



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA *Bouvardia ternifolia* SCHLTDL EN LA  
BÚSQUEDA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON POSIBLE ACTIVIDAD  
HERBICIDA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

VIANEY CRUZ FAUSTO



MÉXICO, CDMX.

2017



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:* GAVILANES RUIZ MARINA  
Vocal        *Prof:* KING DIAZ BEATRIZ  
Secretario    *Prof:* RIVERO CRUZ ISABEL DEL CARMEN  
1er Suplente *Prof:* FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA  
2° Suplente    *Prof:* AGUILAR LAURENTS MARIA ISABEL

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:

---

M. en C. Beatriz King Díaz

Supervisor Técnico:

---

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Sustentante:

---

Vianey Cruz Fausto

## LISTA DE ABREVIATURAS

$A_{663}$	Absorbancia a la longitud de onda de 663 nm
$A_{645}$	Absorbancia a la longitud de onda de 645 nm
ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPasa	ATPsintasa
$b_6/f$	Complejo citocromo
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
Chl	Clorofila
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetros
DCBQ	2,6-diclorobenzoquinona
DMCU	3-(3,4-diclorofenil)-1, 1-dimetil urea
DMSO	Dimetilsulfòxido
ECH	Extracto de cloroformo de hojas
ECT	Extracto de cloroformo de tallos
EHH	Extracto de hexano de hojas
EHT	Extracto de hexano de tallos
EMH	Extracto de metanol de hojas
EMT	Extracto de metanol de tallos
F	Fluorescencia
FS I	Fotosistema I
FS II	Fotosistema II
$\lambda$	Longitud de onda
mm	Milímetro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre nivel del mar

MV	Metil viológeno
$\mu\text{L}$	Micromolar
PC	Plastocianina
Pi	Fosfato inorgánico
ppm	Partes por millón
P <sub>680</sub>	Centro de reacción del PSII
P <sub>700</sub>	Centro de reacción del PSI
Q <sub>A</sub>	Aceptor primario de electrones del PSII
Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>	Aceptor primario de electrones reducido del PSII
Q <sub>B</sub>	Aceptor secundario de electrones de PSII
Q <sub>B</sub> <sup>-</sup>	Aceptor secundario de electrones reducido de PSII
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
rpm	Revolución por minuto
SiMo	Silicomolibdato de sodio
YSI	Yellow Spring Instruments
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Generalidades de la planta <i>Bouvardia ternifolia</i> Schltl .....	10
2.1.1 Taxonomía.....	10
2.1.2 Distribución.....	11
2.1.3 Hábitat.....	11
2.2 Metabolitos secundarios.....	11
2.3 Malezas.....	11
2.4 Herbicidas.....	12
2.4.1 Clasificación de herbicidas.....	12
2.4.1.1 Método de aplicación.....	12
2.4.1.2 Selectividad.....	12
2.4.1.3 Mecanismo de acción.....	12
2.5 Fotosíntesis.....	13
2.5.1 Fotosistema II.....	15
2.5.2 Fotosistema I.....	16
2.5.3 Complejo citocromo <i>b6/f</i> .....	17
2.6 Germinación.....	17
2.7 Asperulósido.....	18
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	21
5.1 Material vegetal.....	21
5.2 Preparación de los extractos para las pruebas de cernimiento.....	21
5.3 Ensayos de germinación <i>in vitro</i> de <i>Lolium perenne</i> y <i>Lactuca</i>	

<i>sativa</i> .....	21
5.4 Aislamiento de cloroplastos.....	23
5.5 Medición del efecto del transporte de electrones fotosintético.....	24
5.6 Medición del transporte de electrones de los Fotosistema II y I y sus reacciones parciales de la fotosíntesis.....	24
5.7 Fraccionamiento del extracto de metanol de hojas por columna abierta .....	25
5.8 Fraccionamiento secundario de la fracción F-13.....	25
5.9 Medición de la síntesis de ATP.....	25
5.10 Obtención de los valores de $I_{50}$ .....	26
5.11 Identificación química de los compuestos aislados .....	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1 Rendimientos de los extractos.....	28
6.2 Efecto de los extractos en el ensayo de cernimiento de germinación .....	28
6.3 Efecto de los extractos en el ensayo de cernimiento de transporte de electrones no-cíclico en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado).....	32
6.4 Fraccionamiento del extracto de metanol de hojas.....	34
6.5 Efecto de las fracciones secundarias en los ensayos de cernimiento.....	37
6.5.1. Efecto de las fracciones secundarias en los ensayos de germinación.....	37
6.5.2. Efecto de las fracciones secundarias en la síntesis de ATP y el transporte de electrones fotosintético de cloroplastos aislados de espinaca.....	39
6.6 Caracterización del asperulósido.....	41
7. CONCLUSIONES.....	42
8. PERSPECTIVAS.....	43
9. REFERENCIAS.....	44
10. APÉNDICE.....	48

10.1 Medios.....	48
10.1.1 Medio de aislamiento de cloroplastos.....	48
10.1.2 Medio bomba.....	48
10.1.3 Medio de transporte de electrones.....	49
10.1.4 Medio de transporte de electrones sin MV.....	49
10.1.5 Preparación del sulfato cérico amoniacal.....	49
10.1.6 Medio de transporte de electrones para Fotosistema II.....	49
10.1.7 Medio de transporte de electrones para Fotosistema I.....	50
10.2 Espectros .....	51



## RESUMEN

Para la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida que sean menos tóxicos para el ambiente y más biodegradables que los herbicidas sintéticos, en este trabajo se colectó en Ciudad Universitaria en mayo del 2012, la planta *Bouvardia ternifolia Schltl.* Se sabe que esta planta tiene aplicaciones medicinales para tratar mordeduras de víboras, picadura de abejas, alacranes, arañas, ciempiés y hormigas, por lo que puede contener metabolitos con actividad biológica. El fraccionamiento-biodirigido, del extracto de metanol de las hojas de esta planta, permitió el aislamiento del compuesto asperlúsido, cuyo efecto se ensayó en la germinación y crecimiento de dos plántulas, una dicotiledónea (*Lactuca sativa*) y otra monocotiledónea (*Lolium perenne*). El asperlúsido inhibió la germinación de ambas semillas en 40 y 50% respectivamente a la concentración 100 µg/mL y también la elongación de las raíces de *L. sativa* en 50% aproximadamente a esta misma concentración. Al medir los efectos del asperlúsido en el transporte de electrones fotosintético de cloroplastos aislados de hojas de espinaca, se observó que el compuesto inhibió el flujo de electrones en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado), comportándose como un inhibidor de la reacción de Hill.

Estos resultados nos sugieren que Asperlúsido puede ser un buen candidato como herbicida natural, al presentar dos mecanismos de acción diferentes, uno en la germinación y otro en las reacciones redox de la fotosíntesis, es decir, puede presentar actividad pre y pos-emergente.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las malezas constituyen la causa principal la pérdida de la producción agrícola en todo el mundo y la producción agrícola depende en gran parte del manejo de la eliminación de estas plantas invasivas (Neve P *et al.*, 2009). Antes del uso de los herbicidas, las malezas se eliminaban manualmente, también se empleaban técnicas como el sistema de barbecho (sistema en el cual la tierra no se siembra por un periodo para poder recuperar la materia orgánica y la humedad) y la rotación de cultivos (Morales, 2007). Desde el descubrimiento del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la década de los 40' s, el control químico ha sido el método más efectivo para la eliminación de las malezas (herbicidas).

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 (Justum *et al.*, 1997). El uso indiscriminado de los herbicidas ha permitido el desarrollo de biotipos resistentes a las malezas y este problema ha empeorado con el uso de herbicidas de un amplio espectro (Beckie, 2011). La búsqueda de herbicidas naturales se encuentra plenamente justificada, ya que estos compuestos usualmente son menos tóxico y más benignos con el medio ambiente además de ofrecer un gran potencial para el descubrimiento de nuevas moléculas con novedosos sitios de acción herbicida (Duke *et al.*, 2002).

El uso de los productos naturales fitotóxicos como un modelo para el desarrollo de nuevas moléculas activas ha sido considerado como una estrategia prometedora en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas (Dayan *et al.*, 2009), (Cantrell *et al.*, 2012). Ejemplos de esta búsqueda son los herbicidas comerciales cinmetilina y mesotriona, los cuales son derivados de metabolitos fitotóxicos de plantas (Hüter, 2011), (Mitchell *et al.*, 2001)

En este trabajo, en la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida, la planta *Bouvardia ternifolia Schltl* fue colectada en Ciudad

Universitaria en mayo del 2012. A esta planta se le atribuyen propiedades curativas y su principal aplicación medicinal es para tratar mordeduras de víboras, picadura de abejas, alacranes, arañas, ciempiés y hormigas (Argueta-Villamar *et al.*, 1994). De las partes aéreas (hojas y tallos) de la planta, se obtuvieron seis extractos orgánicos (hexano, cloroformo y metanol). El efecto de los extractos fue ensayado sobre la germinación de semillas y en el crecimiento de plántulas de *Lactuca sativa* y *Lolium perenne*, así como en el transporte de electrones fotosintético de cloroplastos aislados de hojas de espinaca, con el fin de saber si los extractos podían tener una actividad inhibitoria.

Todos los extractos mostraron una actividad inhibitoria en la germinación de las dos semillas ensayadas, siendo más activos los extractos de cloroformo y metanol tanto de hojas como de tallos. En la cadena transportadora de electrones en la fotosíntesis, el extracto más activo como inhibidor de esta actividad fue el extracto de hexano de hojas que se obtuvo un rendimiento de 1.65%. Debido a esto se seleccionó el extracto de metanol de hojas el cual se obtuvo en un mayor rendimiento (47.84%) para su fraccionamiento, cabe señalar que este extracto también presentó actividad inhibitoria sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa*. Así por fraccionamiento biodirigido de este extracto, por primera vez se aisló el compuesto asperlúsido, un iridoide glucósido.

El asperlúsido es un compuesto natural que presenta varias actividades biológicas, en la medicina herbolaria tradicional china se han investigado sus efectos protectores y efectos inflamatorios en células cancerígenas del pulmón (Qiu *et al.*, 2016). Hasta el momento, no se conocía su actividad como posible herbicida, por lo que se ensayó sobre la germinación de las semillas de *L. perenne* y *L. sativa*. Asperlúsido inhibió la germinación de *L. perenne* en un 50% a la concentración de 100 µg/mL e inhibió la germinación (40%) y la elongación de las raíces en un 50% aproximadamente de *L. sativa* a esta misma concentración. Por otra parte, este compuesto inhibió el transporte de electrones fotosintético en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado) en un 70% aproximadamente a la concentración de 100 µg/mL, comportándose como un inhibidor de la reacción de Hill.

Estos resultados nos sugieren que Asperlúsido puede ser un buen candidato como herbicida natural, al presentar dos mecanismos de acción diferentes, uno en la germinación y otro en las reacciones redox de la fotosíntesis, es decir presenta actividad pre y pos-emergente.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de la planta *Bouvardia ternifolia* Schtdl.

*Bouvardia ternifolia* Schtdl. Es un arbusto o hierba perenne de hasta de 1.5 m de altura; pertenece a la familia de las Rubiaceae, se le atribuyen propiedades curativas contra la disentería y la rabia (Cárdenas *et al.*, 2001). Su principal aplicación medicinal es para tratar mordeduras de víboras, picadura de abejas, alacranes, arañas, ciempiés y hormigas (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

#### 2.1.1 Taxonomía

Reino: *Plantae*

Subreino: *Traqueobionta* (plantas vasculares)

Superdivisión: *Spermatophyta* (plantas con semillas)

División: *Magnoliophyta* (plantas con flor)

Clase: *Magnoliopsida* (dicotiledóneas)

Familia: *Rubiaceae*

Género: *Bouvardia*

Especie: *Bouvardia ternifolia*



Figura 1. *Bouvardia ternifolia*

(<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/bouvardia-ternifolia.htm>)

### 2.1.2 Distribución

Especie originaria de los trópicos americanos; crece en Estados Unidos desde el sureste de Texas, Nuevo México y el sureste de Arizona, en México desde Chihuahua, Coahuila, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998).

### 2.1.3 Hábitat

Prospera preferentemente en bosques, matorrales y pastizales, tanto en hábitats desérticos y montañosos, de los 800 a 3000 msnm (Villaseñor y Espinosa, 1998).

## 2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que los organismos producen a través de diversas rutas biosintéticas, no son vitales para la supervivencia del organismo que los posee, sin embargo juegan un papel importante en su defensa, competencia y adecuación. Así, el metabolito secundario surge de la necesidad intrínseca de los organismos para responder a las exigencias del medio ambiente (Hartmann, 2007).

## 2.3 Malezas

Las malezas constituyen riesgos naturales dentro de los intereses y las actividades del hombre (Mortimer, 1990). Estas plantas son frecuentemente descritas como dañinas a los sistemas de producción de cultivos y también a los procesos industriales y comerciales. Las malezas son especies vegetales que afectan el potencial productivo de la superficie ocupada o el volumen de agua manejado por el hombre. Este daño puede ser medido como pérdida del rendimiento agrícola por unidad de área cultivable o también como la afectación de la productividad de una empresa comercial.

Las malezas pueden considerarse a todas aquellas plantas que provocan cambios desfavorables en la vegetación y que afectan el aspecto estético de las áreas a preservar.

El mayor conocimiento del daño de las malezas proviene de las evaluaciones de las pérdidas de cosechas agrícolas. De manera general, se acepta que las malezas ocasionan una pérdida directa aproximada del 10% de la producción agrícola. En cereales, esta pérdida es del orden de más de 150 millones de toneladas. Sin embargo, tales pérdidas no son iguales en los distintos países, regiones del mundo y cultivos afectados (Labrada *et al.*, 1996).

## 2.4 Herbicidas

La palabra herbicida proviene del latín *herba*, planta, y *caedere*, que significa matar. 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 (Hartmann, 2007).

### 2.4.1 Clasificación de herbicidas

Los herbicidas se pueden clasificar de acuerdo a:

#### 2.4.1.1 Método de aplicación

- Pre-plantación: es aplicado en el suelo antes de la plantación del cultivo.
- Herbicidas pre-emergentes: Comprenden todos los herbicidas que son aplicados después de la siembra y antes de la emergencia del cultivo o de las malezas. Se recomienda efectuar la aplicación cuando el suelo está ligeramente húmedo.
- Emergencia: El herbicida se asperja cuando se encuentran brotando las plántulas del suelo.
- Herbicidas pos-emergentes: Corresponden a aquellos herbicidas aplicados a partir de la emergencia del cultivo o de las malezas. Su aplicación debe realizarse únicamente en la época recomendada para no causar daño al cultivo (Labrada *et al.*, 1996).

#### 2.4.1.2 Selectividad

- Selectivos: Al aplicarse solo dañan a cierto tipo de malezas sin causar algún efecto significativo a las demás especies que se pueden encontrar cercanas a ellas (Macías, 2012).
- No selectivos: Dañan cualquier tipo de maleza por lo tanto deben ser utilizados con precaución, porque pueden terminar con el cultivo deseado (Caseley, 1996; Macías, 2012).

#### 2.4.1.3 Mecanismo de acción

- Inhibidores de enzimas como: la enzima acetolactato sintasa (ALS), una enzima que participa en la biosíntesis de leucina e isoleucina; inhibidores de la enzima glutamina sintasa (GS), cuya función es fijar nitrógeno inorgánico para la síntesis de aminoácidos, Inhibidores de la enzima acetyl coenzima A carboxilasa (ACCase), el herbicida clodinafop inhibe esta enzima en especies monocotiledóneas (Duke, 1990).

- Inhibición de la biosíntesis de aminoácidos: Su sitio de acción se enfoca en las enzimas que participan en la biosíntesis de aminoácidos, como son la 5-enopiruvil-siquimato-3-fosfato sintasa. Esta enzima está involucrada en la síntesis de aminoácidos como la fenilalanina (Duke, 1990).

Auxinas sintéticas, como el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenilacético), mimetizan a la hormona de la planta, presentando diferentes sitios de acción en la membrana celular y son efectivos en el control de plantas dicotiledóneas (Grossmann, 2010).

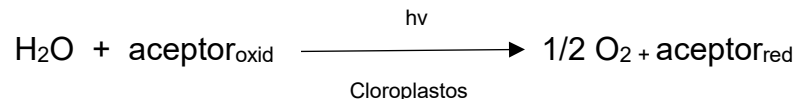
- Inhibidores de la fotosíntesis, el 50% de los herbicidas comerciales inhiben el transporte de electrones fotosintético, siendo el FSII el sitio más afectado por los herbicidas comerciales, tiene una gran variedad estructural (Percival *et al.*, 1991).

También existen los compuestos que desvían el flujo de electrones como los derivados de bipyridilinas, paraquat y diquat, los cuales son aceptores artificiales de electrones en el FSI, con potenciales redox de  $-466$  y  $-349$  mV, probablemente aceptan electrones de los centros hierro-azufre y/o ferredoxina (Dayan *et al.*, 2010).

## 2.5 Fotosíntesis

Los organismos fotosintéticos capturan la energía de la luz solar para su transformación en ATP y NADPH en las membranas internas de los cloroplastos (tilacoides y granas). El  $\text{CO}_2$  se absorbe a través de los estomas y su transformación o reducción a triosas fosfato ocurre en el estroma de los cloroplastos, con la participación de un gran número de enzimas (Rodés y Collazo, 2006).

En 1937 Robert Hill encontró que algunos extractos de hojas que contenían cloroplastos, cuando eran iluminados en presencia de un aceptor de electrones no biológico (artificial) añadido al medio, desprendían oxígeno y reducían al aceptor artificial, de acuerdo a la reacción de Hill: La reacción de Hill es la foto reducción de un aceptor de electrones a expensas de agua y es una herramienta experimental muy útil para encontrar nuevos o potenciales agentes herbicidas.



Reacción de Hill



La fotosíntesis en las plantas verdes depende de dos clases de reacciones lumínicas. El fotosistema I genera poder reductor en forma de NADPH, y el fotosistema II que transfiere los electrones del agua a una quinona, un subproducto de estas reacciones es el O<sub>2</sub>. El flujo de electrones dentro de cada fotosistema y entre los dos fotosistemas genera un gradiente de protones transmembranal que lleva a la síntesis de ATP. En las reacciones de la fase oscura, el NADPH y el ATP formados por la acción de la luz, conducen a la reducción del CO<sub>2</sub> hasta compuestos orgánicos de mayor utilidad (Berg *et al.*, 2008).

La fotosíntesis en las plantas superiores depende de la actuación conjunta de dos clases de complejos fotosensibles unidos a la membrana: el fotosistema I y el fotosistema II, representados en la Figura 2. El fotosistema I, que responde a la luz con longitudes de onda menores de 700 nm, utiliza electrones de alta energía derivados de la luz para crear un poder reductor biosintético en forma de NADPH, un reactivo muy versátil en los procesos de biosíntesis. Los electrones, que reducen la molécula de NADP<sup>+</sup> para formar una molécula de NADPH, proceden de dos moléculas de agua y son arrancados por el fotosistema II, como producto lateral se genera una molécula de O<sub>2</sub>. Los electrones se desplazan del fotosistema II al fotosistema I a través del citocromo *b6f*, un complejo unido a la membrana, este citocromo genera un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal que conduce a la formación de ATP. Así, en la producción de NADPH y ATP colaboran los dos fotosistemas (Berg *et al.*, 2008).

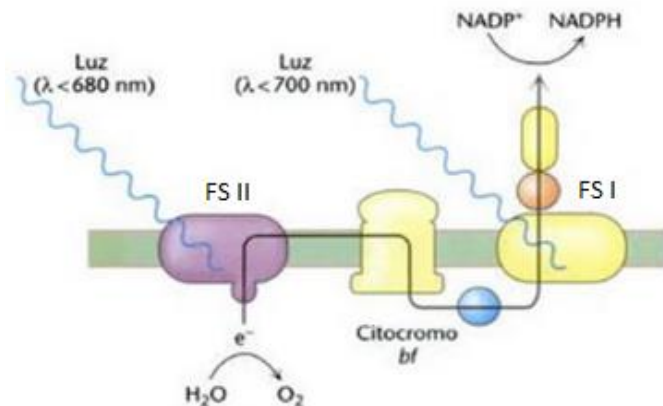


Figura 2. Fotosistemas FSI y FSII para completar el flujo de electrones desde el agua hasta el NADP<sup>+</sup> (Berg *et al.*, 2008).

### 2.5.1 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, en P<sub>680</sub> se produce la separación de un electrón transfiriéndolo a la feofitina (una clorofila sin Mg<sup>2+</sup>), originándose la forma oxidada de dos moléculas de agua. Tan pronto como se extraen los electrones, la enzima libera O<sub>2</sub>, los electrones se transfieren desde el agua a un grupo ó closter de manganesos, después a Z (un residuo de tirosina) hasta llegar al centro de reacción P<sub>680</sub><sup>+</sup>. Los cuatro protones liberados por la oxidación del agua (Ecuación 1) permanecen en el lumen tilacoidal.



Ecuación 1. Oxidación de dos moléculas de agua.

La feofitina que recibió el electrón del centro de reacción excitado (P<sub>680</sub><sup>\*</sup>), a su vez lo cede al aceptor primario quinona A (Q<sub>A</sub>), generándose Q<sub>A</sub><sup>-</sup>. Subsecuentemente, el electrón es transferido a una segunda quinona, Q<sub>B</sub>, generando así un radical aniónico semiquinona Q<sub>B</sub><sup>-</sup>. Esta especie reducida parcialmente permanece ligada al sitio de unión en la enzima, hasta que recibe un segundo electrón de Q<sub>A</sub>, cuando Q<sub>B</sub> ha adquirido los dos electrones también toma dos protones del agua para obtener su forma completamente reducida, Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub> (quinol). Esta molécula se disocia de su proteína y se difunde a través del centro de reacción, los electrones de Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub> son transferidos a través de los acarreadores unidos través de la membrana hasta PSI y liberando H<sup>+</sup>.

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, compite con Q<sub>B</sub> por su sitio de unión en el FSII, así bloquea el transporte de electrones fotosintético. Los electrones de Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub> pasan del citocromo *b<sub>6</sub>/f* a la

plastocianina, una proteína que contiene cobre como cofactor redox transfiriendo los electrones desde plastocianina al fotosistema I (Berg *et al.*, 2008).

### 2.5.2 Fotosistema I

El fotosistema I genera poder reductor en forma de NADPH. Los eventos fotoquímicos que siguen de la excitación del FSI son similares a aquellos de FSII. El FSI es excitado por la luz de longitud de onda de 700 nm, ambos fotosistemas funcionan en serie para que el cloroplasto produzca NADPH, ATP y O<sub>2</sub>.

La clorofila del FSI se denomina P<sub>700</sub>, entonces primero la luz es capturada por algunas de las 200 moléculas de clorofila *a* y clorofila *b*, o adicionalmente por los pigmentos que sirven como antena. El centro de reacción P<sub>700</sub> absorbe la luz, produciendo suficiente energía para permitir en último término la reducción del NADP<sup>+</sup>. Este proceso se representa en un diagrama conocido como esquema Z (Figura. 3).

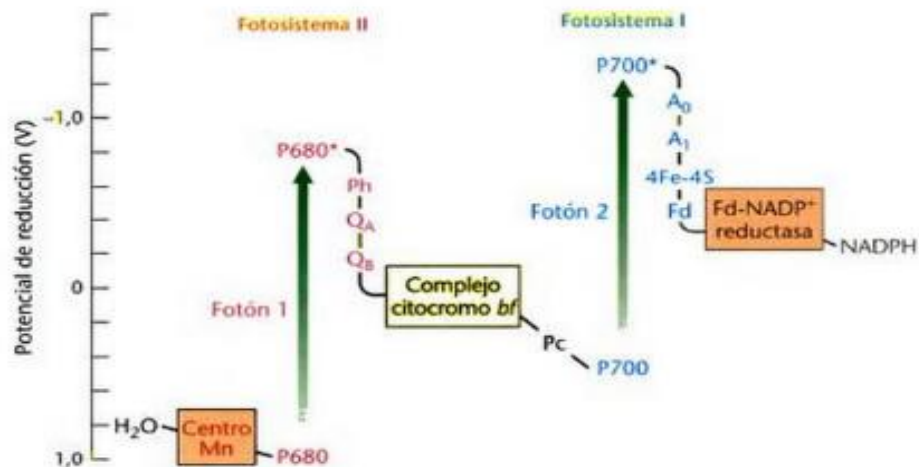


Figura 3. Esquema “Z”, de la fotosíntesis en las plantas y las cianobacterias. Los dos fotosistemas, FSII y FSI, funcionan como transportadores de electrones desde H<sub>2</sub>O al NADPH (Berg *et al.*, 2008).

### 2.5.3 Complejo citocromo $b_6/f$

Este complejo genera un gradiente de protones hacia el interior del tilacoide, el cual es utilizado para sintetizar ATP por la  $CF_1$  de la ATP-sintasa al translocarlos nuevamente hacia el estroma a través del canal de protones  $CF_0$  (Figura 4).

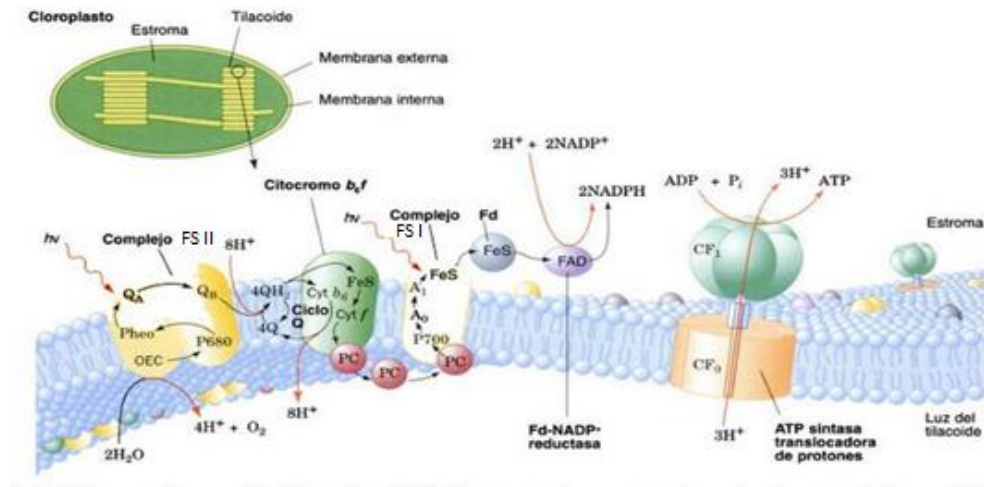


Figura 4. Membrana del tilacoide que muestra los componentes de su cadena de transporte de electrones en el cloroplasto (Voet y Voet, 2006).

## 2.6. Germinación

La germinación empieza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y finaliza cuando empieza la elongación del eje embrionario, llamado radícula (Black, 1985).

La germinación consta de 3 fases:

- **Hidratación:** Consiste en la toma de agua por la semilla seca, se acompaña con un aumento en la respiración mitocondrial (Black, 1985). Para que la germinación se pueda efectuar exitosamente, debe haber un sustrato húmedo, suficiente oxígeno para permitir la respiración aerobia y una temperatura adecuada para que los procesos metabólicos se lleven a cabo (García, 2006).

- **Germinación:** Se inicia la actividad metabólica que permitirá el desarrollo; en esta fase disminuye considerablemente la absorción de agua (García *et al.*, 2006).

- Crecimiento: La radícula (monocotiledóneas) o eje embrionario (dicotiledóneas) se extiende rompiendo los tejidos envolventes, y pasa de un metabolismo anaerobio a uno aerobio; crecimiento radicular y puede estar acompañado de actividad mitótica. La emergencia indica la finalización de la germinación y el comienzo del crecimiento de la plántula (Black, 1985).

## 2.7 Asperulósido

El asperulósido (Figura. 5) es un metabolito secundario de tipo iridoide en forma de glucósido (Lopes *et al.*, 2004). Los iridoideos en general son una clase importante de productos naturales con esqueleto de monoterpreno que pueden presentar diversas actividades biológicas como antiviral, antitumoral, anti-inflamatoria, antinociceptiva y antimicrobiana (Wu *et al.*, 2013), que contienen en su estructura, un anillo de ciclopentano, generalmente fusionado a un anillo heterocíclico oxigenado de seis miembros. El asperulósido se ha aislado a partir de diversas fuentes vegetales como *Paederia scandens* (Wu *et al.*, 2013) *Phychotria leiocarpa* (Lopes *et al.*, 2004), *Morinda lucida* Benth. (Morinda *et al.*, 2017) y *Herba paederiae* (Qiu *et al.*, 2016), entre otras. Esta última es empleada en la medicina herbolaria tradicional China y se han investigado sus efectos protectores y efectos inflamatorios en células de cáncer de pulmón (TNF- $\alpha$ ) (Qiu *et al.*, 2016).

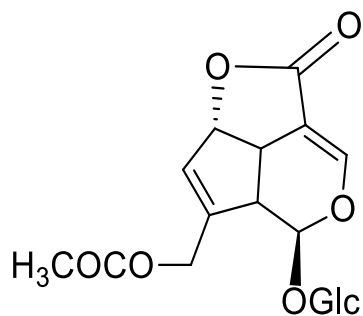


Figura 5. Estructura química del asperulósido.

### **3. HIPÓTESIS**

Si los extractos orgánicos (hexano, cloroformo y metanol) de la planta *Bouvardia ternifolia* Schltdl. inhiben alguno de los ensayos de cernimiento (transporte de electrones fotosintético y/o germinación y desarrollo de plántulas (una mono y/o una dicotiledonea), entonces será posible aislar de ellos al menos un metabolito secundario con posible actividad herbicida.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Aislar y evaluar el efecto herbicida de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de *Bouvardia ternifolia*.

### 4.2 Objetivos Particulares

- ✓ Obtener los extractos orgánicos de las hojas y de los tallos de la planta *Bouvardia ternifolia* con disolventes de diferentes polaridades como son: hexano, cloroformo y metanol.
- ✓ Evaluar los extractos en los ensayos de cernimiento como son: Transporte de electrones fotosintético y en la germinación de semillas de *Lolium perenne* y de *Lactuca sativa*.
- ✓ El o los extractos que resulten activos como inhibidores en alguno de los ensayos de cernimiento, se fraccionarán bio-dirigidamente para aislar e identificar a el o los metabolitos secundarios responsables de la actividad inhibitoria.
- ✓ El o los compuestos que se logren aislar serán purificados e identificados estructuralmente.
- ✓ Se medirá la actividad de o de los compuestos aislados en los ensayos de cernimiento para investigar si son los responsables de la actividad presentada por los extractos de los que fueron aislados.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 Material vegetal

La planta *Bouvardia ternifolia* Schltidl fue colectada en Ciudad Universitaria en mayo de 2012 y fue identificada por la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

### 5.2 Preparación de los extractos para las pruebas de cernimiento.

Las partes de la planta fueron separadas en hojas (398 g) y tallos (556 g) y se secaron a temperatura ambiente; se pulverizaron con ayuda de una licuadora doméstica y por separado fueron sometidos a una extracción por maceración exhaustiva en matraces Erlenmeyer de 2 L con hexano. Los extractos fluidos se filtraron y el remanente vegetal fue lavado repetidas veces con el mismo disolvente para obtener el extracto de hexano. Al material vegetal, hojas y tallos recuperados, se le realizaron dos posteriores extracciones utilizando  $\text{CHCl}_3$  y MeOH y el mismo procedimiento previamente descrito (Diagrama 1). Al último, el material vegetal fue desechado y se obtuvieron los seis extractos orgánicos.

### 5.3 Ensayos de germinación *in vitro* de *Lolium perenne* y *Lactuca sativa*

Para los bioensayos, los extractos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO), el cual es un disolvente que se ha ensayado anteriormente y no interfiere con el bioensayo.

Las semillas se escogieron manualmente descartando las dañadas y todo el ensayo se realizó en condiciones estériles; 40 semillas de pasto (*Lolium perenne*) y 40 de lechuga (*Lactuca sativa*) se colocaron por separado en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro y 10 mL de una solución de los diferentes extractos a diferentes concentraciones (12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para lechuga y para (50, 100, 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para pasto (King *et al.*, 2015).



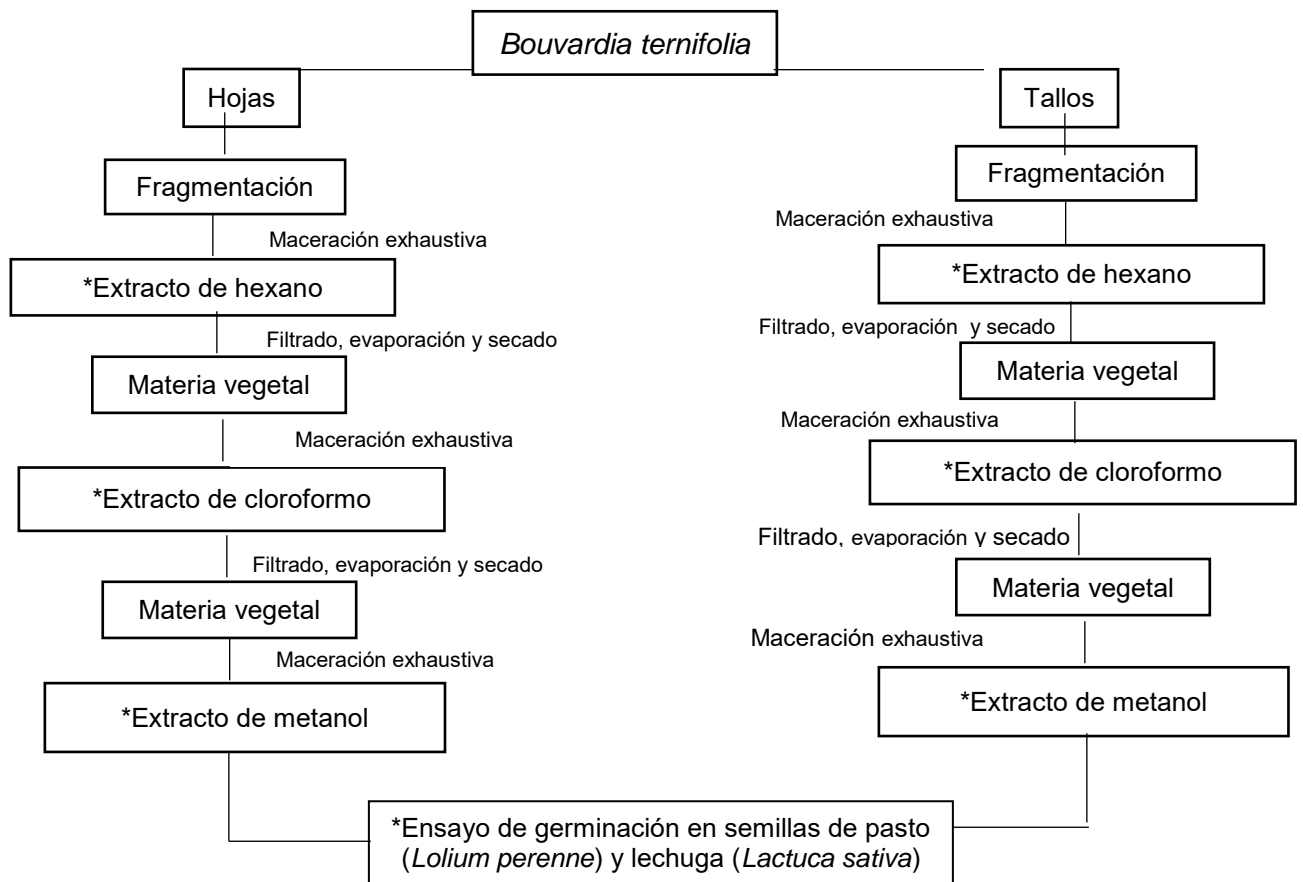


Diagrama 1. Preparación de los extractos orgánicos de *Bouvardia ternifolia*.

Para el control, a las cajas petri con las semillas se les agregaron 10 mL de una solución que contenía la concentración mayor de DMSO empleada. Las cajas se colocaron en una incubadora marca WTC Binder en la obscuridad a 28 °C durante 5 días (3 días de germinación y 2 días más para el crecimiento de la raíz y el tallo) para *L. sativa* y 7 días para *L. perenne* (4 días de germinación y 3 días más para el crecimiento de la raíz y tallo). Enseguida se midió la longitud de las raíces y de los tallos, y se contaron las semillas germinadas (índice de germinación, relación entre el número de semillas que presentaron emergencia de la radícula y las semillas totales).

#### 5.4 Aislamiento de cloroplastos

El aislamiento se realizó en condiciones de obscuridad y a 4 °C. Las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) se seleccionaron, escogiendo las que no estaban maltratadas, rotas o amarillas; se les retiró la nervadura y el ápice, se cortaron en fragmentos pequeños los cuales fueron homogenizados con una licuadora con medio de aislamiento de cloroplastos que contenía: Sacarosa 400 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mM, Tricina 15 mM ajustando el pH a 8.0 con KOH, y se trituraron a velocidad baja para no dañar a los cloroplastos. Posteriormente, el homogenizado se filtró a través de 8 capas de gasa y el filtrado se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm, empleando una centrifuga de mesa con refrigeración (Modelo Sorval Super T21, DUPONT); Se decantó y el pellet de todos los tubos, se resuspendió en 2 mL de medio de aislamiento. La suspensión se mantuvo en la oscuridad y en un recipiente con hielo (King *et al.*, 2015; Morales *et al.*, 2007).

Una vez aislados los cloroplastos, se llevó a cabo la cuantificación de clorofila. Para ello, en 2 matraces aforados de 5 mL, se colocaron 20 µL de la suspensión de cloroplastos y se adicionó acetona al 80 % hasta el aforo. Los matraces se dejaron reposar en hielo durante 5 min; transcurrido este tiempo, el sobrenadante se centrifugó en una centrifuga clínica (Modelo EBA 8S, Hettich Universal 320 R) a 4000 rpm por 5 min.

El contenido de clorofila se cuantificó mediante el método de Arnon (1949) a dos longitudes de onda, 663 y 645 nm, utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS). El blanco utilizado fue acetona al 80%.

La concentración de clorofila se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{Clorofila}] = 8.05 A_{663} + 20.29 A_{645} = \mu\text{g Chl/mL}$$

### *5.5 Medición del efecto de transporte de electrones fotosintético*

Para medir la velocidad del transporte de electrones fotosintético no cíclico se utilizó un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro YSI (Yellow Spring Instruments) modelo 5300A.

El transporte de electrones basal se midió colocando en una cubeta de reacción 3 mL de medio de transporte de electrones con metil viológeno (MV) (sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mM, tricina 1 mM, KCN 0.5 mM y MV 50 μM, ajustando el pH 8.0 con KOH), los extractos a diferentes concentraciones y cloroplastos a 60 μg de clorofila. La cubeta de reacción se iluminó durante 3 min con una lámpara de halógeno

El transporte de electrones fosforilante se midió de la misma manera que el transporte de electrones basal y con el mismo medio adicionando 3 mM de ADP y 3mM de fosfato inorgánico (Pi) y se procedió a iluminar la cubeta de reacción.

El transporte de electrones desacoplado se siguió la misma metodología que el transporte de electrones basal pero en este caso se agregó una solución 6 mM de NH<sub>4</sub>Cl como agente desacoplante. Por último, se realizó el título agregando 10 μL de ferrocianuro de potasio que actúa como aceptor de electrones y 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV y cloroplastos a 60 μg de clorofila (King-Díaz *et al.*, 2015; Saha *et al.*, 1971).

### *5.6 Medición del transporte de electrones de los Fotosistemas II y I y sus reacciones parciales de la fotosíntesis.*

El transporte de electrones desacoplado del FSII, se midió polarográficamente de H<sub>2</sub>O a 2,6-diclorobenzoquinona (DCBQ) (Yruela *et al.*, 1991). En la cubeta de reacción se agregaron 3 mL del medio de transporte basal sin MV y adicionándole 1 μM de 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona (DBMIB), inhibidor del paso de electrones al FSI y 100 μM de DCBQ como aceptor de electrones del FSII y 6 mM de NH<sub>4</sub>Cl.

El flujo de electrones desacoplado del FSI, se realizó polarográficamente utilizando 3 mL de medio de transporte de electrones basal con MV más 100  $\mu$ M de DCPIP, 300  $\mu$ M de ascorbato de sodio, 10  $\mu$ M de 3-(3,4-clorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) y 6 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , el pH se ajusta a 8.0 con KOH) (la solución se prepara el mismo día de su uso) (Allen *et al.*, 1986).

#### 5.7 Fraccionamiento del extracto de metanol de hojas por columna abierta.

Las hojas de la planta de *B. ternifolia* 398 g fueron pulverizadas y se sometieron a maceración exhaustiva con hexano, cloroformo y metanol a temperatura ambiente; los disolventes se recuperaron empleando un evaporador rotatorio Heidolph modelo Laborata 4002. Obteniéndose 47.84 g del extracto de metanol, con un rendimiento del 12%.

El fraccionamiento preliminar del extracto orgánico se realizó mediante una cromatografía en columna abierta empleando gel de sílice y un sistema de elución con un gradiente de polaridad entre hexano, AcOEt, acetona, metanol y agua; del fraccionamiento se obtuvo un total de 403 eluatos de 50 mL cada uno que se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice, visualizadas con una lámpara de luz UV y utilizando como revelador sulfato cérico amoniacal y calentando a 100 °C en una parrilla eléctrica. Las fracciones similares se reunieron en un conjunto de 19 fracciones primarias.

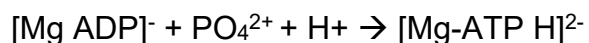
#### 5.8 Fraccionamiento secundario de la fracción F-13

La fracción primaria F-13 obtenida se sometió a un fraccionamiento secundario empleando una columna de Sephadex y como eluyente metanol. Este proceso generó un conjunto de 7 fracciones de 25 mL cada una. De las fracciones F-13-2, F-13-3 y F-13-4 precipitó de manera espontánea un sólido que fue analizado por RMN-<sup>1</sup>H e identificado como asperulósido.

### 5.9 Medición de la síntesis de ATP

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

En la cubeta de reacción se agregaron 3 mL de medio bomba el cual contenía: sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O 5 mM, tricina 1 mM, KCN 0.5 mM y MV 50 μM, ajustado a pH 8 con KOH, 30 μL de ADP 30 mM, 30 μL de fosfato inorgánico (Pi) 30 mM (pH a 8.0). A esta mezcla se le añadieron 60 μg de cloroplastos y se ilumino por 1 min, resultando en el consumo escalar de H<sup>+</sup> por ATP, como se observa en la siguiente reacción:



Este método provee una medida real de la síntesis de ATP (Hipkins, 1986).

### 5.10. Obtención de los valores de $I_{50}$

El valor que corresponde a la concentración de extracto, fracción o compuesto que inhibe el 50% de la actividad medida y fue calculado a partir de las gráficas de porcentaje de actividad en función de la concentración del extracto, fracción o compuesto empleado (Verejão *et al.*, 2015).

### 5.11 Identificación química de los compuestos.

El análisis por cromatografía en capa fina, se llevó a cabo en cromatofolios alugram Sil G/UV 254 Macherey-Nagel Duren. Como reveladores se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline Modelo ENF-240c a las longitudes de onda de 254 y 365 nm y una solución cromogéna de sulfato cérico amoniacal [(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O] al 1% en ácido sulfúrico 2 N (Stahl, 1969). La cromatografía en columna abierta se realizó utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60

(malla 0.063-0.200 mm) Merck y Sephadex. Las cromatografías preparativas se realizaron en placas Merck de 1 mm de grosor y una superficie de 20x20 cm.

El registro de espectros en el UV se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160. Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 283-B. Los espectros de RMN se registraron a 300 ó 400 MHz para el caso de  $^1\text{H}$  y a 75 y 100 MHz para el caso de  $^{13}\text{C}$ . Respectivamente en un espectrómetro Varian XR 300 y Varian Unity 500, según el caso. Como disolventes se emplearon  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  y deuterioacetona, y como referencia interna TMS. Finalmente los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5985-B, utilizando la técnica de ionización por impacto electrónico a 70 eV (Ábrego, 2005).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Rendimiento de los extractos

A partir de 398 g de hojas y 556 g de tallos secos de *Bouvardia ternifolia*, se obtuvieron los extractos orgánicos (Tabla 1). Como se observa, en esta tabla los mayores rendimientos obtenidos fueron con metanol de hojas y tallos, con 47.84 y 30.14 g respectivamente.

Tabla 1. Rendimiento de los extractos de hojas y de tallos de *Bouvardia ternifolia*.

	Hexano		Cloroformo		Metanol	
	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
Hojas	6.59	1.65	9.49	2.38	47.84	12.02
Tallos	6.52	1.17	6.11	1.10	30.14	5.42

- Extracto de hexano de hojas (EHH): Extracto de hexano de tallos (EHT)
- Extracto de cloroformo de hojas (ECH): Extracto de cloroformo de tallos (ECT)
- Extracto de metanol de hojas (EMH): Extracto de metanol de tallos (EMT)

### 6.2 Efecto de los extractos en el ensayo de cernimiento de germinación.

Para establecer si los extractos orgánicos presentaban una actividad en la germinación y crecimiento de las plántulas de dos especies diferentes, sus efectos a concentraciones crecientes fueron ensayados en la germinación de semillas de *Lolium perenne* (una especie mono) y de *Lactuca sativa* (una dicotiledónea).

En la Fig. 6, se observa que de todos los extractos ensayados en la germinación de *L. perenne*, el ECH inhibió la germinación en un 65% a 150  $\mu\text{g/mL}$  y la elongación de la raíces de las plántulas en un 50% a 100  $\mu\text{g/mL}$ , cabe mencionar que este extracto a una concentración de 150  $\mu\text{g/mL}$  ocasionó una disminución en el tamaño de la raíz de *L. perenne* (40%), este extracto también inhibió el crecimiento de los tallos de las plántulas, (menos del 30% para las concentraciones de 100 y 150  $\mu\text{g/mL}$ ). El extracto de hexano de tallos, también

inhibió la germinación de las semillas de esta especie en un 70% a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la elongación de las raíces en un 40% aproximadamente a 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo un poco más activo que el extracto de cloroformo como inhibidor de estas actividades. Sin embargo, en la muestra inhibió menos del 10% la elongación de los tallos a todas las concentraciones empleadas. El extracto que mostró menor actividad como inhibidor de la germinación y crecimiento de las plántulas fue el extracto de metanol, al inhibir solo en un 30% la elongación de los tallos y las raíces y menos del 45% la germinación (Fig. 6).

En las semillas de *L. sativa*, todos los extractos inhibieron en un 100% la germinación de las semillas a 100 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo que se tuvo que evaluar todas las muestras a concentraciones menores a [12.5, 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (Figura. 7). El extracto más activo fue el ECH al inhibir en un 100% la germinación a la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , seguido por los extractos EMH y EMT al inhibir esta actividad en un 90% a la misma concentración y después el ECT inhibió 85 %. Los extractos EHH y EHT inhibieron en menor grado la germinación de *L. sativa* (menos de 80% a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ambos casos) (Fig. 7). La elongación de las raíces y los tallos fueron afectadas en menor proporción, 20% con todos los extractos y en todas las concentraciones empleadas.



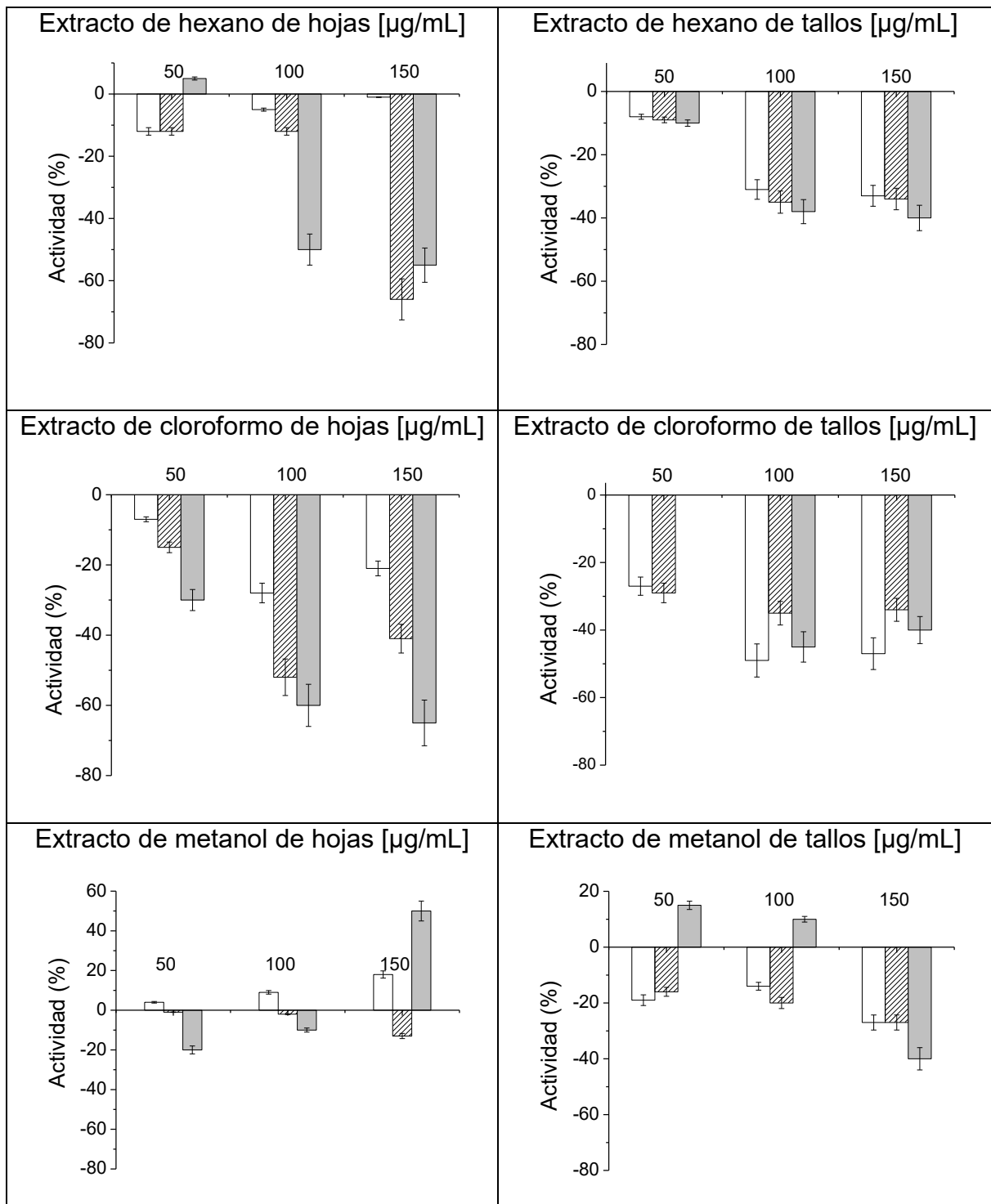


Figura 6. Efecto de los extractos orgánicos de *B. ternifolia* sobre la germinación (■), la elongación de las raíces (▨) y los tallos (□) de las plántulas de *Lolium perenne*. Los valores negativos indican inhibición, los valores positivos indican estimulación, el control se toma como cero. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

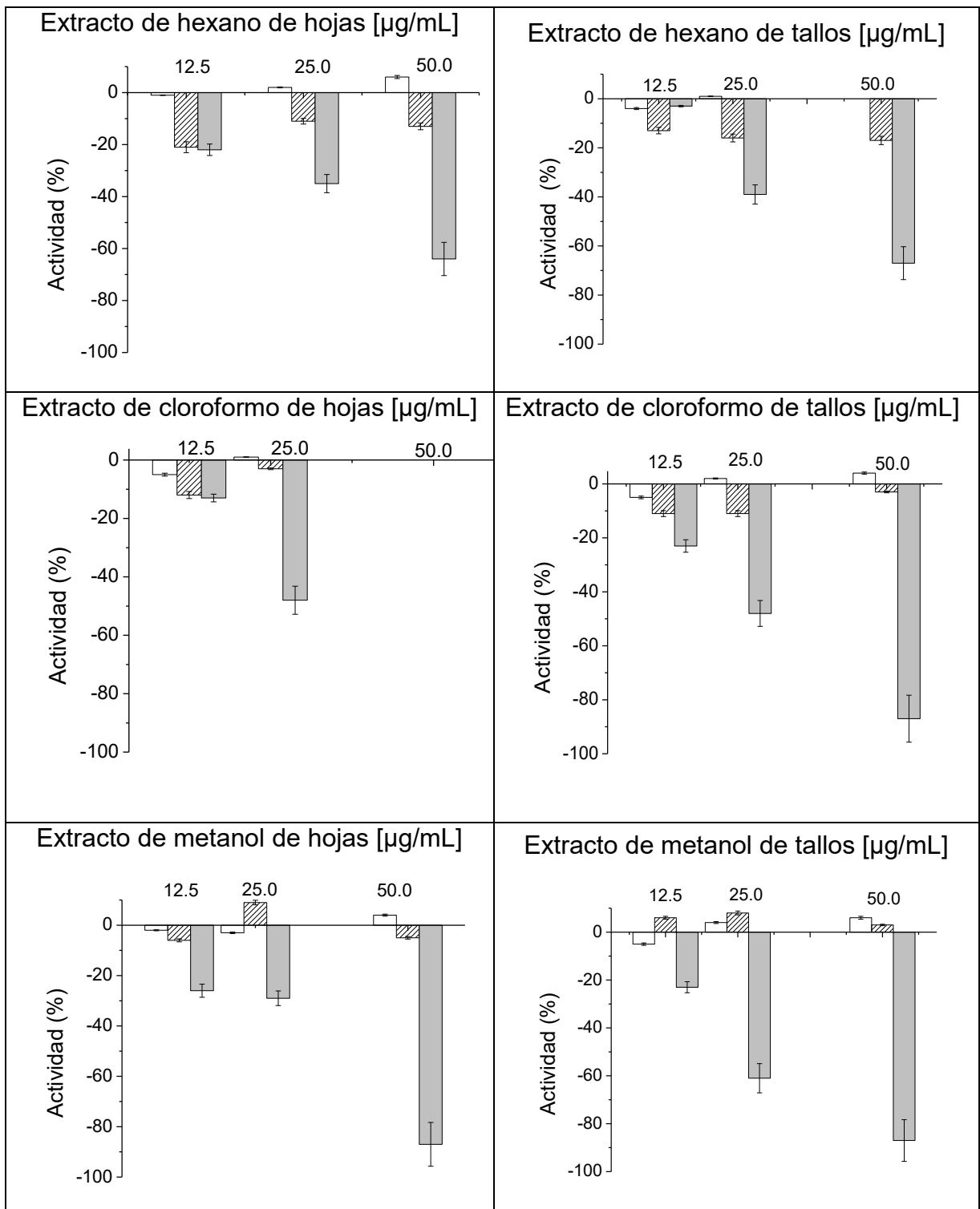


Figura 7. Efecto los extractos orgánicos de *B. ternifolia* sobre la germinación (■) y la elongación de las raíces (▨) y los tallos (□) de *L. sativa*. Los valores negativos indican inhibición, los valores positivos indican estimulación, el control se toma como cero. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

### *6.3 Efecto de los extractos en el ensayo de cernimiento de transporte de electrones no-cíclico en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado) in vitro.*

Se midió el efecto de los extractos sobre el transporte de electrones fotosintético en sus tres estados: basal, fosforilante y desacoplado para saber si tenían actividad inhibitoria. En la Figura 8, se observa que el EHH inhibe parcialmente el transporte de electrones desacoplado (60% a 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y acelera ligeramente el transporte de electrones basal (30% aproximadamente a 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El EHT aumenta el transporte basal (20% a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el fosforilante 40%, a 30 ppm), a concentraciones mayores se inhiben estos transportes junto con el desacoplado en menos del 20%. El ECH acelera el transporte basal más del 50% a concentraciones menores de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero no afecta el transporte fosforilante (Fig. 8). Los extractos ECT, EMH y EMT no afectaron ninguno de los tres transportes (datos no mostrados). Como se puede observar en la Tabla 3, los valores de  $I_{50}$  calculados en  $\mu\text{M}$  para cada uno de los transportes ensayados con el EHH, son menores al compararlos con las otras muestras analizadas. Estos resultados sugieren que el EHH se comporta como inhibidor de la reacción de Hill y como un desacoplante ligero.

Debido a que solo el EHH mostró actividad inhibitoria sobre el transporte de electrones desacoplado, se procedió a medir su efecto sobre los fotosistemas (FS) I y II por separado para conocer su sitio de acción. Como se puede observar en la Figura 9, este extracto inhibió parcialmente tanto el FSII como el FSI en 40 y 60%, respectivamente a la concentración de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , además los valores de  $I_{50}$  calculados para cada uno de los fotosistemas fueron de  $790.0 \pm 213.30$  y para FSII y de  $400.0 \pm 70.71$  para FSI. Estos resultados sugieren que este extracto tiene dos sitios de inhibición diferentes.

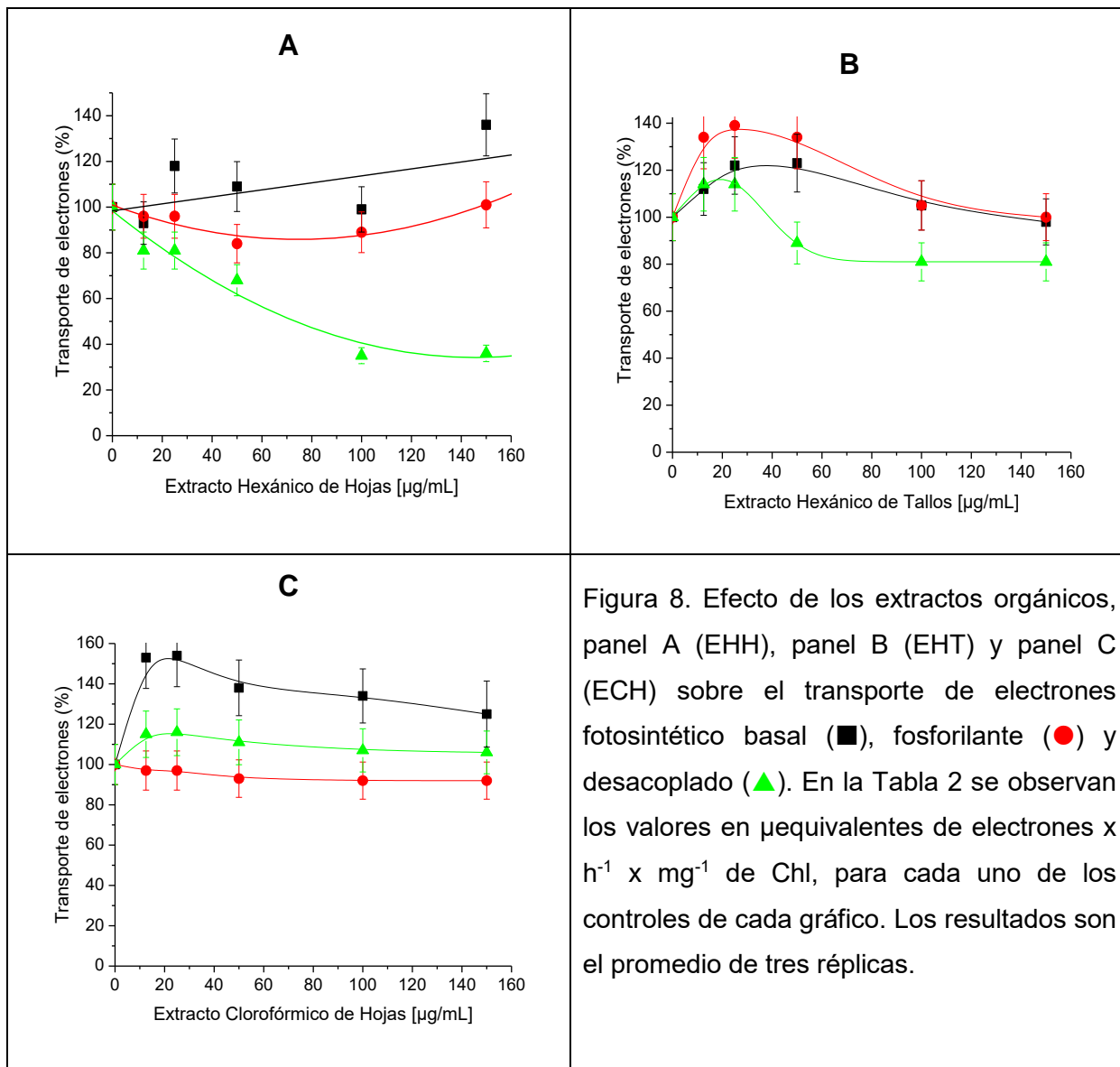


Figura 8. Efecto de los extractos orgánicos, panel A (EHH), panel B (EHT) y panel C (ECH) sobre el transporte de electrones fotosintético basal (■), fosforilante (●) y desacoplado (▲). En la Tabla 2 se observan los valores en  $\mu\text{equiv. e}^- \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de Chl, para cada uno de los controles de cada gráfico. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

Tabla 2. Valores en  $\mu\text{equiv. e}^- \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de Chl, para los controles basal, fosforilante y desacoplado.

	EHH	EHT	ECH
	$\mu\text{equiv. e}^- \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Chl	$\mu\text{equiv. e}^- \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Chl	$\mu\text{equiv. e}^- \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Chl
Basal	$240 \pm 0$	$366.67 \pm 57.73$	$306.67 \pm 70.24$
Fosforilante	$346.67 \pm 46.19$	$406.67 \pm 11.55$	$610 \pm 51.96$
Desacoplado	$700 \pm 20$	$822.33 \pm 38.68$	$906.67 \pm 46.19$

Tabla 3. Valores de  $I_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), calculados para cada uno de los extractos ensayados del transporte de electrones no cíclico.

Transporte	Extractos		
	EHH	EHT	ECH
Basal	$98.40 \pm 1.21$	$112.55 \pm 0.98$	$120.13 \pm 1.73$
Fosforilante	$93.66 \pm 0.81$	$121.55 \pm 1.59$	$97.84 \pm 0.19$
Desacoplado	$83.56 \pm 2.20$	$106.25 \pm 0.98$	$109.32 \pm 0.62$

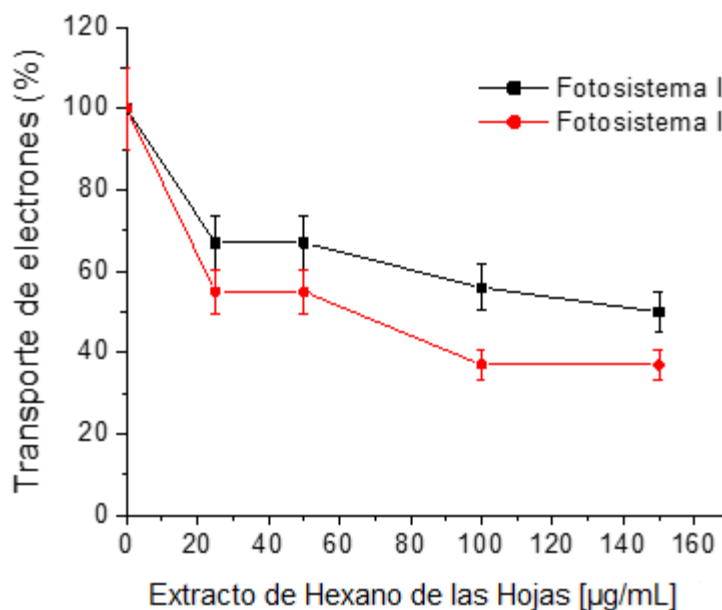


Figura 9. Efecto del EHH en los transportes desacoplados de los fotosistemas II y I. Los valores de los controles en  $\mu\text{equiv. de } e^- \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de Chl, para los controles de Fotosistema II y I fueron:  $790.0 \pm 213.30$  y  $400.0 \pm 70.71$  respectivamente. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

#### 6.4 Fraccionamiento del extracto de metanol de hojas

El extracto EHH fue el más activo como inhibidor del transporte de electrones desacoplado en cloroplastos, además de inhibir parcialmente la germinación de las semillas de *L. sativa* y *L. perenne*; el ECH fue el más activo como inhibidor de la germinación en las semillas de *L. sativa*; sin embargo, debido a los bajos rendimientos de estos extractos, se decidió fraccionar el EMH por su buen

rendimiento (47.84 g, Tabla 1) y a que también resultó ser un inhibidor de la germinación de *L. sativa* (90% a 50 µg/mL).

El EMH fue sometido a fraccionamiento preliminar en una columna abierta por gradiente de polaridad. Este proceso generó un conjunto de 19 fracciones secundarias (Tabla 5).

Tabla 5. Fraccionamiento preliminar del extracto de metanol de las hojas de *B. ternifolia*.

Fracción	Eluatos	Proporción (v/v)	Eluyente
1	1-12	100	Hexano
2	13-24	90:10	Hexano-AcOEt
3	25-75	80:20	Hexano-AcOEt
4	76-81	75:25	Hexano-AcOEt
5	82-178	70:30	Hexano-AcOEt
6	179-218	60:40	Hexano-AcOEt
7	219-234	50:50	Hexano-AcOEt
8	235-247	100	AcOEt
9	248-258	90:10	AcOEt-Acetona
10	259-269	80:20	AcOEt-Acetona
11	270-296	50:50	AcOEt-Acetona
12	297-300	80:20	Acetona-AcOEt
<b>13</b>	<b>301-315</b>	<b>100</b>	<b>Acetona</b>
14	316-338	90:10	Acetona-MetOH
15	339-342	50:50	Acetona-MetOH
16	343-360	30:70	Acetona-MetOH
17	361-372	10:90	Acetona-MetOH
18	373-378	100	MetOH
19	379-403	50:50	MetOH-Agua

Las fracciones resultantes se ensayaron sobre la germinación de las semillas y en el crecimiento de las plántulas de *L. perenne* y *L. sativa* (ensayo de cernimiento). Como se puede observar en la Figura 10, de todas las fracciones ensayadas, solo la fracción F-13 mostró una actividad inhibitoria sobre la germinación de *L. perenne* y *L. sativa* (50 y 43 %, respectivamente a 100 µg/mL). La elongación de las raíces de la plántula de *L. sativa* también fue inhibida por esta fracción en un 48 % a esta misma concentración.

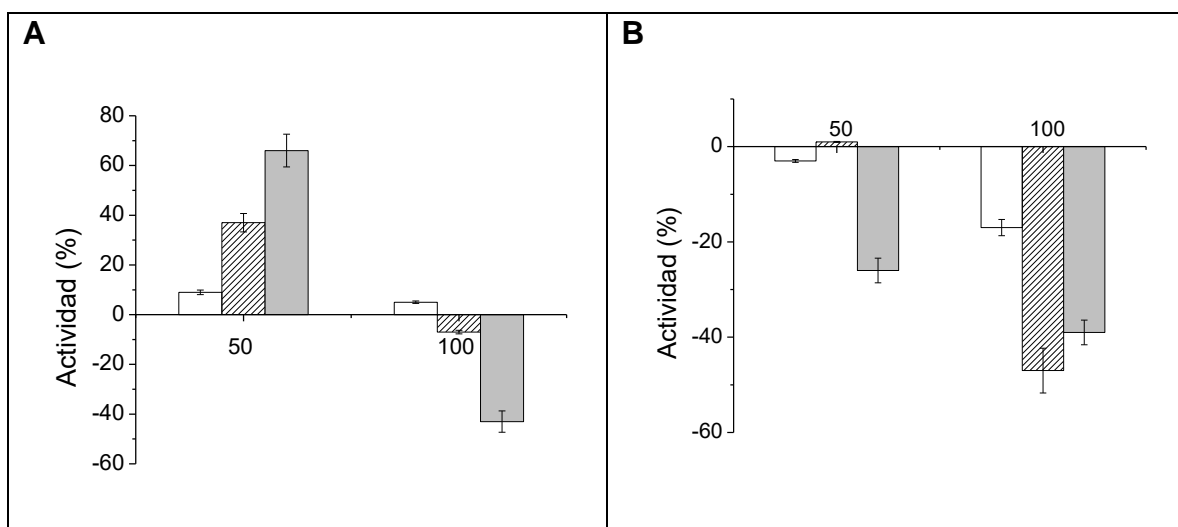


Figura 10. Efecto de las concentraciones de 50 y 100 µg/mL de la fracción F-13, en el panel A, en los tallos (□), la elongación de raíces (▨) y la germinación (■) de *L. perenne*. Panel B, en el crecimiento de tallos (□), raíces (▨) y germinación (■) en *L. sativa*. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

Debido a estos resultados, la fracción F-13, se fraccionó por segunda vez en columna de cromatografía abierta con Sephadex, obteniéndose 7 conjuntos de fracciones primarias (Tabla 5).

Las fracciones F-2, F-3 y F-4 identificadas como (VA 11512), (VC 11591) y (VF 11542), respectivamente fueron evaluadas sobre la germinación de las semillas de prueba *L. perenne* y *L. sativa*.

## 6.5 Efecto de las fracciones secundarias en los ensayos de cernimiento.

Las fracciones secundarias se evaluaron en los ensayos de cernimiento para conocer su actividad sobre la germinación de semillas. Las fracciones secundarias que resultaron activas fueron (VA 11512) y (VF 11542), la fracción (VC 11591) (Tabla 6), no fue ensayada debido a su bajo rendimiento.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la fracción 13.

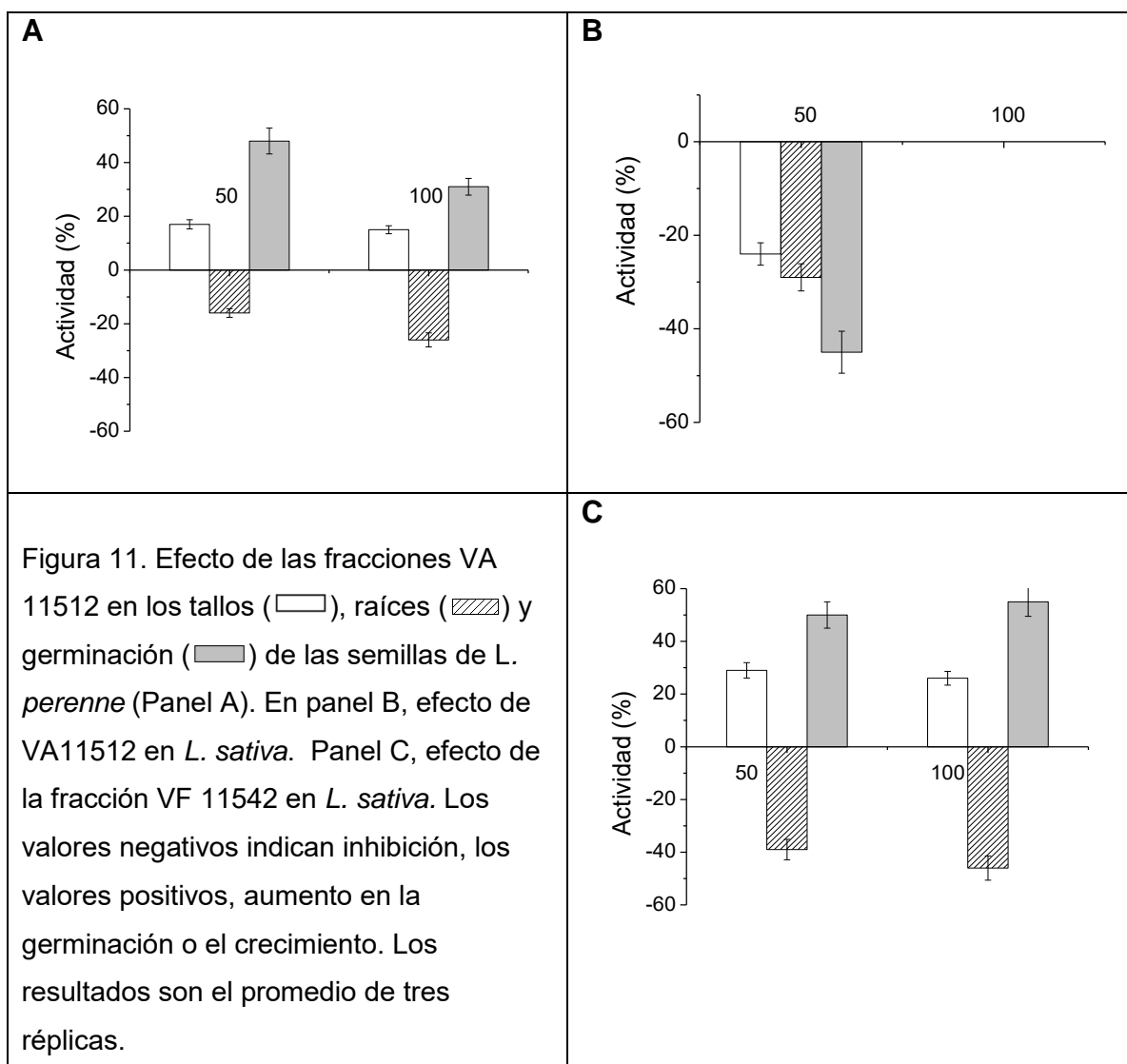
Fracción	Eluatos	Proporción (v/v)	Eluyente
1	1-5	100	Acetona
<b>2</b>	<b>6-7 (VA 11512)</b>	<b>70:30</b>	<b>AcOEt-MeOH</b>
<b>3</b>	<b>8-9 (VC 11591)</b>	<b>50:50</b>	<b>AcOEt-MeOH</b>
<b>4</b>	<b>10-14 (VF 11542)</b>	<b>30:70</b>	<b>AcOEt-MeOH</b>
5	15-20	100	MetOH
6	21-25	70:30	MetOH-Agua
7	26-31	50:50	MetOH-Agua

### 6.5.1. Efecto de las fracciones secundarias en los ensayos de germinación

En los ensayos de germinación la fracción VA 11512 a la concentración de 50 µg/mL aumentó la germinación de las semillas de *L. perenne* en 50% y a 100 µg/mL en un 30%. Igualmente, en ambas concentraciones se estimuló el crecimiento de las raíces aproximadamente en un 20%. En cambio, el efecto de esta fracción en la elongación de las raíces indicó una inhibición en un (18 y 30% a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL respectivamente) (Fig. 11A). La misma fracción se ensayó sobre la germinación de las semillas de *L. sativa*, inhibiendo la germinación en un 45% a la concentración de 50 µg/mL y el 100% de la germinación a 100 µg/mL, (Fig. 11B).



La fracción VF 11542 con las semillas de *L. perenne* presentó un efecto inhibitorio del 100% a 50 y a 100  $\mu\text{g/mL}$ , siendo la fracción más activa como inhibidor sobre la elongación de las raíces y los tallos. Sin embargo, con *L. sativa* esta misma fracción a 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  estimuló el crecimiento de los tallos en 30% con respecto al control, también aumentó la germinación 50% e inhibió la elongación de raíces 40% (Fig. 11C).



### 6.5.2 Efecto de las fracciones secundarias en la síntesis de ATP y el transporte de electrones fotosintético de cloroplastos aislados de espinaca.

Para conocer el efecto de las fracciones en la fotofosforilación, se evaluó su actividad en la síntesis de ATP y en el transporte de electrones no cíclico de cloroplastos aislados de hojas de espinacas. Como se observa en la Fig. 12, las fracciones VA11512 y VF 11542 inhibieron la síntesis de ATP con valores de  $I_{50}$  de  $69.66 \pm 1.26$  y  $36.14 \pm 1.25$  en  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

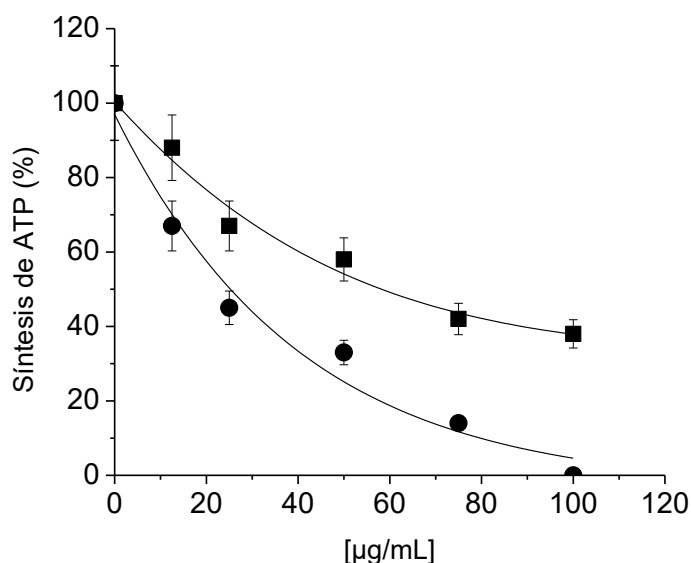


Figura 12. Efecto de las fracciones VA 11512 (■) y VF 11542 (●) en la inhibición de la síntesis de ATP. El control es igual al 100% de actividad y equivale a  $143 \pm 47.42$  y  $112.6 \pm 93.27 \mu\text{M}$  de ATP/ mg de Chl x h respectivamente. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

Debido a que la síntesis de ATP puede ser inhibida por diferentes mecanismos: ya sea por una inhibición del transporte de electrones, o por inhibición de la transducción de energía o debido a un efecto desacoplante, las fracciones VA 11512 y VF 11542 se ensayaron en el transporte de electrones no cíclico de cloroplastos de espinaca, medido de agua a MV en sus tres estados: basal, fosforilante y desacoplado. Los resultados se muestran en la Figura 13, y

como se observa, la fracción VA 11512 es la más activa inhibiendo los tres transportes. Los valores de  $I_{50}$  calculados con cada muestra en los tres estados (basal, fosforilante y desacoplado) fueron:  $34.21 \pm 2.35$ ,  $97.36 \pm 1.06$  y  $65.78 \pm 0.73$ , respectivamente para VA 11512; y para VF 11542 son:  $91.05 \pm 1.38$ ,  $110.0 \pm 1.42$  y  $110.0 \pm 0.54$ , siendo más activa como inhibidor del flujo electrónico en sus tres estados la fracción VA 11512, ambas fracciones se comportan como inhibidores de la reacción de Hill.

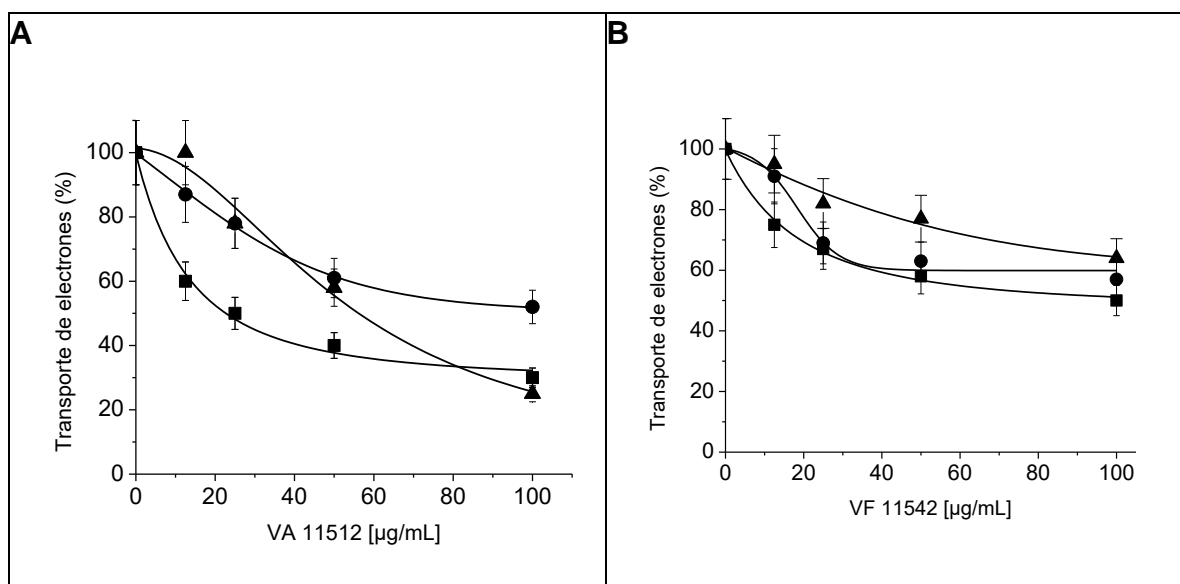


Figura 13. Efecto de VA 11512 (Panel A) y VF 11542 (Panel B) en el transporte de electrones fotosintético basal (■), fosforilante (●) y desacoplado (▲). En la Tabla 7, se muestran los valores de los controles en  $\mu\text{equiv. de } e^- \times \text{mg}^{-1} \text{Chl} \times \text{h}^{-1}$  para cada uno de los transportes, el control equivale al 100 %. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

Tabla 7. Se muestran los promedios de tres réplicas de los controles del flujo de electrones para cada uno de los estados (basal, fosforilante y desacoplado) en  $\mu\text{equiv. de } e^- \times \text{mg}^{-1} \text{Chl} \times \text{h}^{-1}$ .

Compuestos	■Basal	●Fosforilante	▲Desacoplado
VA 11512	$666 \pm 0$	$1533.0 \pm 94.75$	$1599.0 \pm 376.88$
VF 11542	$686 \pm 0$	$1000.5 \pm 40.30$	$1257 \pm 20.6$

## 6.6 Caracterización del asperulósido.

El análisis cromatográfico de las fracciones VA 11512, VF 11542 y VC 11591 permitió evidenciar la presencia de un componente en común, siendo mayoritario en la fracción VA11542. De esta última fracción (0.975 g), cristalizó de manera espontánea un sólido que se analizó por las técnicas, espectroscópicas de RMN de hidrógeno y de  $^{13}\text{C}$  en experimentos uni y bi-dimensionales. El espectro de  $^{13}\text{C}$  mostró 18 señales, asignadas de acuerdo a su desplazamiento químico a un residuo de azúcar, cuatro a carbonos de doble ligadura, dos carbonilos de grupos éster, tres metinos alifáticos, dos de ellos base de oxígeno, un metileno alifático base de oxígeno, un carbono anomérico y un grupo metilo alfa a un carbonilo. De las señales anteriores, dos correspondieron a: carbonos anoméricos (C-1 y C-1'), dos carbonos con hibridación  $\text{sp}^2$  (C-3 y C-7) y dos cuaternarios (C-4 y C-8), un metino base de un éster (lactona) (C-6), un metileno base de un éster (C-10), un metilo alfa a un carbonilo y el resto, los carbonos de un residuo de azúcar (C-2' a C-6'). El espectro de resonancia magnética de hidrógeno corroboró la presencia de dos hidrógenos vinílicos en carbonos independientes (H-3 y H-7), tres metinos alílicos (H-5, 6 y 9), dos metinos en un carbono anomérico (H-1 y H-1'), un metilo aislado y metinos y un metileno en carbonos base de oxígeno (azúcar: H-2-H6) y un metileno alílico y vecino a un éster H-10). De acuerdo a las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales, se confirmó la presencia de dos hidrógenos vinílicos en carbonos independientes (H-3 y H-7), tres metinos alílicos (H-5, H-6 y H-9), dos metinos en un carbono anomérico (H-1 y H-1'), un metilo, metino y un metileno en carbonos base de oxígeno (H-2-H-6) y un metileno alílico y vecino a un éster H-10. De acuerdo a las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales se estableció que el producto analizado es el de asperulósido y se confirmó por la composición de estas constantes espectroscópicas con las publicadas en la literatura (Wu *et al.*, 2013) que es el responsable de las actividades observadas.

## 7. CONCLUSIONES

De los seis extractos orgánicos obtenidos de tallos y hojas, el EMH fue activo y con el mayor rendimiento para los ensayos de cernimiento, por eso se procedió a su fraccionamiento por columna abierta y se identificó por primera vez en la planta *Bouvardia ternifolia* el compuesto asperulósido.

La fracción VF11542 presentó un efecto inhibitorio del 100% de la germinación de semillas de *Lolium perenne*, siendo la fracción más activa, sugiriendo que esta actividad se debe al compuesto mayoritario presente, el asperulósido.

En el transporte de electrones, la fracción más activa fue la fracción VA 11512, lo que sugiere que probablemente además del asperulósido existen otros compuestos en concentraciones menores que también participan con la actividad inhibitoria, por lo que se requiere aislar mayor cantidad de EMH para identificar a estos compuestos activos.

El EHH mostró una actividad inhibitoria sobre el transporte de electrones desacoplado, e inhibió los fotosistemas II y I por separado en 40 y 60% respectivamente a 150 ppm, estos resultados sugieren que el extracto tiene dos sitios de inhibición diferentes probablemente debido a la sinergia de los compuestos presentes.

Por último, este tipo de experimentos no habían sido realizados previamente con esta planta, por lo que los resultados obtenidos con el asperulósido permiten concluir que este tipo de compuestos podrían tener un uso potencial para el control de la germinación y el crecimiento de malezas mono y dicotiledóneas.

## 8. PERSPECTIVAS

Colectar más planta para preparar una mayor cantidad de los EHH y ECH, que resultaron ser más activos como inhibidores en la germinación y crecimiento de las plántulas de *L. perenne*, así como el EHH, que presentó una actividad inhibitoria en la cadena transportadora de electrones fotosintética; y por medio del fraccionamiento biodirigido aislar el o los compuestos responsables de la actividad inhibitoria presentada.

Realizar con el asperlúsido las pruebas *in vivo* con plantas crecidas en el invernadero y determinar su actividad inhibitoria pos-emergente, midiendo su efecto en la biomasa seca.

## 9. REFERENCIAS

- Abrego A. L. 2005. Aislamiento e identificación estructural de compuestos con actividad antimicrobiana de la especie *Acacia farnesiana* Willd. Tesis de Licenciatura Facultad de Química UNAM, México DF.
- Allen J. F y Holmes N. G. 1994. Electron transport partial reaction. In photosynthesis, Energy transduction. A practical approach. IRL. Press: Oxford, U. K. Pp. 119-128.
- Argueta-Villamar, A., Cano-Asseleih L. M., Rodarte M. E. 1994. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México D. F.
- Arnon D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, V. 24. Pp. 1-15.
- Beckie H. J. 2011. Herbicide-resistant weed management: Focus on glyphosate. Pp. 1037-1048.
- Berg J. M., Tymoczko J.L., Streyer L. 2008. "Bioquímica" Edición W. H. Freeman and Company, New York and Basingstoke. España. Pp. 538-542.
- Black M., Blewley J. D. 1985. Germination, structure, and composition. New York: Plenum Press. Pp. 1-30.
- Calera M. R., Soto F., Sanchez P., Bye R., Hernández B., Anaya A. I., Lotina H., Mata R. 1995. Biochemical active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. Phytochemistry. V. 40. Pp. 419-425.
- Cantrell C. L., Dayan F. E., Duke S. O. 2012. Natural products as sources for new pesticides. V. 17. Pp. 1231-1242.
- Cárdenas M. E., Calderón R. Rzedowski J. 2001. Bouvardia (*Scrophulariaceae*). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. Pp. 1406.
- Caseley J. C. 1996. Herbicidas. En: Producción Vegetal Vol. 120. Roma. Pp. 401.

- Dayan F. B., Cantrell C. L., Duke S. O. 2009. Natural products in crop protection. V. 17. Pp. 4022-4034.
- Dayan F. B., Duke S. O. y Grossman K. 2010. Herbicides as probes in plant biology. *Wees Science*. V. 58. Pp. 340-350.
- Dilley R. 1972. "Ion transport (H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> Exchange phenomena) Methods in Enzymology, San Prieto, A., Ed. Academic Press: New York, 1972; V. 24 Pp. 68-74.
- Duke S. O. 1990. "Overview of Herbicide Mechanisms of action" *Environmental Health Perspectives* V. 87. Pp. 263-271.
- Duke S. O., Brian E., Scheffler., Dayan F. E. 2002. Allelochemicals as herbicides In: Reigosa M., Pedrol. *Allelopathy from molecules to ecosystems*. Science Publishing, Inc. NH, USA. Pp. 183-195,
- García B., Roselló C., Santamarina S. 2006. *Introducción al funcionamiento de las plantas*. Universidad Politécnica de Valencia. Pp. 53.
- Grossmann K. 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. V. 66. Pp. 113-120.
- Hartmann T. 2007. From waste products to chemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. Pp. 2831-2846.
- Hipkins M. F., Baker N. R. 1986. "Photosynthesis transduction a practical approach IRL Press Oxford Washington. Pp. 103-141.
- Hûter O. F. 2011. Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochem*. Pp. 189-194.
- Jensen H. F. W., Jensen, S. R., Nielsen, B. 1988. Chemotaxonomy of the Acanthaceae. Iridoids and quaternary amines. *Phytochemistry*. V. 27. Pp. 2581-2589.
- Justum A., Heaney S., Perrin B., Wege P. 1997. Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. V. 54. Pp 446-453.
- King D. B., Granados P. J., Bah M., Rivero C. J. F., Lotina H. B. 2015. Mexican propolis flavonoids affect photosynthesis and seedling growth. *Journal of Photochemistry and Photobiology. Biology*. V. 151. Pp. 213-220.



- Labrada R., Caseley J. C., Parker C. 1996. "Manejo de malezas para países en desarrollo" En: Producción y Protección Vegetal. V. 120. Pp 225-230.
- Lopes S., Poser G. L., Kerber V. A., Farias F. M., Konrath E. L., Moreno P., Sobral M. E., Zuanazzi J. A. S., Henriques A. T. 2004. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. V. 32. Pp. 1187-1195.
- Macias H. P. G. 2012. Herbicidas orgánicos vs. Herbicidas químicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias químicas. Universidad Veracruzana, Poza rica, México. Pp. 87.
- Mitchell G., Bartlett D. W., Fraser T. E. M., Hawkes T. R., Holt D. C., Townson J., Wichert R. A., Mesotriones. 2001. A new selective herbicide for use in maize. *Pest Manage*. Pp. 120-128.
- Mortimer A. M. 1990. The biology of weeds. En R. J. Hance y K. Holly (Eds.), *Weed control handbook: Blackwell Scientific Publications*. Pp. 13-30.
- Morinda L. B., Chithambo B., Noundou XS. Krause RW. 2017. Anti-malarial synergy of secondary metabolites. *J Ethnopharmacol*.
- Neve P., Vila-Aiub M., Roux F. 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytol*. Pp. 783-793.
- Percival M. P., Baker N. R. 1991. Herbicides and photosynthesis, in topics in photosynthesis. *Herbicides Chapter 1, El Sevier Science Publisher* V. 10. Pp. 2-23.
- Qiu J, Chi G, Wu Q, Ren Y, Chen C, Feng H. 2016. Pretreatment with the compound asperuloside decreases acute lung injury via inhibiting MAPK and NF-kB signaling in a murine model. *Int Immunopharmacol*. Pp. 109-15.
- Rodès G., Collazo O. 2006. "Manual de prácticas de fotosíntesis" Edición las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM, México. Pp 69.
- Rojas T. I., 2002. Metabolitos fitotoxícos de *Parmotrema tinctorum* y *Leucophyllum ambiguum* HUMB. & BONPL como una fuente potencial de compuestos herbicidas con un efecto sobre la fotosíntesis y la proteína clamodulina. Tesis de Doctorado. UNAM. México, D. F. Pp. 5-17.

- Saha S., Ouitrakul R., Izawa S., Good N. 1971. Electron transport and phosphorylation in chloroplast as function of the electron acceptor. *Journal of Biological Chemistry* 246. Pp. 3204-3209.
- Strasser R. J., Stirbet A., Govindjee P. 1995. Poliphasic chlorophyll a fluorescence transient in plant and cyanobacteria. *Photochemical Photobiology*, V. 66. Pp. 32-45.
- Verejão J. O. S., Barbosa L. C. A., Ramos G. A., Verejão E. V. V., King D. B., Lotina H. B. 2015. New rubrolide analogues as inhibitors of photosynthesis light reactions. *J Photochem Photobiol B*, 145. Pp. 11-18.
- Villaseñor R. J., Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Voet D., Voet J. 2006. *Bioquímica. Médica Panamericana*. México. Pp. 922
- Wu Z. J., Wang J. H., Fang D. M., Zhang G. L. 2013. Analysis of iridoid, glucosides from *Paederia scandens* using HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Pp 54-64.
- Yruela I., Montoya G., Alonso P. J. y Picorel L. 1991. Identification of the pheophytin QA-Fe Domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu (II) inhibitory binding site. *Journal Biology Chemicals*, V. 266. Pp. 22847-22850.

## 10. APÉNDICE

### 9.1 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 la columna 60 Merck, tamaño de malla de 0.0063-0.200 mm, para la cromatografía en capa fina se utilizó placa preparativa de sílice 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).

#### 9.1.1 Medio de aislamiento de cloroplastos

Compuesto	Concentración (mM)	Peso (g/L)
Sacarosa (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	400	136.88
KCl	20	1.491
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5	1.0165
Tricina	30	5.376

\*Ajustar a pH=8 con KOH

#### 9.1.2 Medio bomba

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

\*Ajustar a pH=8 con KOH

### 9.1.3 Medio de transporte de electrones

Compuesto	Concentración (mM)	Peso (g/L)
Sacarosa (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	100	34.22
KCl	10	0.7455
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5	1.0165
Tricina	1	2.688
KCN	0.5	0.0325
MV	50 µM	0.0128

\*Ajustar a pH=8 con KOH

### 9.1.4 Medio de transporte de electrones sin MV

Compuesto	Concentración (mM)	Peso (g/L)
Sacarosa (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	100	34.22
KCl	10	0.7455
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5	1.0165
Tricina	1	2.688
KCN	0.5	0.0325

\*Ajustar a pH=8 con KOH

### 9.1.5 Preparación de Sulfato cérico amoniacal

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

### 9.1.6 Medio de transporte de electrones para Fotosistema II

Compuesto	Concentración
Medio de transporte sin MV	Aforo
NH <sub>4</sub> Cl	6 mM
DCPIP*	100 µM
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	300 µM

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

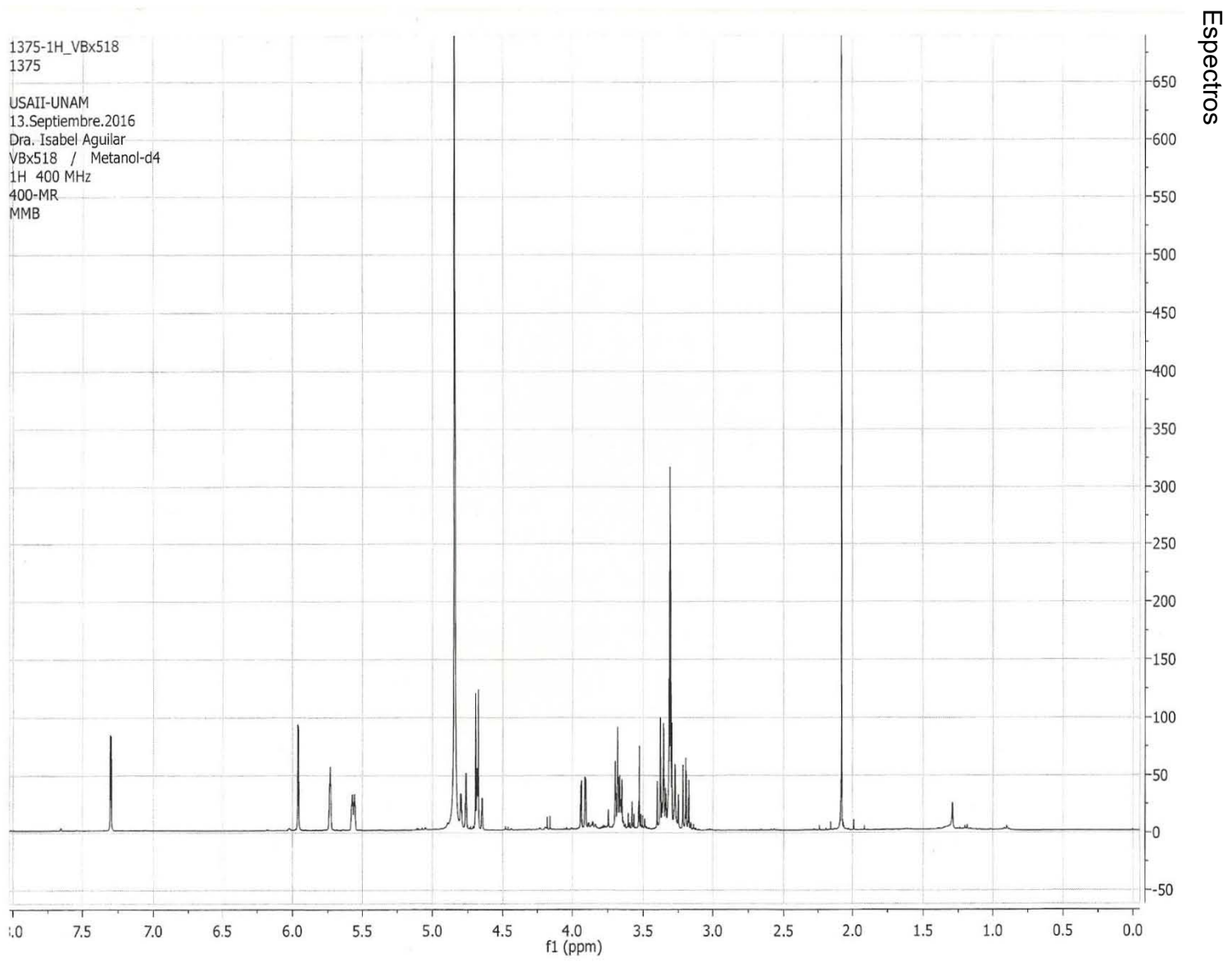
\*Se prepara el mismo día

#### 9.1.7 Medio de transporte de electrones para Fotosistema I

Compuesto	Concentración
Medio de transporte de electrones	Aforo
NH <sub>4</sub> Cl	6 mM
DCPIP*	100 µM
Ascorbato de Sodio	300 µM

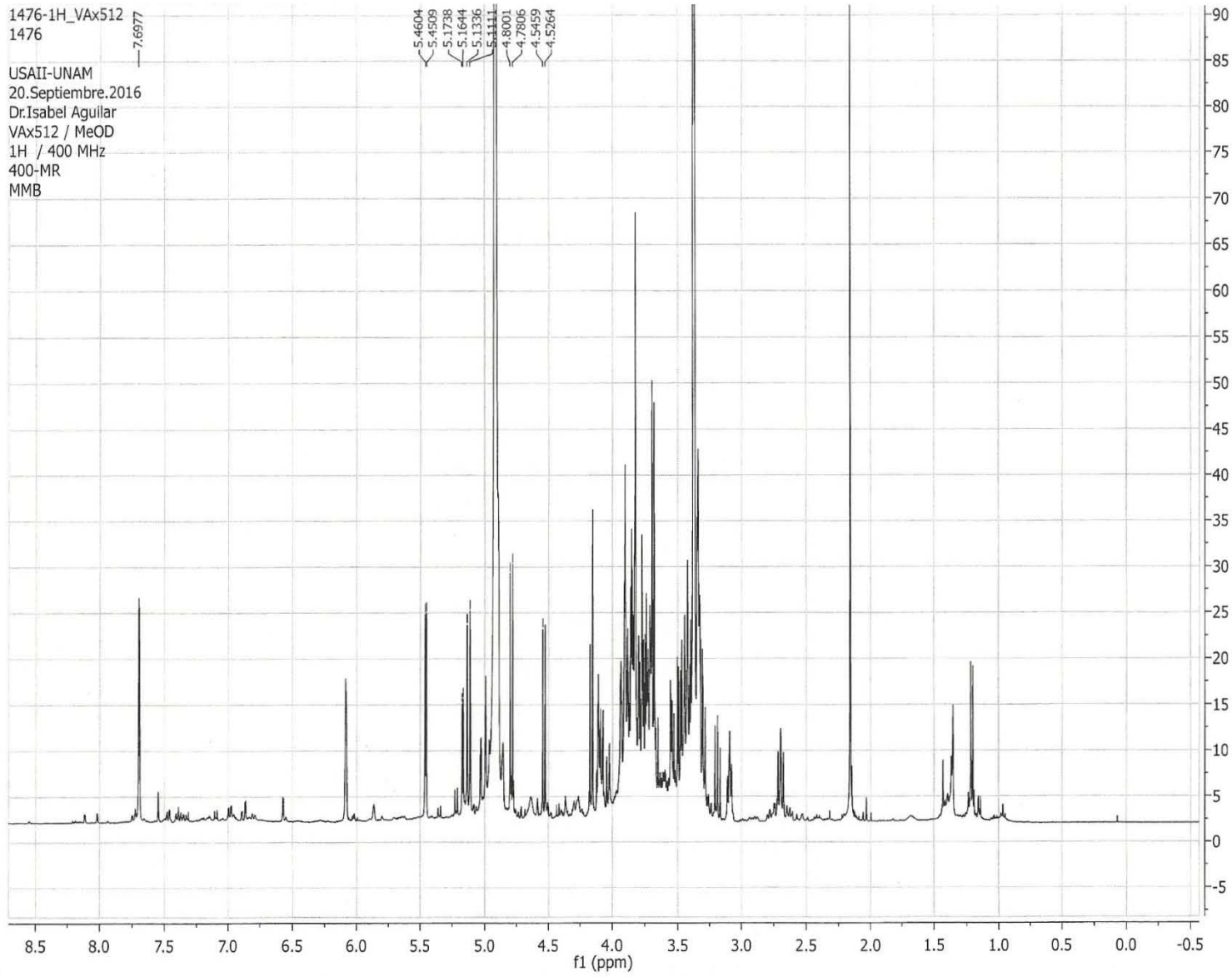
Ajustar el pH a 8.0 con KOH

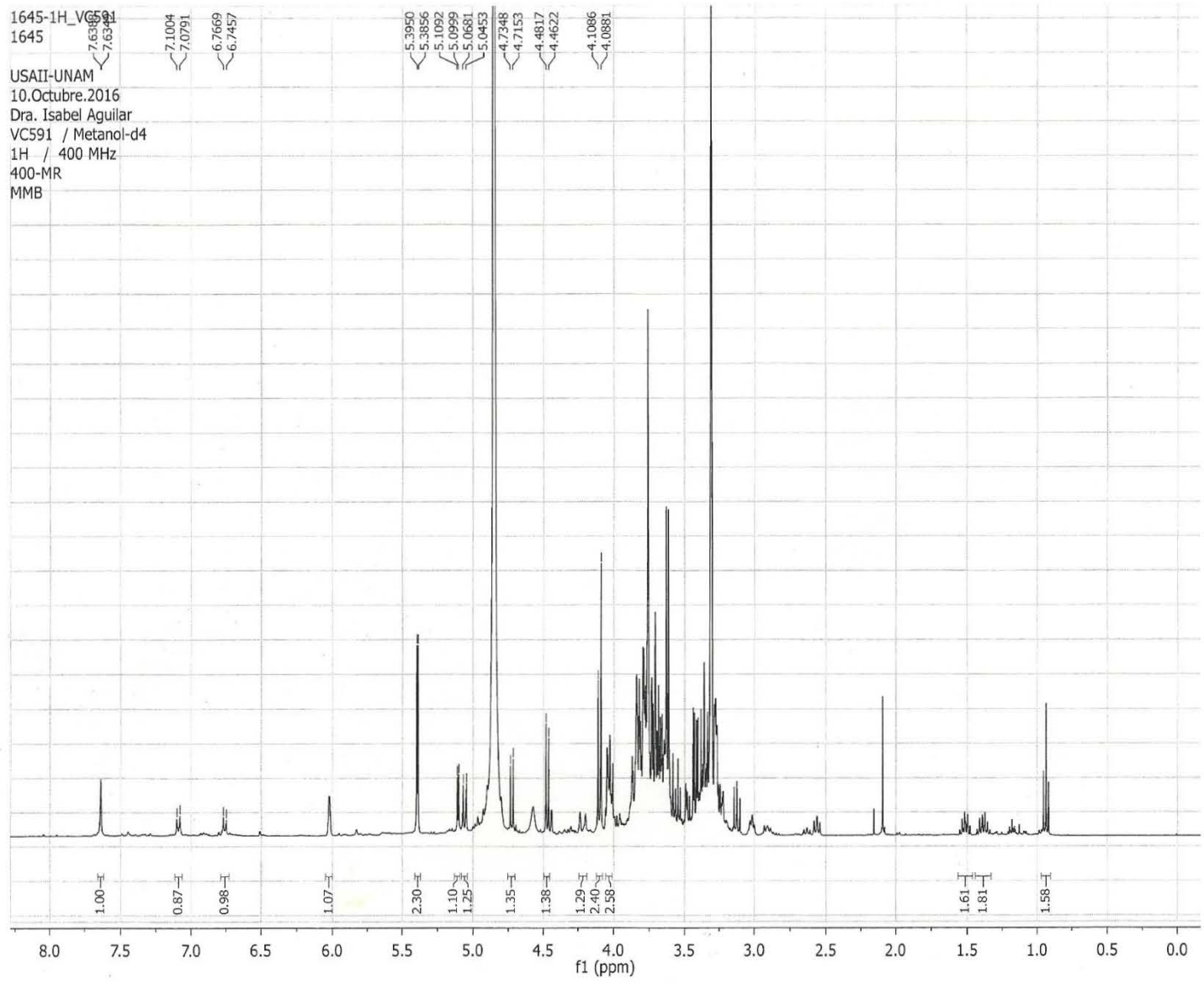
\*Se prepara el mismo día



1476-1H\_VAx512  
1476

USAII-UNAM  
20.Septiembre.2016  
Dr.Isabel Aguilar  
VAX512 / MeOD  
1H / 400 MHz  
400-MR  
MMB







1646-1H\_VF542  
1646

USAII-UNAM  
10.Octubre.2016  
Dra. Isabel Aguilar  
VF542 / Metanol-d4  
1H / 400 MHz  
400-MR  
MMB

