Estrada, E., (1995). *Phytochemistry of medicinal plants. Recent advances in phytochemistry*. Plenum Press, Nueva York. pp. 65-82.
- Calderón-Rzedowski, G., (1996). FLACOURTACEAE. Flora del Bajío y regiones adyacentes. Fasc. 41. Instituto de Ecología A.C., pp. 10-13.
- Calera MR, Soto F, Sánchez P, Bye R, Hernández B, Anaya AI, Lotina-Hennsen and Mata R (1995) Biochemical active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. *Pytochemystry* 40:419-425
- Corbett, J. (1984). Herbicides interfering with photosynthesis. *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. 2nd. edition, Academic Press, London, pp.50-98.

- Chapman & Hall (1992) Dictionary of terpenoids di-and higher terpenoids. Vol. 2, Great Britain, pp 1260-1261.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*, 2nd. edition, Scientific American Books, USA; pp. 617-638; 726-737.
- Dilley, R. (1972) Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena) *Methods of Enzymology*, San Prieto, A., Ed. Academic Press: New York, 1972; Vol.24 pp. 68-74
- Gibbons, S.; Gray, A.I. Waterman, P.G. Hockless, D.C.R. Skelton, B.W. White, A.H. (1995) Benzoylated derivatives of 2-beta-glucopyranosyloxy-2,5-dihydroxybenzyl alcohol from *Xylosma flexuosum*: structure and relative configuration of xylosmin. *J. Nat. Prod.* 58: 554-559.
- Good NE, Izawa S and Hind G (1981) Uncoupling and energy transfer inhibition in Photophosphorylation. In: Sanadi DR (ed) *Current Topics in Bioenergetics* vol 1 Academic Press, New York pp. 75-112.
- Gutiérrez, A. J. (1986). Contribuciones al estudio del género *Xylosma* Forster en Cuba. *Jardín Bot. NAC. Univ. Habana, Cuba.*
- Hipkins MF and Baker NR (1986) *Photosynthesis transduction a practical approach* IRL Press Oxford Washington.
- Hodges, Lynn (2003). Antiprotease effect of anti-inflammatory lupeol esters. *Mol Cell Biochem* 252: 97-101.
- Izawa S, Krayenhof R, Ruuge EK (1973). The site of KCN inhibition in the photosynthetic electron transport pathway. *Biochem Biophys Acta* 314:328-339.
- Justum A., Heaney S., Perrin B., Wege P., (1997). Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. *Pesticide Science* 54, 453-446.
- Kogan MA, Pérez AJ (2003) *Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción.* Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile pp. 22-31.

- Lotina-Hennsen B., Albores Velasco M., García Chávez L., (1989). Herbicidas y productividad agrícola. *Revista de la Sociedad Química de México*, Vol. 33 No.3., pp. 109-110.
- Maldonado Rodríguez. Biolyzer program. 2000.
<http://unige.ch/science/biology/bionen>
- Mata R., Pereda-Miranda R., Lotina-Hennsen B., (1996). Natural products from Mexican plants as a source of potential herbicide agents. Secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry and biological properties, pp. 59-68.
- Martínez M. (1969). *Las plantas medicinales de México*. Ediciones botas. México, D.F. pp. 255-256.
- Martínez, M. (1979) *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México, D.F. p.122.
- Mills J. D. (1980). Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* 112, 173-177.
- Morales FF, Agilar MI, King DB, Ricardo de Santiago GJ and Lotina HB. (2007). Natural diterpens from *Croton ciliaglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. *Photosynth Res.*91:71-80
- Morales F., Fonseca R.M y Diego P., (2002). Flora de Guerrero Facultad de Ciencias, UNAM. *Revista de la Sociedad Química de México*, numero 9. pp. 109 – 110.
- Moreland, D. (1980). Mechanisms of action of herbicides. *Annual review of Plant Physiology* 31, 597-638.
- Rojas Tomé Irma S., (2002). Metabolitos fitotóxicos de *Parmotrema tinclorum*. y *Leucophyllum ambiguum* HUMB. & BONPL como una fuente potencial de compuestos herbicidas con un efecto sobre la fotosíntesis y la proteína clamodulina. Tesis Doctorado. UNAM. México, D.F., p. 15-17.

- Saha S, Ouitrakukl R, Isawa S, and Good N (1971) Electron transport and phosphorylation in chloroplast as function of the electron acceptor. *J Biol Chem* 246:3204-3209.
- Saleem, Mohammad et al. (2004). Lupeol modulates NF-kappaB and P13/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice *Oncogene* 23:5203-14.
- Strasser RJ, Srivastava A and Govindjee (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cianobacterie. *Photochem Photobiol* 66:32-45.
- Stryer, L. (1995). Bioquímica. Vol. 2, 4ª. Edición, Ed. Reverté, S.A., Barcelona, España; pp. 653-671.
- Sultana, Sarwat (2003). Lupeol, a triterpene prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin. *Indian J Exp Biol* 41: 827-31.
- Sumner J. B. (1944). Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100 413-415.
- <http://www.inbio.eas.ualberta>.

8. APÉNDICE

8.1 Medios

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

• Medio de aislamiento de cloroplastos

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

*Ajustar el pH a 8.0 con KOH

• Medio bomba

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

- **Medio de transporte de electrones**

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- **Medio de transporte de electrones sin MV**

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- **Medio de aislamiento para ATPasa**

Compuesto	Concentración (mM)	Para 1 L (g/L)
Sorbitol	0.35	63.77
Ácido ascorbico	5	0.8805
MES	20	3.90

Ajustar el pH a 6.5 con KOH

- **Medio de resuspensión para ATPasa**

Compuesto	Concentración (mM)	Para 0.5 L (g/L)
Sorbitol	0.35	3.189
EDTA	2	0.0372
MgCl ₂ .6H ₂ O	1	0.010165
MnCl ₂ .4H ₂ O	1	0.0989
HEPES	50	0.59575

Ajustar el pH a 7.6 con KOH

- **Medio de hidrólisis de ATP**

Compuesto	Concentración (mM)	Para 0.1 L (g/L)
KCl	50	0.372785
MgCl ₂ .6H ₂ O	2	0.04066
HEPES	15	0.3570
ATP	2.2	0.06062

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- **Preparación de Sulfato cérico amoniacal**

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

Colocar el hielo en un vaso de precipitados dentro de un baño de hielo; a continuación agregar con cuidado el ácido, y posteriormente el sulfato cérico

amoniacal. Agitar con una varilla de vidrio hasta su completa disolución (en caso de no disolverse por completo debe filtrarse).

- **Medio de activación I**

Compuesto	Concentración (mM)	Para 0.1 L (g/L)
Sorbitol	1.2	21.864
HEPES	100	2.383
Tricina	100	0.896

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- **Medio de activación II**

Compuesto	Concentración (mM)	Para 0.1 L (g/L)
MgCl ₂ .6H ₂ O	5	0.1016
HEPES	15	0.35745

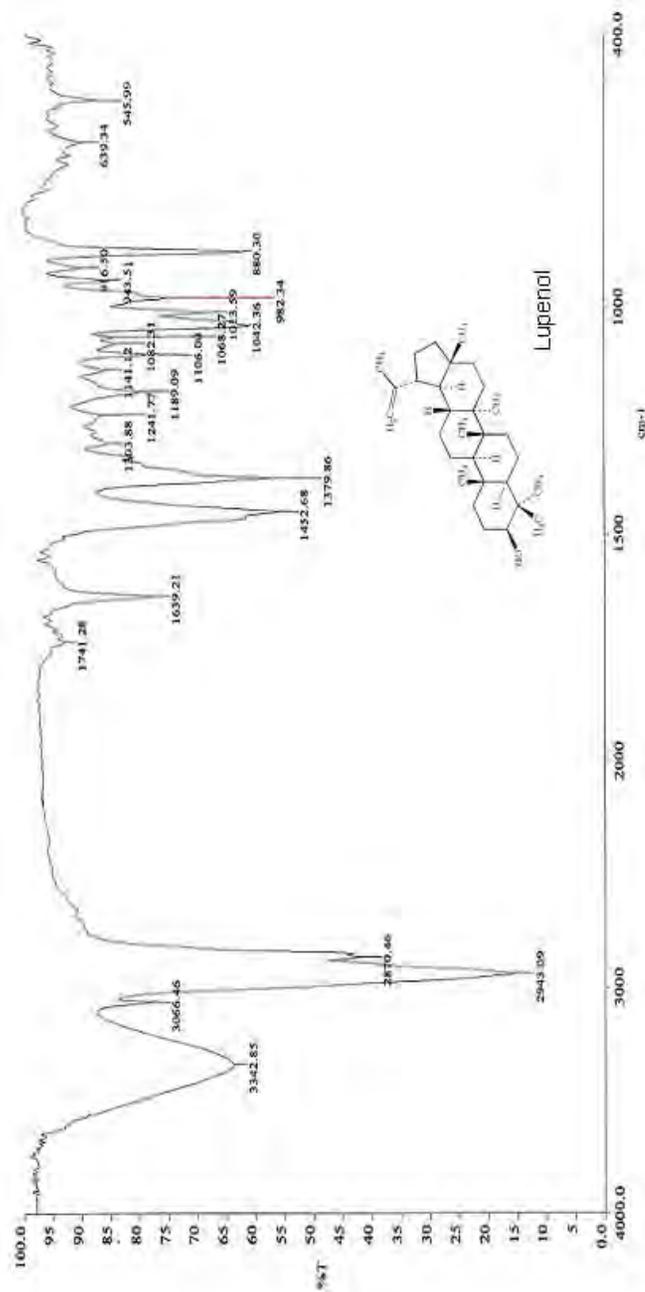
Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- **Medio de hidrólisis de ATP**

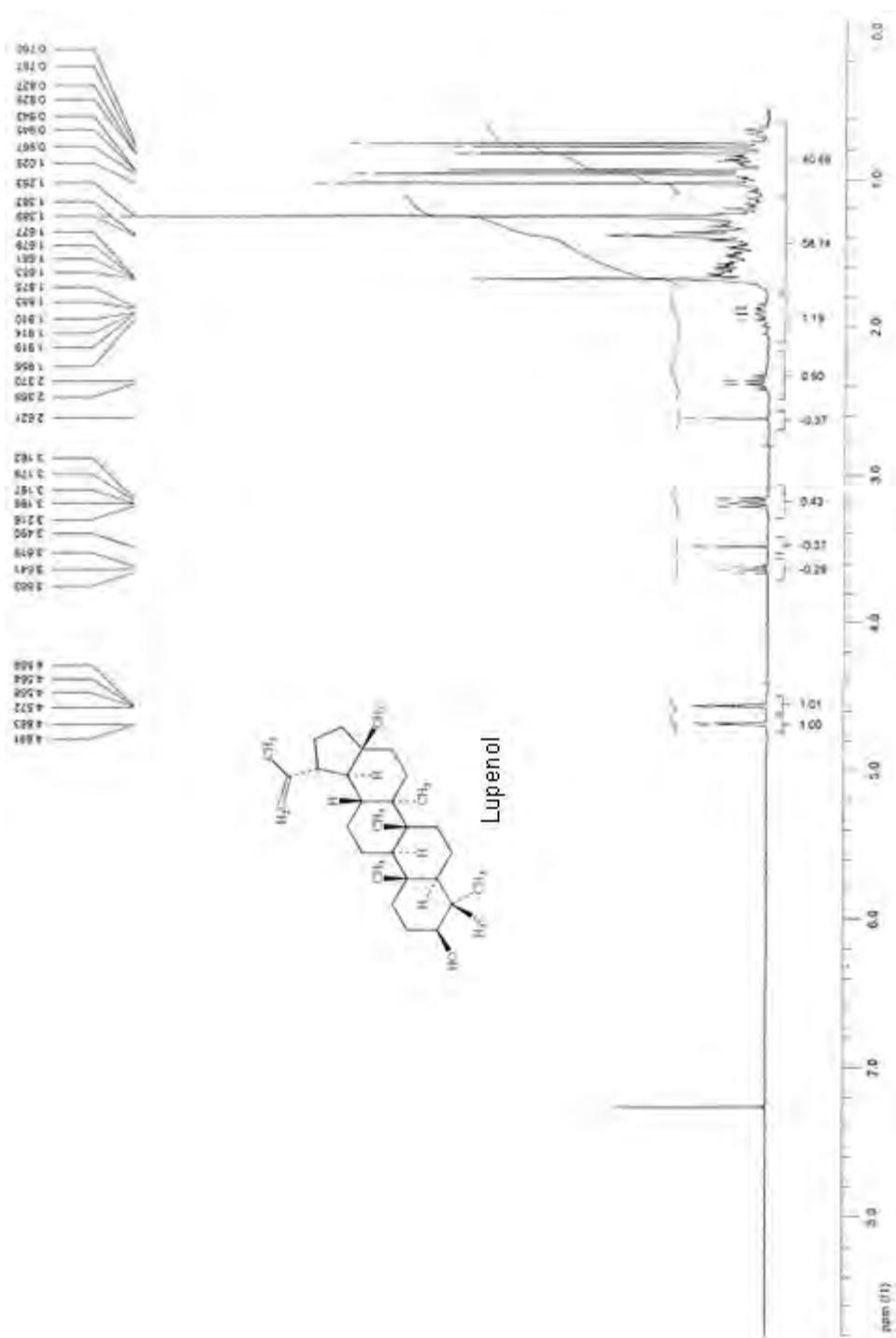
Compuesto	Concentración (mM)	Para 0.1 L (g/L)
KCl	50	0.372785
MgCl ₂ .6H ₂ O	2	0.04066
HEPES	15	0.3570
ATP	2.2	0.06062

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

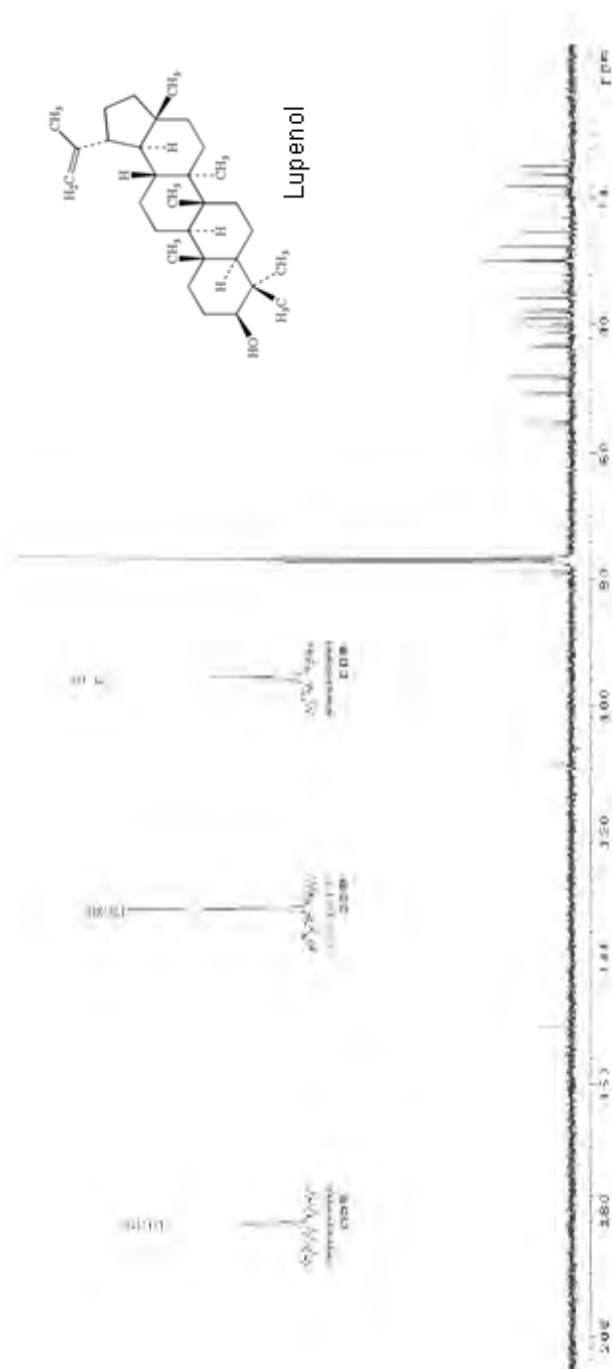
8.2 ESPECTROS



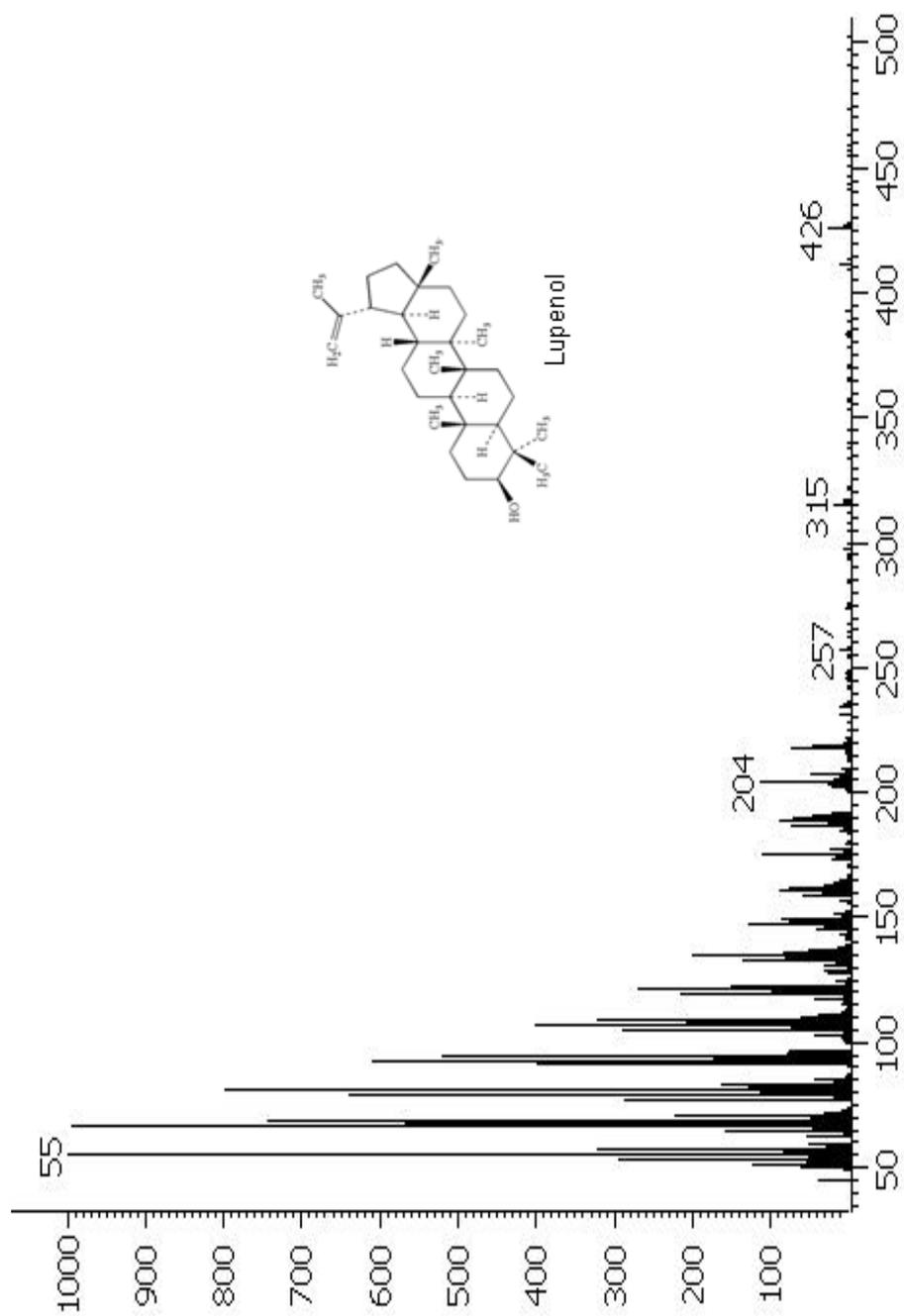
Espectro 1. Espectro Infrarrojo del compuesto Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupenol) (CDCl₃, 300 MHz)



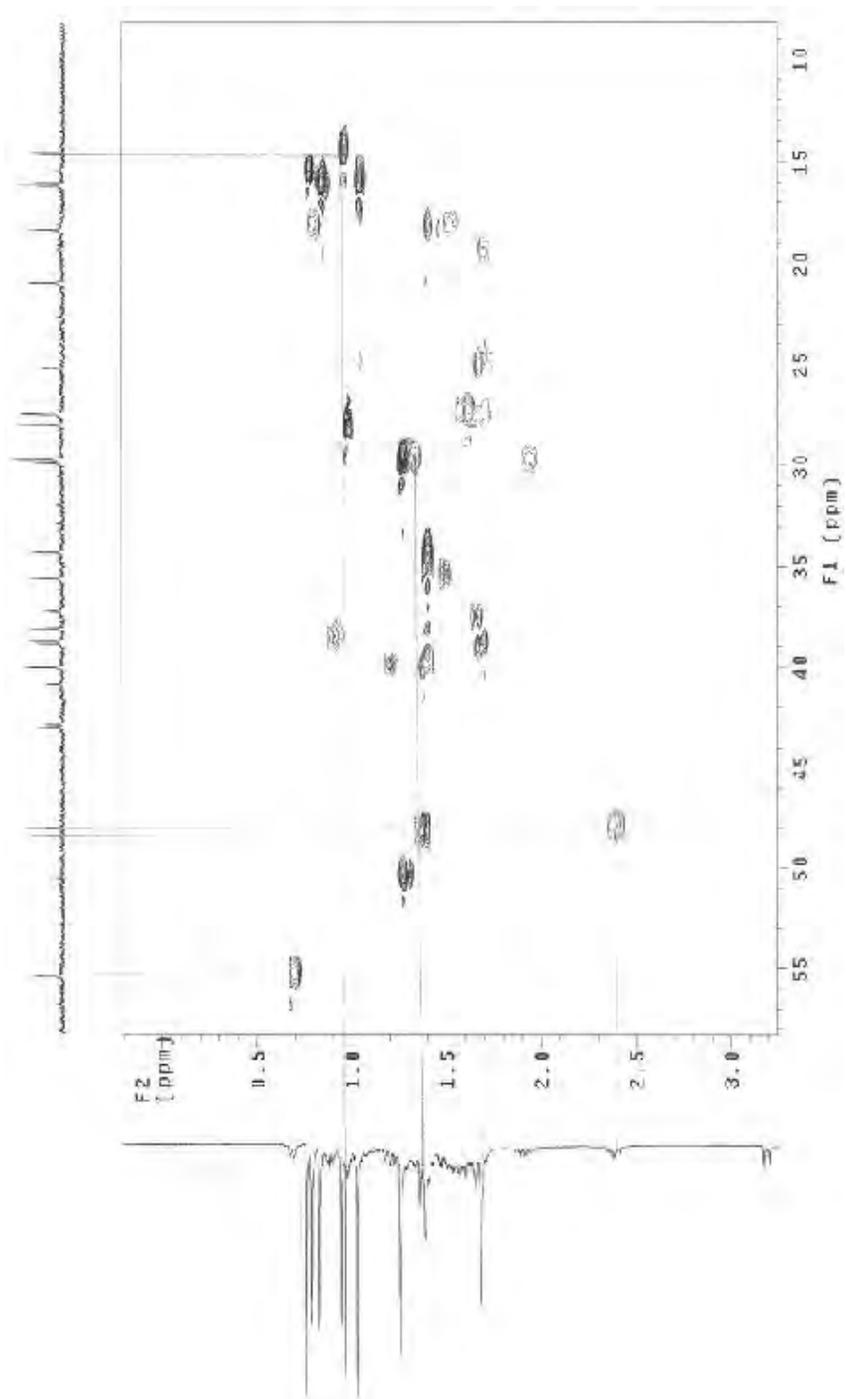
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H del compuesto Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupenol) (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro 3. Espectro de RMN ¹³C del compuesto Lup-20(29)-en-3β-ol (lupenol) (CDCl₃, 300 MHz)



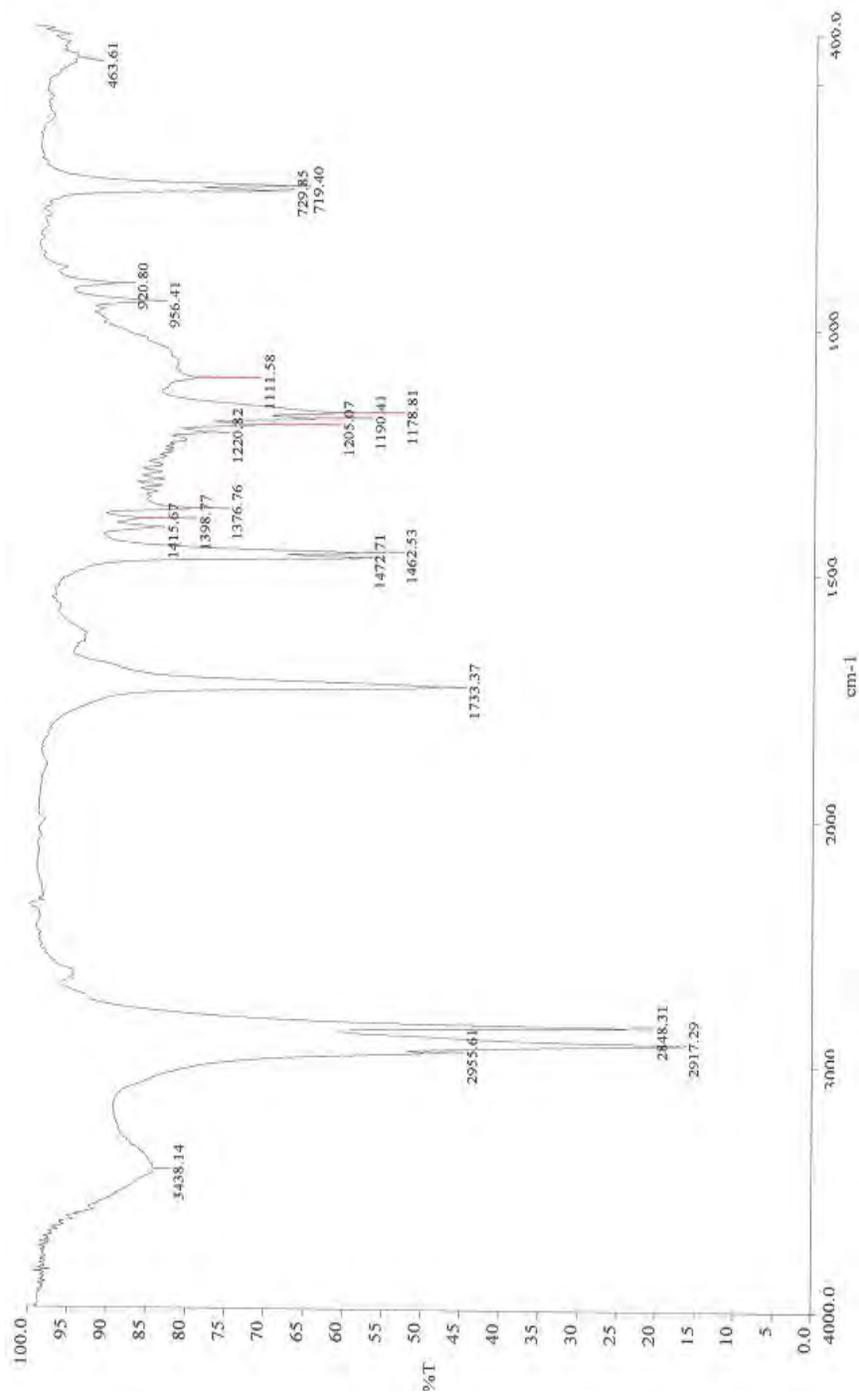
Espectro 4. Espectro de masas del compuesto Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupenol) (CDCl₃, 300 MHz)



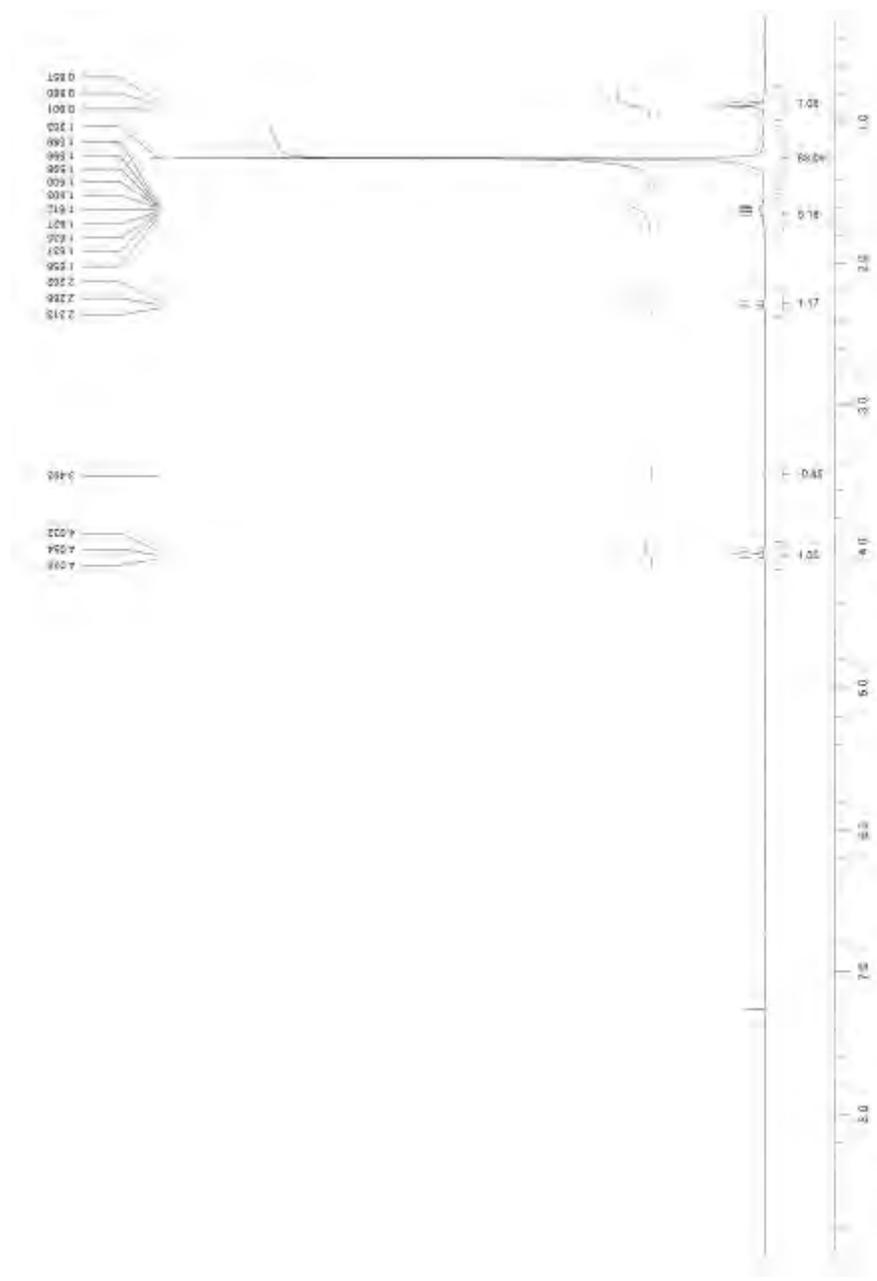
Espectro 5. Espectro de HSQC del compuesto Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupenol) (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro 6. Espectro de COSY del compuesto Lup-20(29)-en-3β-ol (lupenol) (CDCl₃, 300 MHz)



Espectro 7. Espectro de IR de la mezcla de la fracción 7(CDCl₃, 300 MHz)



Espectro 8. Espectro de RMN^1H de la fracción 7 (CDCl_3 , 300 MHz)

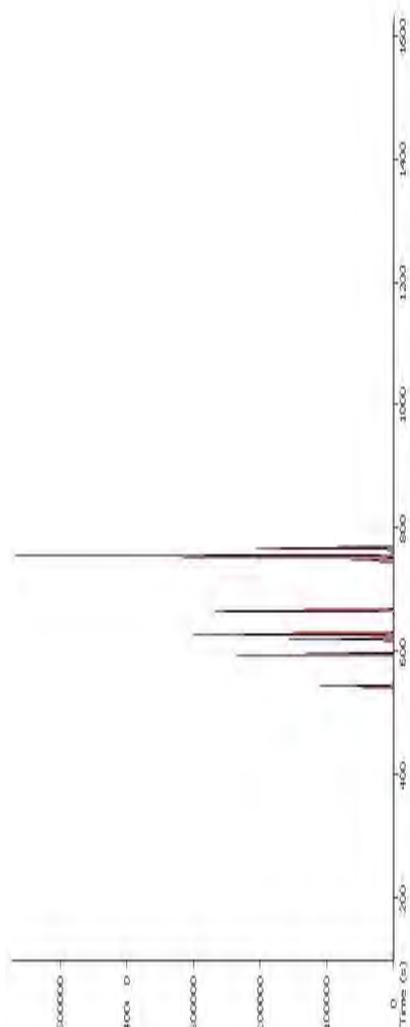
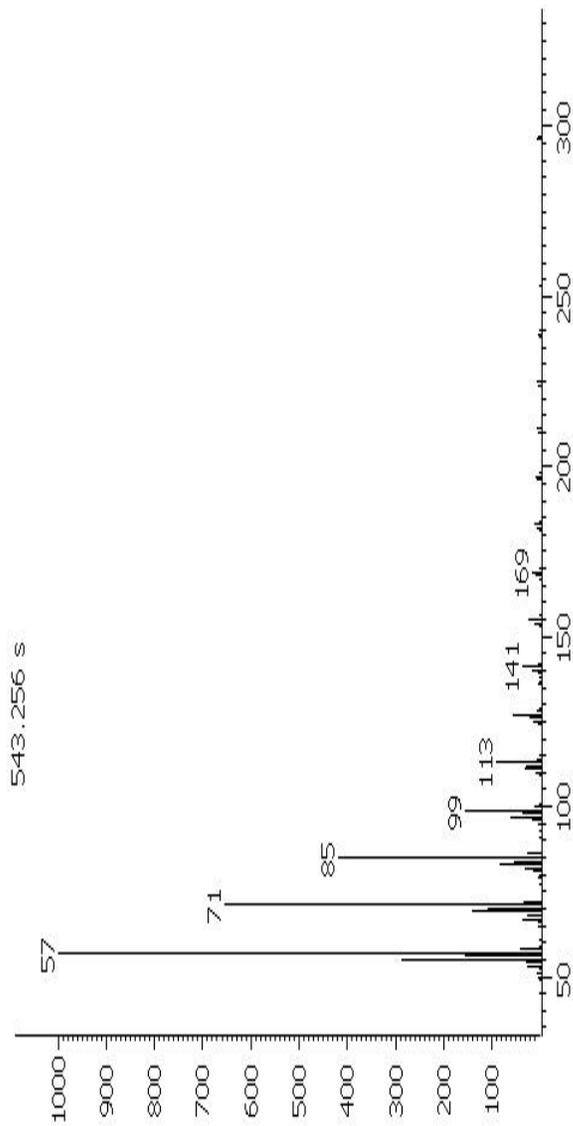
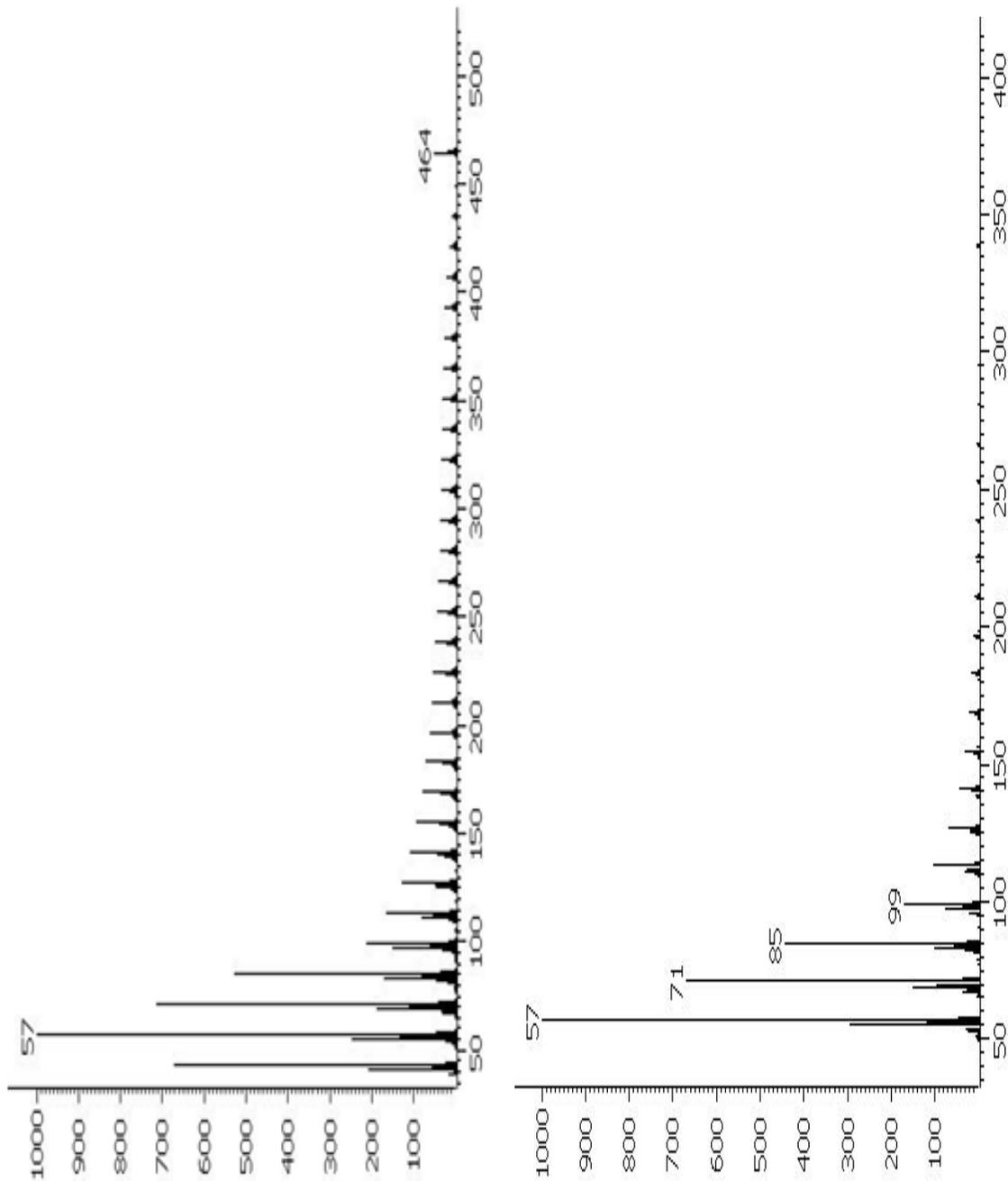


Figura 13. Cromatograma de gases de la fracción 7(CDCl₃, 300 MHz)

=



Espectro 9. Espectros de masas de los componentes de la fracción 7(CDCl₃, 300 MHz)



Espectro 9 . Espectros de masas de los componentes de la fracción 7 (CDCl₃, 300 MHz)