



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ENSAYO *IN VIVO* DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE PLANTAS ENDÉMICAS MEXICANAS Y ENSAYO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE HOJAS DE *Cercocarpus macrophyllus* PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON POSIBLE ACTIVIDAD HERBICIDA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

CLAUDIA JAZMÍN MEIXUEIRO GALÁN



MÉXICO, D. F.

2008



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.

Sin duda las cosas caen por su propio peso. El reacomodo en el espacio para llegar al equilibrio después de haber sufrido una alteración en su entorno, siempre llega (Le Chatelier).

¿Que pasará con el intermediario si el catalizador no es presente al sustrato?

Ante dicha situación desfavorable y poco probable químicamente:

- ¿se espera que la reacción se lleve a cabo de forma lenta?
- ¿Que tome vías alternas con mayor gasto de energía, pero con la formación de su producto?
- ¿Perder ser parte de una función vital y entrar como precursor en otras vías con la formación de un metabolito secundario y así tener nuevamente una función específica en el organismo que lo produce?

¿Mecanismo de regulación o adaptación? así es la homeostasis de mi vida

"... la especie se ve forzada a adaptarse a su entorno..." ¿teoría de la supervivencia?

¿Y yo que soy fuerte o adaptable?

Gracias a Dios y a las oraciones de mi mamá y mi abuelita, sigo de pie y con muchas fuerzas para seguir siempre para adelante...

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por abrirme sus puertas para pertenecer a la máxima casa de estudios y permitirme desarrollarme tanto personal como profesionalmente dentro de sus instalaciones.

A la Facultad de Química y sus profesores:

Por ser mi segundo hogar y tener tantas vivencias en sus instalaciones que me han ayudado a forjarme como persona y a mis profesores por compartirme sus conocimientos y darme las herramientas que me ayudaran en mi vida laboral.

Con mucho cariño a Dra. Isabel Aguilar:

Por su paciencia, apoyo y ayuda en la parte fotoquímica, además de su ejemplo que va más allá del trabajo de laboratorio, como mujer, una lindísima y excelente persona.

Al Dr. Blas Lotina Hennsen:

Por darme la oportunidad de realizar mi tesis bajo su asesoría.

A la M.C. Beatriz King Díaz:

Por todo su apoyo, sus consejos, su tiempo y orientación en este presente trabajo.

A Q. Alejandrina Acosta:

Por su ayuda en la parte espectroscópica.

A los profesores Nelly Diego y Ricardo de Santiago:

Por la recolecta e identificación botánica de las plantas que hicieron posibles este trabajo.

Al PAIP 6290-03

Por su apoyo económico otorgado.

¡¡¡Puma de corazón!!!

Dedico y agradezco:

A Dios por estar conmigo en todo momento, darme la capacidad y las fuerzas para culminar esta etapa que representa el cariño de las buenas personas que me quieren, me apoyan y ocupan un lugar importante en mi vida

A mi mamá, por su amor tan grande y tan bonito que siempre me han dado fuerzas y animo para seguir adelante. Por ser mi ejemplo en fortaleza, perseverancia, amor, como mujer y como LA MEJOR MAMÁ

A mi abuelita, por todo su amor, sus cuidados, sus oraciones y sacrificios.

A Yaya, por brindarme su amistad, por enseñarme su ejemplo a seguir como una mujer excelente, y junto con Genaro, compartir conmigo sus momentos de alegría con la bebé, lo cual me ha hecho muy feliz.

A Karencita mostrarme nuevamente la sencillez de la vida, su inocencia genuina y darme muchos momentos divertidos y felices.

A mis hermanos Victor y Luis, por su apoyo, su confianza y brindarme su mano amiga cuando la he necesitado.

A Jcitos, por todos los momentos agradables que pasamos juntos en ésta facultad, por su cariño, su apoyo y todo lo que ha aportado a mi vida.

A mis amigas por compartir este regalo tan bonito que es la amistad y todo lo que en ella engloba; cariño, apoyo, comprensión, confianza, brindarme su mano para levantarme y su hombro para apoyarme cuando lo he necesitado, mil gracias y aunque solo agradezco esta etapa de mi vida sé que ellas trascenderán a más; Ale L, Angelita, Yukie, Chunly-Sonia y Tania.

A los Fragmentos de Okazaki, por aparecer en mi vida, llenarla de alegría y diversión, por los momentos ñoños e interesantes, por la fortaleza que han aportado a mi vida y por la confianza que tienen en mí que me llena de ánimos para seguir; Vic, Felis y Paco.

Con mucho a cariño a Vic, por brindarme su amistad tan bonita, sus consejos, sus enseñanzas ñoñas, su ayuda incondicional y principalmente por confiar en mí.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron en la Facultad de Química, por los momentos bonitos que juntos vivimos y por los momentos difíciles donde juntos salimos adelante; Silvia, Chispa, Lorens, Chavita, Lilo, las chochas (Bety, Marge, Angie, Sonia, Persy y Ale), Charangas y Oliver.

A Enrique (couch) por compartir conmigo su pasión, enseñarme a ser valiente, a no rendirme, levantarme y volverlo a intentar las veces que sean necesarias. Por ayudarme a hacer parte de mi sueño, realidad.

A mis amigas y compañeras de Gimnasia por compartir y convivir conmigo la mejor etapa de mi vida.

A todos los integrantes del Laboratorio 115, por que entre trabajo, diversión y compañerismo han sido mi mejor equipo de trabajo y los voy a extrañar mucho; Cristy, Aide, Yess, Bryan, Dan, Eric, Neto, Alonso y de una forma muy especial y con muchísimo cariño a Félix por haber sido mi héroe en este trabajo, por compartir conmigo su sencillez ante la vida y además ser mi amigo.

¡¡¡Juntos lo logramos!!!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

OBJETIVOS

DESARROLLO EXPERIMENTAL

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

APENDICES

1. INTRODUCCIÓN

El incremento de la población genera necesidades alimentarias proporcionales, esto sugiere que se debe buscar la manera de aumentar la productividad agrícola. La producción agrícola se ve afectada por la disminución de tierras fértiles debido al incremento del área urbana y por el crecimiento de malezas (Kogan A. et al 2003).

La Sociedad Norteamericana de Ciencia de las Malezas (WSSA) define a las malezas como aquellas plantas que crecen donde no son deseadas. Las malezas son consideradas actualmente como la plaga más importante que afectan en mayor proporción el rendimiento de los cultivos, las pérdidas que ocasionan son mayores a las que se producen debido a insectos y enfermedades. Las malezas interfieren con los cultivos porque compiten con éstos por luz, agua y nutrientes. Además reducen la calidad del producto cosechado, son hospederos de plagas y enfermedades e interfieren con las labores de cosecha. Por tal motivo, estas plagas deben ser controladas, ya que de lo contrario, los rendimientos de los cultivos se ven drásticamente afectados. Los herbicidas son plaguicidas que se utilizan para controlar las malezas (Kogan A. et al 2003).

La palabra herbicida proviene del latín *herba*, planta y *caedere*, que significa matar. Así, por su etimología, los herbicidas son productos químicos que se utilizan para matar plantas. Una mejor definición de herbicida corresponde a un producto químico que altera la fisiología de la planta por un periodo de tiempo relativamente largo, afectando severamente su crecimiento u ocasionando su muerte (Kogan A. et al 2003).

Actualmente aunque la mayoría de los herbicidas son altamente eficaces, muchos de ellos producen daños irreversibles al ecosistema, debido al alto grado de contaminación que ocasionan en suelos, aire y agua (Duke et al. 2000). La preocupación por una agricultura no contaminante ha llevado a prohibir o a restringir varios productos, promoviendo la búsqueda de nuevos herbicidas de origen natural.

Las plantas verdes producen miles de metabolitos secundarios. Las funciones específicas de éstos son desconocidas, se sabe que algunos son atractivos alimentarios para insectos y favorecen la polinización o la dispersión de semillas, o funcionan como compuestos de guerra química contra insectos, organismos patógenos y otras plantas con las que compiten. Estas interacciones son conocidas como alelopatía (Duke et al. 1987).

El uso de la alelopatía es un método alternativo para el control de malezas. La alelopatía es un fenómeno natural que se refiere a los efectos perjudiciales o benéficos que directa o indirectamente, son el resultado de la acción de compuestos químicos liberados por una planta y que ejercen su acción sobre otra. En todo fenómeno alelopático existe una planta (donador) que libera al medio ambiente por una vía determinada (lixiviación, descomposición de residuos, exudación o volatilización), compuestos químicos los cuales al ser incorporados en otra planta (receptora), provocan un efecto perjudicial o benéfico sobre la germinación, el crecimiento o el desarrollo de esta última. Estas sustancias se denominan aleloquímicos (Wu-H et al. 1998).

Los aleloquímicos son metabolitos secundarios o residuos de las rutas metabólicas principales que no desempeñan un papel esencial para la supervivencia de la planta.

El impacto de los aleloquímicos en la dinámica y en la producción de los mismos, debe conducirnos hacia metas ecológicas y hacia la búsqueda de mayor información que nos permita aprovechar dicho potencial.

Ya que México cuenta con una extraordinaria biodiversidad de plantas que indudablemente representan uno de los recursos naturales más importantes del mundo, se hace necesaria la investigación dirigida hacia la exploración de productos naturales con actividad herbicida (biodegradables y con baja toxicidad), para su conservación y aprovechamiento racional.

En el presente trabajo nos interesa identificar productos naturales aislados de plantas mexicanas con actividad alelopática, que puedan funcionar como herbicidas, que sean más amigables con el medio ambiente, animales y humanos, y que muestren nuevos sitios y mecanismos de acción.

Para el desarrollo de este proyecto de investigación, se emplearon plantas colectadas en el estado de Guerrero, por el grupo de trabajo de la M.C. Nelly Diego de la Facultad de Ciencias de la UNAM. En ensayos *in vivo* se determinaron las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II, de las plantas *Lolium multiflorum* (monocotiledónea) y *Trifolium alexandrinum* (eudicotiledónea) tratadas con extractos orgánicos (hexano, cloroformo y metanol) de las plantas recolectadas. De acuerdo a los resultados del ensayo *in vivo*, se escogió la planta *Cercocarpus macrophyllus* para realizar un estudio de fraccionamiento biodirigido y culminar con la caracterización bioquímica y química de uno o más compuestos puros responsables de la actividad biológica. El extracto hexánico de las hojas de la planta *Cercocarpus macrophyllus* presentó una mayor actividad en la inhibición de la síntesis de ATP medida en cloroplastos aislados de hojas de espinaca (*spinacea oleraceae L.*). Del bio-fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta, se obtuvieron 3 fracciones que presentaron actividad inhibitoria en la síntesis de ATP. Una de ellas cristalizó espontáneamente y se purificó por medio de recristalización, con los cristales puros se procedió a realizar la caracterización química del compuesto por medio de métodos espectroscópicos y espectrométricos elucidando la estructura del compuesto 3 β ,28-dihidroxiurs-12-eno (Uvaol). (Figura 1)

Para caracterizar el sitio y mecanismo de acción del compuesto aislado se ensayó su efecto en el flujo de electrones en sus tres condiciones: basal, fosforilante y desacoplado. Se encontró que el compuesto inhibió el transporte de electrones en las tres condiciones, los resultados indicaron que se comporta como inhibidor de la Reacción de Hill. Para localizar el sitio de inhibición de este compuesto, se ensayó su efecto en las reacciones parciales de la fotosíntesis. Los resultados indican que el compuesto uvaol, inhibe en el tramo de la cadena de

transporte de electrones del FSII, localizado entre P₆₈₀ a Q_B; ésto se comprobó midiendo la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII en cloroplastos aislados.

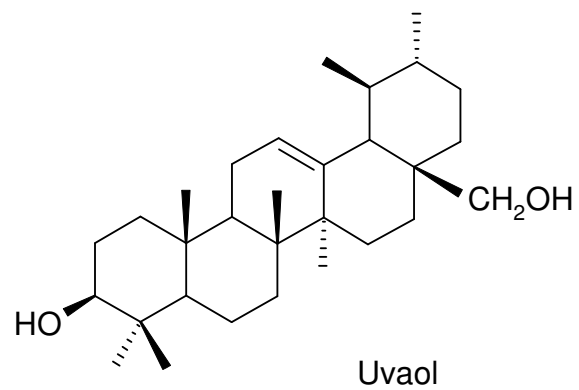


Figura 1. Estructura del compuesto 3 β ,28-dihidroxiurs-12-eno

1. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del género *Cercocarpus*

Cercocarpus es un género de cinco o seis especies de arbustos pequeños que suelen llegar a medir de 3 a 6 m y excepcionalmente hasta 13 m de altura. Pertenecen a la familia (*Rosaceae*), nativas del oeste de los Estados Unidos y del norte de México, se encuentra en regiones montañosas, desérticas y chaparrales. (Blauer et al. 1975, Davis and Brotherson 1991)

Se ha prestado considerable atención a la ecología de *Cercocarpus* porque las hojas siempre verdes que se encuentran en la mayoría de los miembros del género, tienen niveles altos de proteínas y son importantes para la vida silvestre en el invierno y el ganado. (Vander H., 2002)

El alto nivel de proteína que se encuentra en las hojas de *Cercocarpus* se debe a una asociación con *Frankia*, un microorganismo capaz de inducir la formación de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico. (Baker and Schwintzer 1990).

Esta asociación simbiótica producida entre la planta y la bacteria, da a la planta una gran ventaja sobre otras, porque su crecimiento no está limitado por la falta de nitrógeno y puede habitar en suelos pobres en nitrógeno. (Klemmedson 1979).

2.2 Generalidades de *Cercocarpus macrophyllus*.

Nombre Común: Lentisco

Nombre tepehuano: gigik

Nombre científico: [*Cercocarpus macrophyllus*](#)

Uso medicinal: Se toma el cocimiento de la corteza para vitaminar la sangre.

Composición química: No se conoce la composición química, ni la toxicidad

2.3 Taxonomía.

Dominio: [Eukaryota](#) Whittaker

Reino: [Plantae](#) Haeckel

División: [Magnoliophyta](#) Cronquist

Clase: [Magnoliopsida](#) Brongniart

Orden: [Rosales](#) Perleb

Familia: [Rosaceae](#) Adans

Tribu: [Cercocarpeae](#)

Género: [Cercocarpus](#) *macrophyllus* C. K. Schneid



Figura 2. *Cercocarpus macrophyllus*

2.4 Fotosíntesis

La fotosíntesis es la fijación de CO₂ impulsada por la luz, para formar carbohidratos y otras moléculas biológicas. En las plantas, la fotosíntesis tiene lugar en el cloroplasto, que consiste en una membrana interna y otra externa rodeando el estroma, una disolución concentrada de enzimas en la que se encuentra inmerso el sistema de membranas tilacoidales. La fotosíntesis tiene lugar en dos etapas: las llamadas reacciones de la fase luminosa, en las que la energía de la luz se utiliza para la síntesis de ATP y NADPH; y las reacciones de la fase oscura, en la que los productos de la fase luminosa se utilizan para impulsar la síntesis de carbohidratos a partir de CO₂ y H₂O. En la membrana tilacoidal se llevan a cabo las reacciones fotosintéticas de la fase luminosa, mientras que las reacciones de la fase oscura tienen lugar en el estroma.

La clorofila es el principal fotorreceptor de la fotosíntesis. Inicialmente, la luz es absorbida por un sistema de antenas receptoras de luz que constan de clorofila y pigmentos accesorios. La excitación resultante migra, por transferencia del excitón, hasta que alcanza la clorofila del centro de reacción, donde resulta atrapada.

En las plantas y cianobacterias, las reacciones de la fase luminosa tienen lugar en dos centros de reacción, el PSI y el PSII, que se encuentran “conectados” eléctricamente en serie. Ello permite al sistema generar una fuerza electromotriz suficiente para formar NADPH oxidando H_2O en una vía no cíclica, representada en un diagrama conocido como esquema Z (Figura 3). El PSII contiene un complejo de Mn que oxida 2 moléculas de H_2O para dar $4 H^+$ y O_2 . Los electrones del agua pasan de uno a uno, a través de un transportador, llamado Z caracterizado como un residuo de tirosina, hasta el centro de reacción P_{680} fotooxidado, el cual consta de una o dos moléculas de Chl *a*. El electrón que previamente fue expulsado de P_{680}^* se transfiere a una molécula de feofitina *a* y después a un complejo de plastoquinona-Fe (II) designado Q_A , seguidamente se transfieren dos electrones, de uno en uno, a una segunda molécula de plastoquinona, Q_B , que captura dos protones en la superficie del estroma de la membrana del tilacoide para formar el plastoquinol Q_BH_2 . El DCMU, así como muchos otros herbicidas de tipo urea, usados habitualmente, compiten con la plastoquinona por el sitio de unión de Q_B en PSII, explicándose por qué inhiben la fotosíntesis.

Los electrones almacenados en Q_BH_2 entran a un conjunto de proteínas integrales de membrana conocidas como complejo del citocromo *b6-f*, que transporta protones, probablemente a través de un ciclo Q, desde el estroma hacia el espacio tilacoidal. Los electrones se transfieren individualmente, mediante un transportador de plastocianina, directamente al pigmento fotooxidado del PSI, P_{700} , que absorbe los fotones y que está constituido por una única molécula de Chl *a*. El

electrón que fue liberado anteriormente por P_{700}^* , migra a través de una cadena de moléculas de Chl a y después lo hace a través de una cadena de moléculas de ferredoxina. El electrón puede volver, recorriendo un ciclo, a través del citocromo b_6 , al grupo de plastoquinonas, con lo que se translocan protones a través de la membrana tilacoidal. Alternativamente, el electrón puede reducir el $NADP^+$, en un proceso no cíclico mediado por la ferredoxina- $NADP^+$ reductasa. El ATP se sintetiza por acción de la CF_0CF_1 -ATP sintasa, en una reacción impulsada por la disipación del gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal.

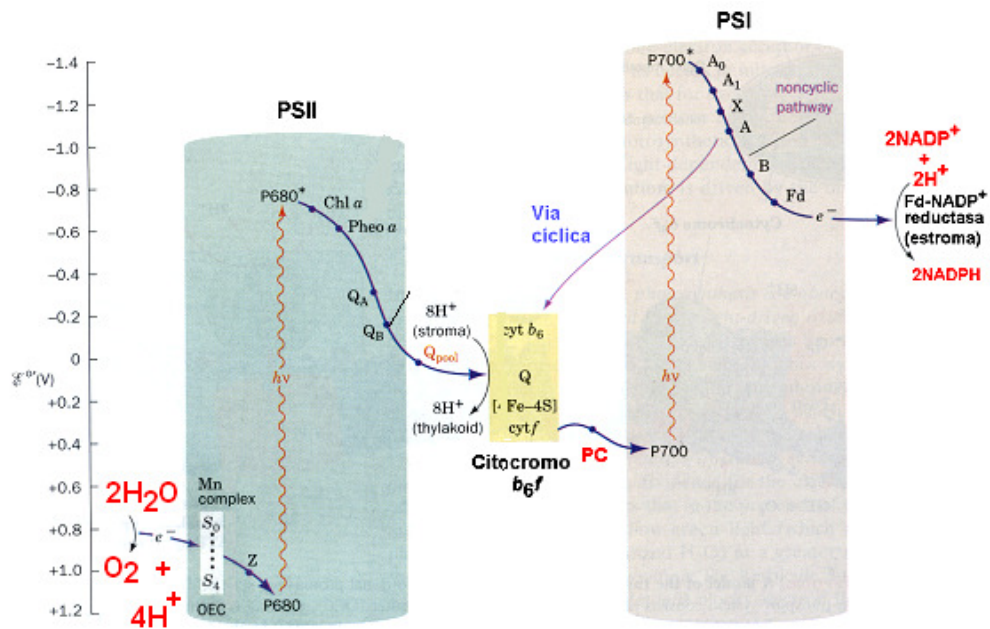


Figura 3. Diagrama del esquema Z de la fotosíntesis (tomado de Voet D. et al 1999)

El CO_2 , es fijado en las plantas y cianobacterias, mediante las reacciones fotosintéticas de la fase oscura, concretamente en el ciclo de Calvin.

2.5 Aceptores y donadores artificiales de electrones

Los aceptores y donadores de electrones artificiales son compuestos que efectúan reacciones oxidorreductoras con algún componente de la cadena de transporte en el cloroplasto. Los aceptores son reducidos en algún sitio de la cadena, ya sea a nivel del FSI o del FSII, y los donadores artificiales son oxidados también en varios sitios del sistema de transporte. La especificidad de los

aceptores o donadores artificiales de electrones por un sitio, depende de que su potencial redox sea adecuado, de modo que formen una pareja oxidorreductora con el acarreador, y de otras propiedades fisicoquímicas como solubilidad, polaridad y reactividad de estos compuestos. Estos compuestos se han utilizado como un modelo biológico para elucidar los componentes, la secuencia y la topología de la cadena transportadora de electrones en membranas biológicas (Lotina et al. 1986).

Las reacciones del transporte de electrones en la cadena oxidorreductora o reacción de Hill son dependientes de la luz y forman parte de la fotosíntesis, se pueden medir cuantificando la reducción o la disminución del estado oxidado de los aceptores artificiales, por métodos espectrofotométricos o midiendo los cambios de concentración de oxígeno que se desprende en el sistema al fotolizarse el agua. En el flujo cíclico de electrones, se mide la velocidad de síntesis de ATP asociada al transporte de electrones (Lotina et al. 1986).

La importancia del uso de aceptores, donadores e inhibidores del flujo de electrones radica en poder separar funcionalmente tramos de la cadena, así en el FSII los electrones fluyen del agua hasta Q o PQ en presencia de inhibidores como el DCMU o DBMIB, en combinación con aceptores como el DCPIP o donadores como el DPC. El flujo de electrones del FSI se separa inhibiendo el FSII en combinación con un donador como el $TMQH_2$ y un aceptor como el MV (Lotina et al. 1986) (Figura 4).

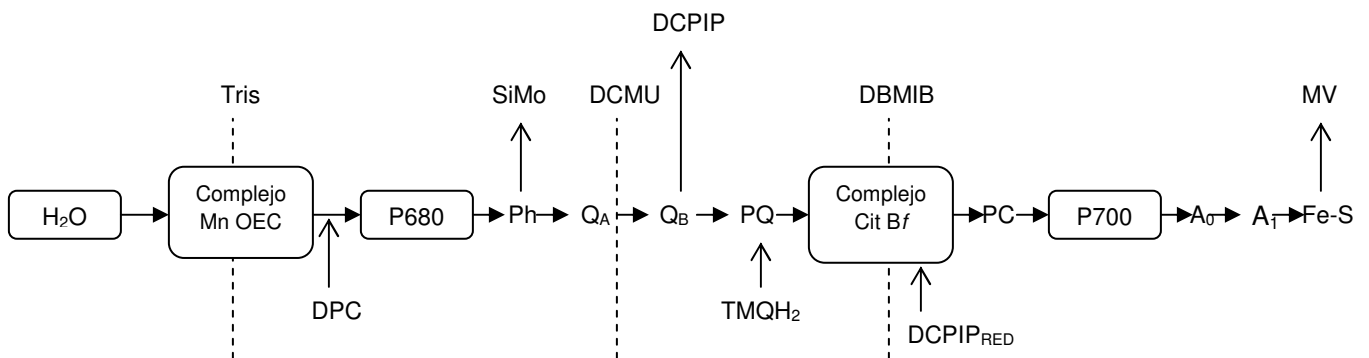
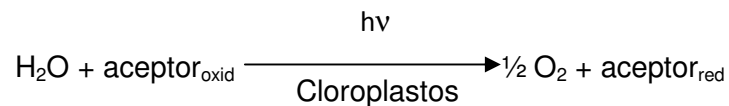


Figura 4. Cadena redox del transporte de electrones acíclico representada en forma lineal

2.6 Reacción de Hill

En 1937 Roberto Hill descubrió que el sitio donde se capta la radiación electromagnética del sol y se transforma en energía química, está localizado en los cloroplastos. Hill separó las llamadas reacciones oscuras de las reacciones luminosas, y descubrió que los cloroplastos iluminados desprenden oxígeno, aunque sin asimilación de CO₂, en presencia de una sal férrica adecuada. Finalmente descubrió que el NADP⁺ es el aceptor natural de electrones de la cadena redox fotosintética y éste reduce al CO₂ para la biosíntesis de carbohidratos (Lotina et al. 1986).

En honor a su descubridor, a las reacciones de reducción de aceptores de electrones, naturales y artificiales de los cloroplastos, se les llama reacciones de Hill y se definen como la foto-reducción de un aceptor natural o artificial de electrones a expensas de la fotooxidación del agua, a través de la cadena oxidoreductora, además se produce oxígeno, de acuerdo a la siguiente reacción:



2.7 Alelopatía

La alelopatía está definida como un fenómeno natural que se refiere a los efectos perjudiciales o benéficos que directa o indirectamente son el resultado de la acción de compuestos químicos, liberados por una planta ejerciendo su acción en otra. (Rice, 1984).

A la fecha la mayor parte de los efectos alelopáticos identificados han sido inhibitorios; esta inhibición fitotóxica es causada por sustancias activas que las plantas vivas expelen al ambiente a través de la raíz; exudación, lixiviación y volatilización, o pasivamente con la descomposición de los residuos de la planta. Estas sustancias fitotóxicas se llaman aleloquímicos. Los aleloquímicos son

considerados metabolitos secundarios o productos residuales de las vías metabólicas primarias en las plantas y que no parecen desempeñar un papel en este metabolismo, el cual es esencial para la supervivencia de la planta (Swain, 1977).

Las similitudes entre los aleloquímicos y los herbicidas sintéticos en la supresión de plantas, sugiere que la alelopatía es un método alternativo para el control de malezas.

2.8 Biosíntesis de los agentes alelopáticos

La mayoría de los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios derivados de las rutas del acetato-mevalonato o del ácido siquímico. De la ruta metabólica del acetato-mevalonato provienen: terpenos y esteroides. De la vía metabólica del ácido siquímico provienen: fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, el ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, sulfuros, glicósidos, alcaloides, cianhidrinas, algunos de los derivados de quinonas y taninos hidrolizables y condensados. Existen también compuestos (p. ej. los flavonoides) en cuya síntesis participan metabolitos de las dos rutas. Como es previsible, las concentraciones de estos compuestos en los tejidos varían según el ritmo de biosíntesis, almacenamiento y degradación. También son afectados por los balances internos de reguladores de crecimiento vegetal y otros factores bióticos y abióticos. Es importante tener presente que no siempre los detalles de la biosíntesis de estos compuestos son conocidos (Einhellig 1995) (Figura 5).

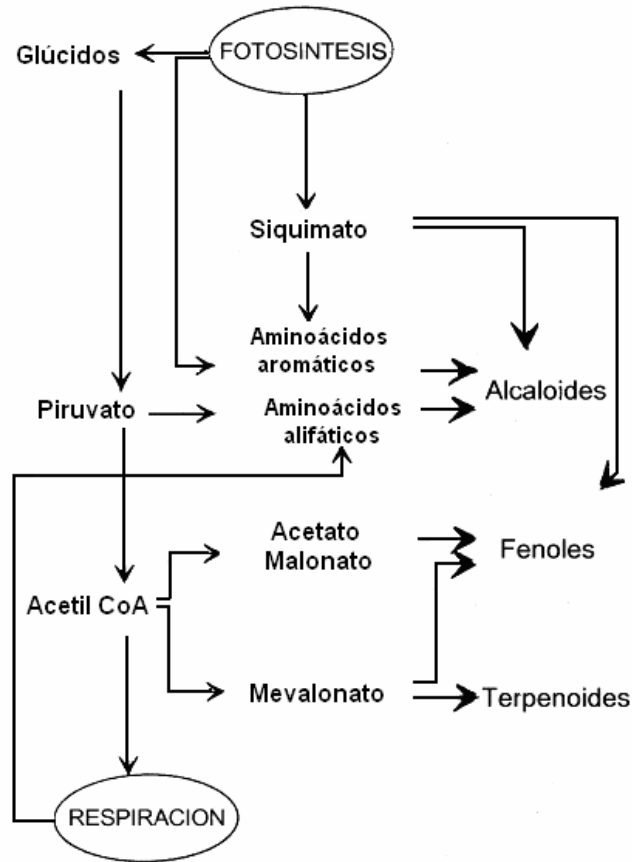


Figura 5. Ruta de biosíntesis de los aleloquímicos

2.9 Modo de liberación de los agentes alelopáticos

Una variedad de agentes alelopáticos son sintetizados en forma libre o conjugada con otras moléculas y almacenados en diferentes células de la planta, y son liberados al medio ambiente en respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos. Se sabe muy poco acerca de la liberación de los aleloquímicos del tejido vivo, incluyendo los modos de regulación o influencia del ambiente sobre estos procesos. Existen sustancias exudadas por las raíces de ciertas plantas, que no pueden aislarse de los tejidos radiculares de éstas. En sorgo, las p-benzoquinonas, conocidas como sorgoleone, son exudadas en forma abundante por la raíz. Sin embargo no han sido encontradas en los tejidos radiculares. De todas maneras, se puede afirmar que el modo de liberación de un agente alelopático depende de su naturaleza química (Einhellig 1995).

Las plantas superiores liberan regularmente, compuestos orgánicos que se volatilizan de sus superficies, a través de lixiviados de hojas y exudados de raíces. Eventualmente, los constituyentes químicos de todos los organismos son liberados al entorno a través de procesos de descomposición, incorporándose a la matriz del suelo. Por lo tanto existen 4 vías principales de liberación al entorno de los aleloquímicos: volatilización, lixiviación, biodegradación y exudación (Wu-H et al. 1998) (Figura 6).

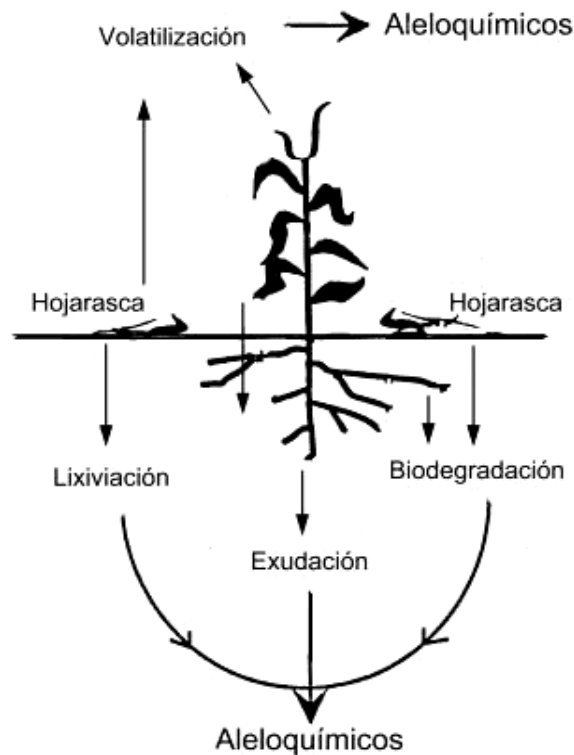


Figura 6. Vías de liberación de agentes alelopáticos

2.10 Fluorescencia de la clorofila *a*

La fluorescencia ha jugado un papel principal en la elucidación de muchos aspectos de la organización y el funcionamiento de la membrana tilacoidal.

La energía luminosa es absorbida por moléculas de clorofila *a* y *b* para la fotosíntesis. Sin embargo, una porción de la luz absorbida se pierde como calor o

por reemisión como fluorescencia. Un fotón de luz roja (670 nm) contiene suficiente energía para excitar a una molécula de clorofila *a* a su primer estado excitado, llamado singulete (Figura 7). 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, lo que sucede en cerca de 10^{-8} s, durante este periodo 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 I, formando un aceptor reducido I⁻ lo que comprende el primer paso de la fotosíntesis. Si la separación de carga no se lleva a cabo, el electrón excitado regresa al estado basal y la energía absorbida es liberada como calor y/o fluorescencia. La relación entre los tres procesos, fotoquímico (P), fluorescencia (F) y calor (desactivación por la radiación, D) es expresada matemáticamente usando constantes de velocidad de excitación: vía fotoquímica, kP; vía fluorescencia kF y vía calor, kD. El número total de excitaciones por segundo es:

$$(kP + kF + kD)n$$

donde n es el número de moléculas de clorofila.

Bajo condiciones de iluminación, cerca del 97% de la luz absorbida es utilizada para realizar trabajo fotoquímico, 2.5% es transformado en calor y 0.5% es re-emitido como fluorescencia. Si todos los centros de reacción están reducidos, del 95 al 97% de la energía absorbida es desactivada como calor y del 2.5 al 5% vía fluorescencia.

La fluorescencia de la clorofila es roja debido a la diferencia de energía entre el nivel basal y el primer nivel excitado, y es igual a la energía de un fotón de luz roja (Bolhár-Nordenkampf et al. 1993).

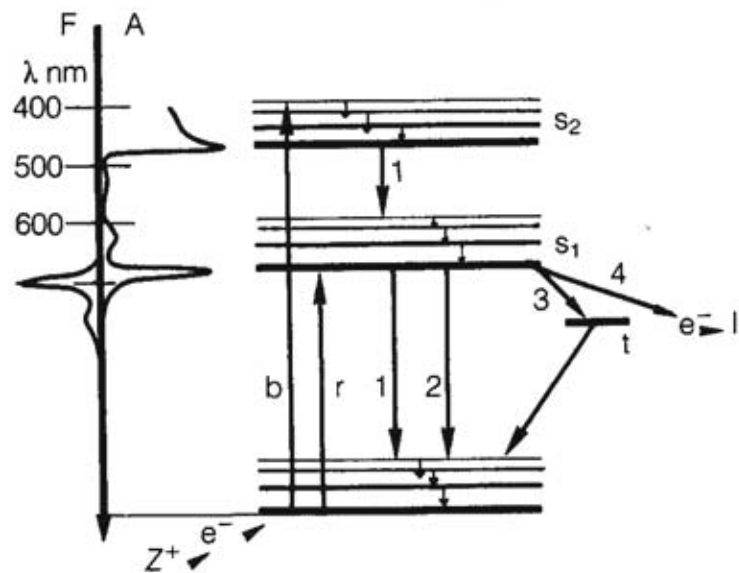


Figura 7. Diagrama de niveles de energía para la clorofila; espectro de la fluorescencia, F; espectro de absorbancia, A; fotón azul, b; fotón rojo, r; conversión interna (kd) 1; fluorescencia (kf), 2; cruzamiento inter-sistema, 3; separación de carga (kP), 4; aceptor de electrones intermediario de FSII, I⁻; estados singulete, s₁, s₂; estado triplete, t; donador de electrones desde el sistema de fotólisis de agua del FSII.

Al iluminar con luz continua las hojas adaptadas a la oscuridad o una suspensión de hojas de plantas superiores, algas o cianobacterias, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila *a*, a estos cambios se les denomina inducción de la fluorescencia o curva de inducción de la fluorescencia, también llamada *curva de Kaustski* (Strasser et al. 1995). A las diferentes fases de la curva de inducción de la fluorescencia se les denomina como OJIP (Figura 8). El aumento de la fluorescencia desde O hasta P ocurre durante el primer segundo de iluminación y es llamada la "fase rápida". La fase lenta es después de P y ocurre algunos minutos antes de llegar a su fase terminal. La fase rápida está relacionada con los procesos primarios del FSII, mientras que la fase lenta está principalmente relacionada a las interacciones entre los procesos de la membrana tilacoidal y los procesos metabólicos en el estroma.

La cinética de la curva de inducción de la fluorescencia de la fase rápida ha sido estudiada por Delosme R (1971), las características de esta fase con relación a la luz y a la temperatura, sugiere que la fase O-J esta controlada por la separación de carga. La fluorescencia variable relativa en un tiempo t es definida como:

$V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$. Esta expresión experimental es una medida de la fracción del aceptor de electrones Q_A que esta en su estado reducido.

Cuando se agrega DCMU, hay un inmediato aumento de la fluorescencia en la fase rápida, la razón de que esto ocurra es debido a que el DCMU bloquea el flujo de electrones después del aceptor primario del FSII (Q_A^-), es decir, inhibe la reoxidación de Q_A^- (Strasser et al. 1995)

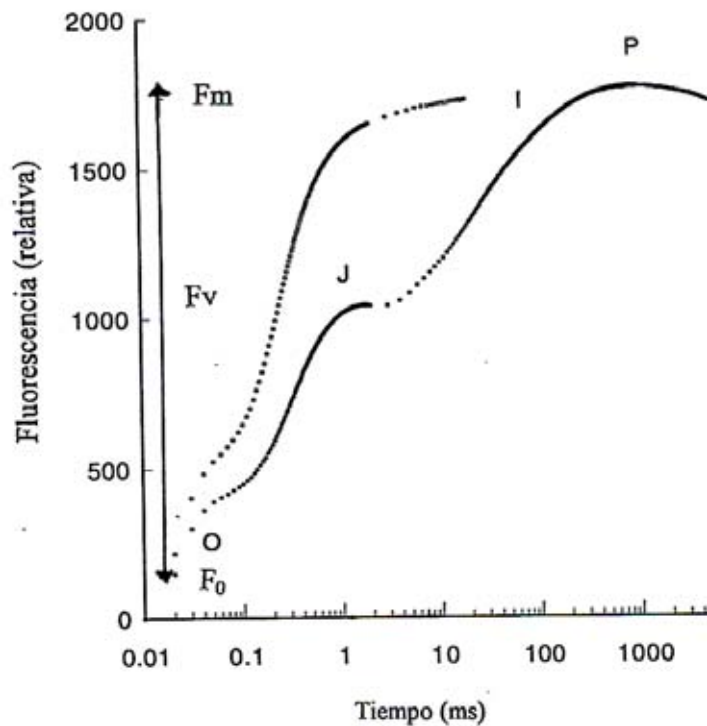


Figura 8. Curva de inducción de la fluorescencia, o curva de Kautsky de cloroplastos adaptados a la oscuridad por 30 minutos. F₀, fluorescencia inicial mínima; F_v, fluorescencia variable; F_m fluorescencia variable máxima. La curva de abajo es el control, la curva superior son cloroplastos dañados en el lado aceptor del FSII con 50 μM de DCMU.

2.11 Terpenoides

2.11.1 Ruta del acetato-mevalonato y ruta DOXP (1-desoxixilulosa-5-fosfato)

A través de esta ruta, se forman todas las sustancias de naturaleza terpenoide y esteroidal. Estos metabolitos se sintetizan a partir de unidades de cinco átomos de carbono (unidad isopreno). Las unidades de isopreno bioquímicamente activas que están relacionadas con la formación de los terpenoides, son el DMAPP y el IPP (Figura 9). Estas unidades de isopreno se forman en la naturaleza por medio de dos vías distintas, una a partir del AM, que es un producto del metabolismo del acetato, y la otra a partir de desoxixilulosa fosfato, que es formada a partir de ácido pirúvico y gliceraldehído-3-fosfato, siendo ambos intermediarios de la ruta de la glucólisis.

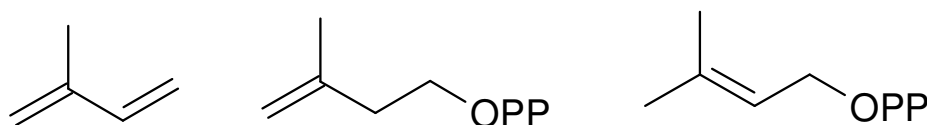


Figura 9. Estructuras del isopreno, IPP y DMAPP

Una vez formada la unidad C₅, prosigue la síntesis de los terpenoides por condensaciones “cabeza-cola” del IPP con el DMAPP, para dar el pirofosfato de geranil (GPP), el cual es precursor de los monoterpenoides. Cuando el GPP se condensa también en forma “cabeza-cola” con otra unidad de IPP se genera el pirofosfato de farnesil (FPP), precursor de los sesquiterpenos y del escualeno (precursor general de los triterpenoides y esteroides). Los diterpenoides, se biosintetizan a partir del pirofosfato de geranil-geranil (GGPP), el cual resulta de la condensación del FPP con una unidad de IPP (Figura 10).

Dependiendo de cuantas unidades de isopreno conforman a los terpenoides, estos se clasifican en hemiterpenoides, monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, sestertepenoides, triterpenoides,

tetraterpenoides y politerpenoides; de una, dos, tres, cuatro, seis, ocho o más unidades de isopreno de manera respectiva (Dewick, 2002; Uddin, 1994).

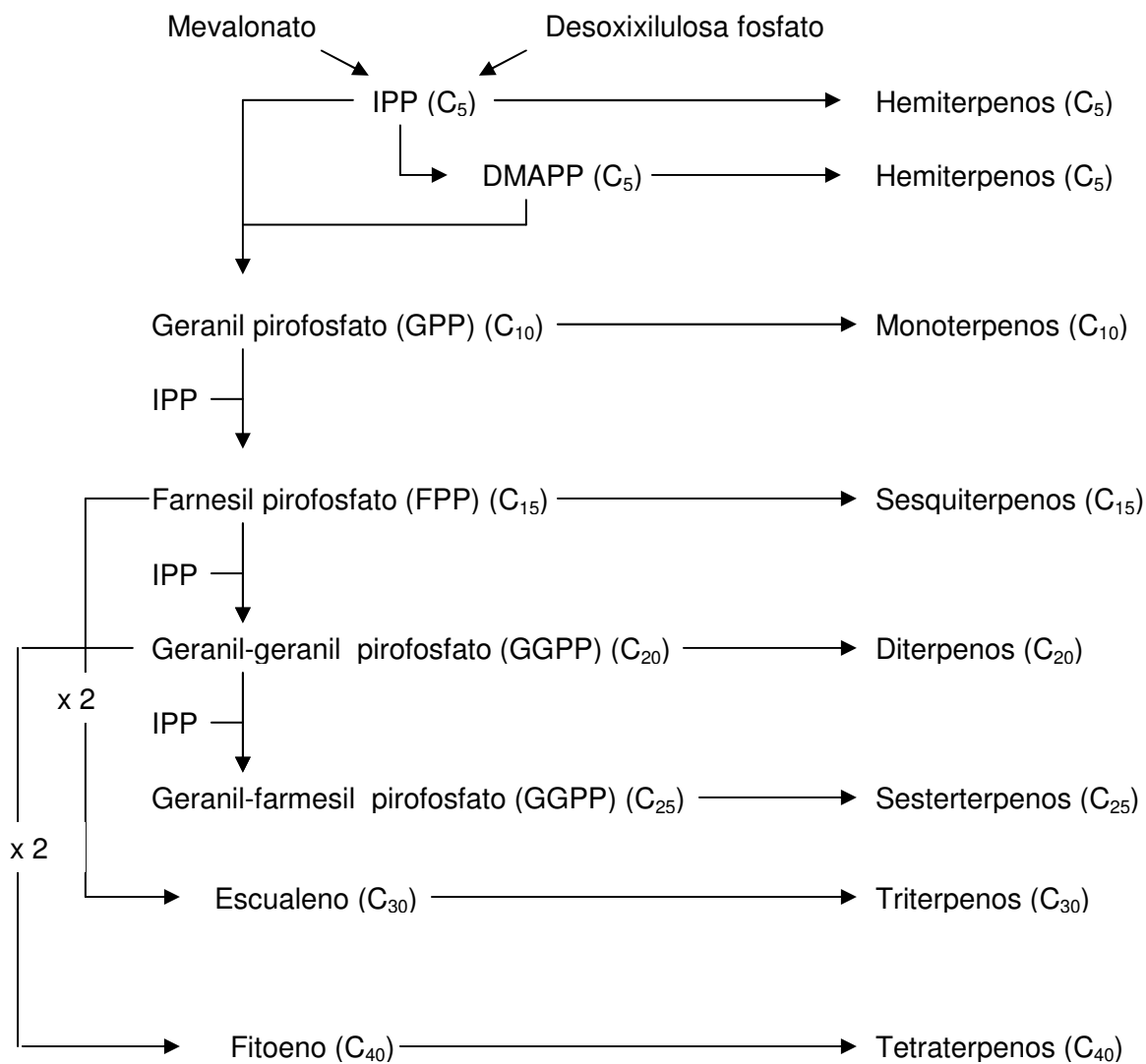


Figura 10. Formación de terpenos a partir de DMAPP e IPP

2.11.2 Triterpenoides

Como se aprecia en la Figura 10, los triterpenoides se conforman de seis unidades de isopreno, por lo que su estructura base cuenta con 30 átomos de carbono. Tienen como precursor inicial al escualeno (Figura 11), el cual se forma a

partir de la condensación cola-cola de dos unidades de pirofosfato de farnesilo, y da origen al lanosterol y al cicloartenol, precursores a su vez de esteroides en animales y plantas respectivamente.



Figura 11. Estructura del escualeno

En el caso de los triterpenos pentacíclicos, el escualeno da origen al catión damarenilo, a partir del cual se forman el lupenol y el taraxasterol, entre otros precursores de las distintas familias.

Dentro de los triterpenoides se encuentran distintas familias de compuestos, como los lupanos, oleananos, ursanos y taraxeranos, que a pesar de ser similares entre sí, presentan ciertas diferencias que los hacen distinguibles. (Dewick, 2002; Uddin, 1994).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos principales

- Evaluación *in vivo* de extractos orgánicos obtenidos de plantas endémicas mexicanas con posible actividad alelopática sobre plantas mono y eudicotiledóneas.
- Por medio de un estudio sistemático y biodirigido, obtener de las hojas de *Cercocarpus macrophyllus* metabolitos secundarios con posible actividad alelopática.

3.2 Objetivos particulares

- Obtener extractos orgánicos con disolventes de diferentes polaridades (hexano, cloroformo y metanol) de las diferentes partes de las plantas (hojas y tallos), colectadas en el Estado de Guerrero, México (Tabla 1).
- Ensayar los extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos en plantas mono y eudicotiledóneas.
- Determinación de la fluorescencia de clorofila *a* del FSII *in vivo* y biomasa seca.
- Por medio del fraccionamiento biodirigido a partir del extracto hexánico de las hojas de la planta *Cercocarpus macrophyllus*, obtener metabolitos secundarios con posible actividad herbicida.
- Caracterizar químicamente los metabolitos aislados por medio de métodos espectrométricos y espectroscópicos.
- Caracterizar bioquímicamente los metabolitos aislados como posibles herbicidas potenciales a través de su actividad en la síntesis de ATP, transporte de electrones, reacciones parciales y medición de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Ensayo *in vivo* de plantas mono y eudicotiledóneas

4.1.1 Obtención del material vegetal

Se utilizaron plantas recolectadas en el estado de Guerrero el 25 de febrero del 2004 (Tabla 1) y su identificación botánica fue realizada por la M.C. Nelly Diego y el M.C. Ricardo de Santiago, del Laboratorio de plantas vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM. El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y se separaron en sus partes aéreas (hojas y tallos), posteriormente se molieron hasta obtener un pulverizado.

Tabla 1. Plantas colectadas en el Estado de Guerrero.

Familia	Genero y Especie
Anacardiaceae	<i>Rhus oaxacana</i> Loes.
Rosaceae	<i>Cercocarpus macrophyllus</i> C. K. Schneid
Convolvulaceae	<i>Ipomoea murucoides</i> Roem & Schult.
Lamiaceae	<i>Xylosma flexuosa</i> Hemsl.
Apocynaceae	<i>Cascabela thevetioides</i> Lippold.
Euphorbiaceae	<i>Pendilanthus calcaratus</i> Schtdl.
Sapotaceae	<i>Sideroxylon</i> sp.
Rosaceae	<i>Prunus virginianus</i>

4.1.2 Obtención preliminar de Extractos

Una muestra del material vegetal (2 g) de cada planta, se extrajo por el método de maceración a temperatura ambiente con 50 mL de hexano durante 48 horas. El disolvente fue eliminado por destilación a presión reducida. Posteriormente el material se sometió a dos maceraciones adicionales, utilizando cloroformo y metanol, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el extracto hexánico (Diagrama 1). De esta forma se obtuvo el extracto hexánico, clorofórmico y metanólico de las hojas y tallos de las plantas de la tabla 1.

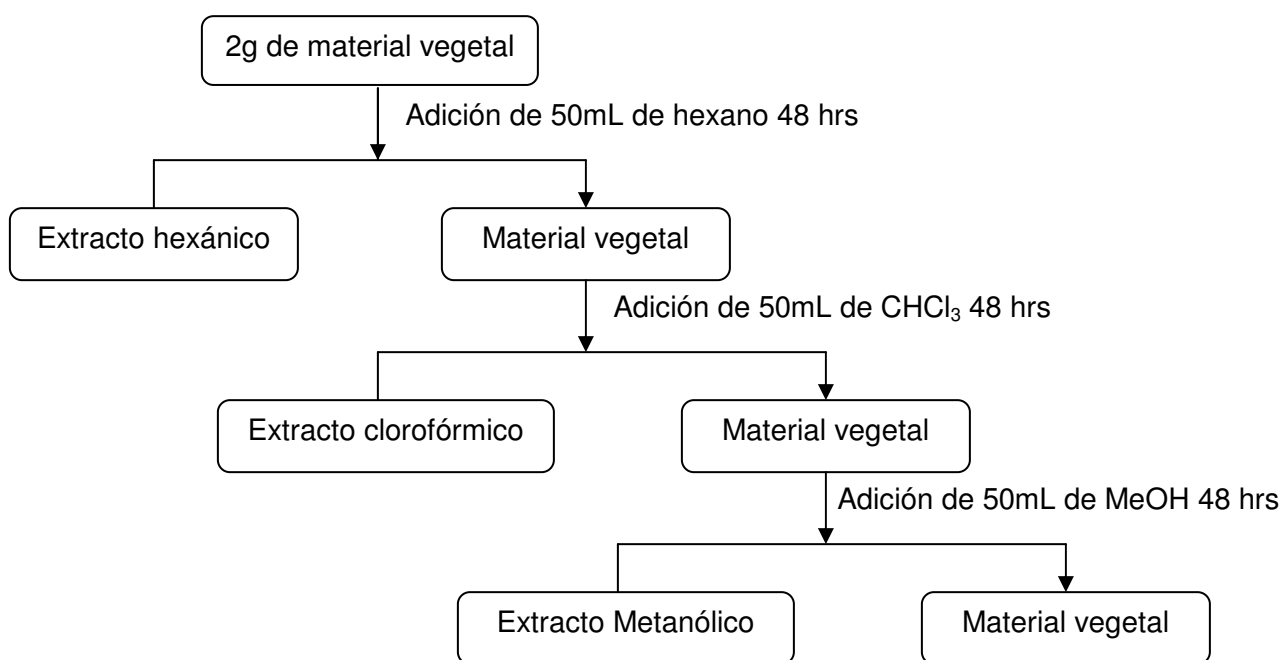


Diagrama 1. Obtención de los extractos

4.1.3 Siembra de semillas de *Lolium multiflorum* (pasto) y *Trifolium alexandrinum* (trébol).

Se sembraron 25 semillas de dos especies de plantas mono y eudicotiledóneas *L. multiflorum* (pasto) y *T. alexandrinum* (trébol) respectivamente,

en macetas del mismo tamaño y a la misma profundidad. Se regaron cada tercer día y se mantuvieron en el invernadero a una temperatura aproximada 30 °C, con iluminación normal día/noche (González et al. 2005).

4.1.4 Tratamiento de las plantas *Lolium multiflorum* y *Trifolium alexandrinum*.

Después de 15 días de crecimiento, las plantas fueron seleccionadas por su uniformidad en tamaño, se dividieron en dos grupos, uno control y uno experimental. Las plantas del grupo experimental se rociaron manualmente con soluciones de cada uno de los extractos, a concentraciones de 10 y 100 ppm. Las soluciones se prepararon con 10 mg de cada uno de los extractos secos disueltos en 1 mL de Dimetil-sulfóxido 99.5% GC (DMSO) marca Sigma, obteniendo una concentración de 10,000 ppm de extracto. A partir de esta solución, se tomaron alícuotas para obtener concentraciones finales de 10 ppm y 100 ppm en agua, equivalentes a 0.1 y 1.0% de DMSO y se les agregó 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. El tratamiento para los grupos control fue: a) tratadas con agua (control negativo), b) con DMSO al 0.1 y 1.0% (para comprobar que el disolvente no es activo), c) tratadas con Tween 20R marca Sigma, al 0.05% (para comprobar que el coadyuvante no tiene un efecto significativo) y d) DCMU 10 μ M (herbicida usado como control positivo) (González et al. 2005).

4.1.5 Medición de la emisión de fluorescencia de la Chl *a* del FSII

A las 24, 48 y 72 horas después de haber asperjado las plantas se midió la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* en las hojas de las plantas, con un fluorómetro marca Hansatech, modelo Handy PEA (Plant Efficient Analyzer), (previo a la medición, las hojas se adaptaron a la oscuridad por un periodo de 5 minutos para asegurar que los componentes de la maquinaria fotosintética

estuvieran oxidados). Mediante una fuente de 3 fotodiodos, se aplicó luz de longitud de onda de 680 nm con una densidad de flujo fotónico de $3000 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la duración del pulso de luz fue de dos segundos y simultáneamente se registró la fluorescencia del FSII con un fotodetector (Figura 12).

A partir de los datos de la cinética de fluorescencia, se obtuvieron los siguientes parámetros: Fluorescencia mínima (F_o), que denota la cantidad de energía captada por los pigmentos antena cuando los centros de reacción permanecen abiertos; fluorescencia máxima (F_m), indica la cantidad de los centros de reacción cerrados; fluorescencia variable (F_v), se obtiene como $F_m - F_o$; eficiencia de la fotoquímica primaria (F_v/F_m), independiente al área de la hoja; área sobre la curva de fluorescencia entre F_o y F_m que es proporcional al tamaño del pool de quinonas (Q_A) en el lado aceptor del FSII. (Strasser, et. al 2000). Los datos se procesaron con los programas Handy PEA y las cinéticas de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* se normalizaron con el programa Biolyzer (Maldonado-Rodrigues, 2002).



Figura 12. Medición de la fluorescencia de la Chl *a* *in vivo*

4.1.6 Determinación de la biomasa seca

Después de 15 días del tratamiento con los extractos, las plantas se cosecharon desde la raíz y se secaron a una temperatura de 30° C hasta obtener un peso constante, después se determinó la biomasa seca (Diagrama 2).

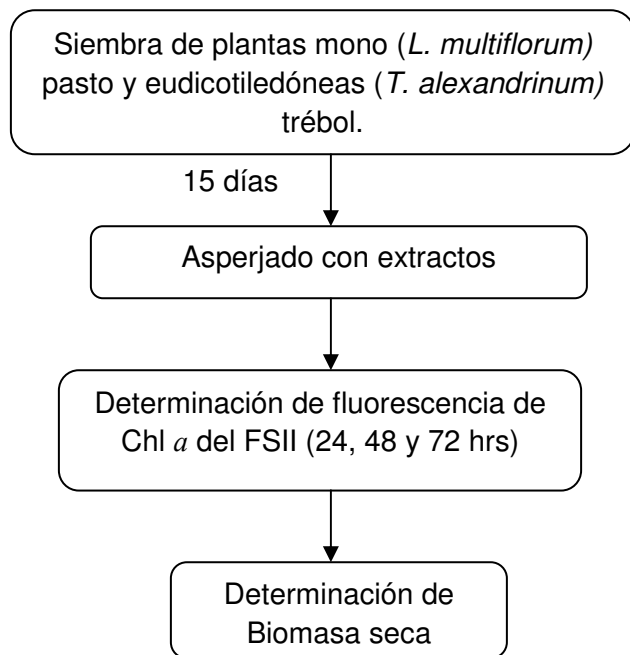


Diagrama 2. Determinación de la fluorescencia de la Chl *a in vivo* y de la biomasa seca.

4.2 Ensayo biodirigido de la planta *Cercocarpus macrophyllus*

4.2.1 Obtención y análisis cromatográfico del extracto hexánico de hojas de *Cercocarpus macrophyllus*

El pulverizado de las hojas secas de *C. macrophyllus* (1.36 Kg) fue sometido a extracción exhaustiva con hexano, obteniéndose 16.9 g de extracto seco. El extracto seco se disolvió en hexano y se le agregó la punta de la espátula de carbón activado y se filtró al vacío a través de celita, con el fin de quitar algunos pigmentos, después se dejó secar. Se adsorbieron 15.82 g del extracto hexánico en 79 g de sílica gel, la mezcla homogénea se fraccionó en una columna abierta

cromatográfica de sílica gel (273 g) eluyéndose con un gradiente hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad y después con acetona, obteniendo un total de 425 fracciones de 100 mL. Las fracciones se reunieron de acuerdo a su similitud en cromatoplaça obteniéndose un total de 15 fracciones.

Para el fraccionamiento de los extractos y la separación de fracciones se utilizaron; gel de sílice para columna 60 Merck, tamaño de malla de 0.0063-0.200 mm y para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de aluminio recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílice gel 60 F254, Merck). Para el revelado de estas placas se utilizó Sulfato cérico amoniacal (Apéndice I). El diagrama 3 muestra el procedimiento de estudio biodirigido de *C. macrophyllus*

4.2.2 Purificación de la Fracción 10 y análisis espectroscópicos y espectrométricos del Uvaol

En la fracción 10 se observó la presencia de un compuesto blanco que cristalizó espontáneamente. Esta fracción se purificó mediante recristalización con hexano/AcOEt, obteniéndose un compuesto cristalino blanco y translúcido. El análisis espectrométrico se describe en discusión de resultados (Tabla 8) y se realizó en la Unidad de Servicios Analíticos y de Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Los análisis de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla, Perkin-Elmer, modelo 1605, en película. El espectro de masas, en un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases marca JEOL SX, modelo 102-A, Hewlett Packard. Los análisis de RMN-¹H y RMN¹³C se determinaron en un espectrómetro analítico Varian Inova.

El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher Johns y se reporta sin corregir.

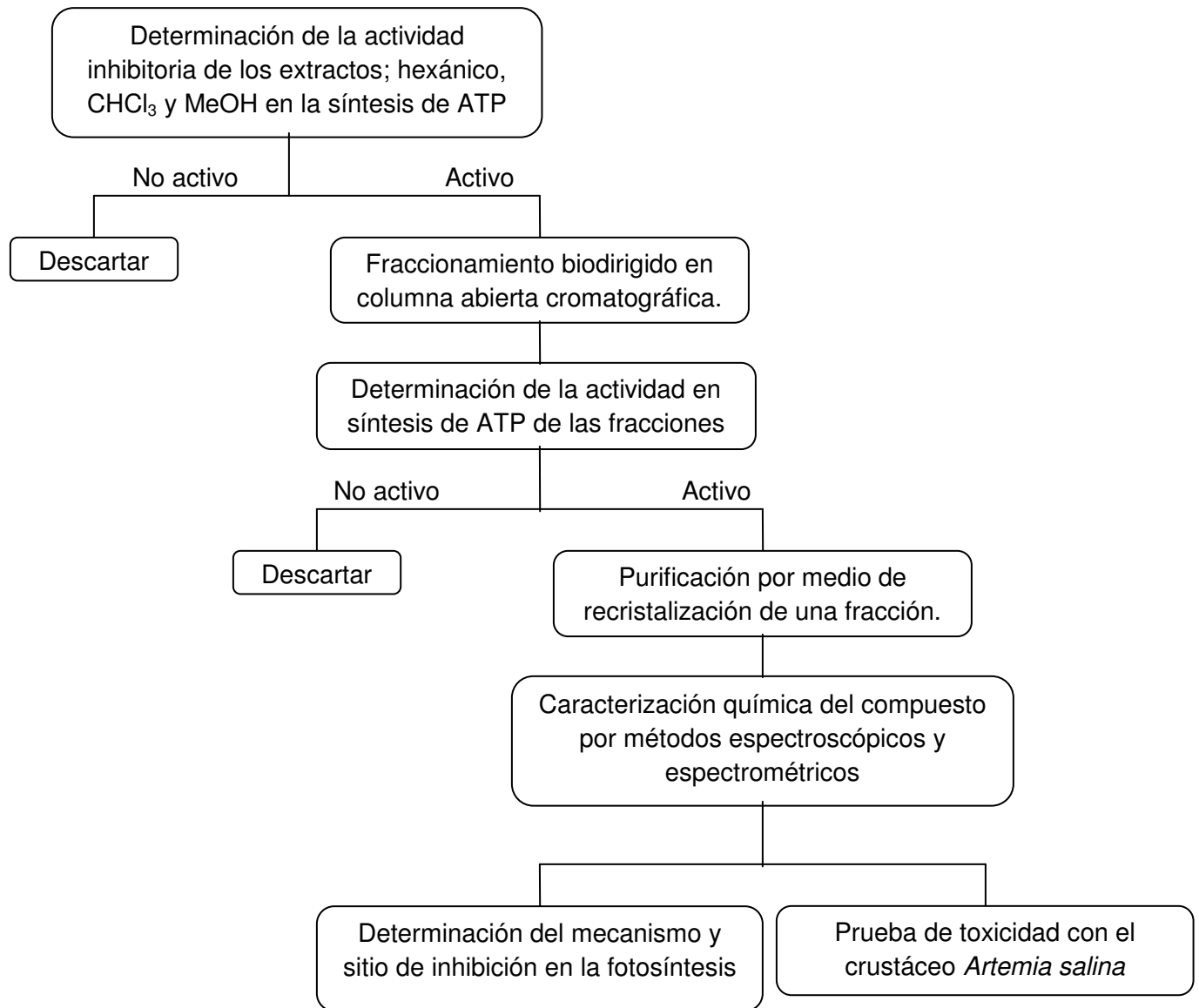


Diagrama 3. Ensayo biodirigido del extracto hexánico de hojas de *C. macrophyllus*

4.3 Bioensayos.

4.3.1 Aislamiento de cloroplastos de hojas de espinacas

NOTA: La siguiente metodología se realizó en condiciones de Oscuridad.

Los cloroplastos se aislaron de hojas de espinaca (*spinacea oleraceae L.*). Se escogieron aproximadamente 40 g de hojas frescas y turgentes, que no

estuvieran maltratadas ni rotas, las cuales se lavaron con mucho cuidado, y se les quitó el exceso de agua colocándolas en hojas de papel, se separaron la nervadura y la punta de la hoja, se cortaron cuidadosamente en trozos pequeños y se molieron en la licuadora (Modelo L-21, Osterizer) con 250 mL de medio de aislamiento (apéndice I) a 4°C. La molienda se efectuó cuidadosamente, para no dañar los cloroplastos mecánicamente. Una vez molidas las hojas de espinacas se filtraron a través de 8 capas de gasa, recibiendo el filtrado en tubos de centrifuga, los cuales previamente se mantuvieron sumergidos en un baño de hielo. Los cloroplastos se sedimentaron por centrifugación a 4000 rpm a 4°C (centrifuga Modelo Sorval Super T21, DUPONT) durante 5 min, posteriormente se resuspendieron en 1 ml del mismo medio y la suspensión se guardo en la oscuridad a 4°C por 1 hora.

4.3.2 Cuantificación de Clorofila

La clorofila se cuantificó según el método de Arnon (1949), el cual consiste en aforar con acetona a un volumen de 5 mL 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 un centrifuga clínica (centrífuga modelo EBA 8S, Hettich) 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:

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

En donde: $[\text{Chl}] = \mu\text{g de clorofila por mL}$

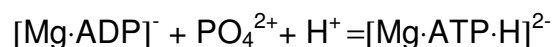
8.05 y 20.29 = constantes establecidas experimentalmente a partir de los coeficientes de extinción para cada una de las longitudes de onda.

A = Absorbancia a las longitudes de onda indicadas.

4.3.3 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 un aparato Gilson.

En la cubeta de reacción se agregaron 3 mL de medio bomba (Apéndice I), 30 μL de ADP, 30 μL de fosfato inorgánico (Pi), (se ajustó el pH a 8.0) y 60 μg Chl, 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).

4.3.4 Medición de la velocidad del transporte de electrones

Los transportes descritos se observan en la Figura 13.

El flujo de electrones fotosintético no cíclico (1), se monitoreó en presencia de metilviológeno (MV) que es un aceptor artificial de electrones, 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 I) y 60 μg de Chl a la cubeta de reacción y se iluminó por 3 minutos.

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 Pi.

Para la medición del *transporte de electrones desacoplado* se utilizó el mismo medio que para el transporte basal más 6 mM de NH₄Cl (Morales-Flores et al., 2007; Saha et al. 1971).

4.3.5 Medición de la velocidad del transporte de electrones del FSII.

El transporte de electrones desacoplado del FSII (2), se midió polarográficamente de H₂O a DCPIP (Isawa 1980) 3 mL de medio de transporte de electrones para FSII (Apéndice 1) se agregó a la cubeta de reacción y 1 μM de DBMIB como inhibidor del paso de electrones al FSI

4.3.6 Medición de la velocidad del transporte de electrones del FSI.

El flujo de electrones desacoplado del FSI (3) se determinó de manera similar al transporte de electrones basal empleando 3 mL del medio de transporte de electrones para fotosistema 1 (Apéndice 1) y 10 μM de DCMU (Allen y Holmes 1986).

4.3.7 Medición de las reacciones parciales del FSII.

La reacción parcial de H₂O a SiMo (4), se midió empleando 3 mL del medio de transporte de electrones sin MV más 6 mM de NHCl₄, 200 μM de SiMo y 10 μM de DCMU (Hauska et al. 1977)

La reacción parcial de DPC a DCPIP (5), se midió empleando cloroplastos tratados con Tris 0.8 M pH 8.0, el cual inhibe la enzima que fotoliza el agua. El tratamiento de los cloroplastos con Tris se llevó a cabo en la oscuridad durante 30 minutos a 4° C, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en una centrífuga

Sorvall Super T21 por 1 minuto y se resuspendieron en el medio de aislamiento (Rickert et al. 1991). En una celda espectrofotométrica de 3 mL, se colocaron 3 mL del de medio de transporte de electrones sin MV (Apéndice 1), mas 6 mM de NH_4Cl , 200 μM DPC, 100 μM DCPIP y 45 μg Chl, se midió en el espectrofotómetro a 600 nm; posteriormente se iluminó por 2 minutos y se midió nuevamente a la misma longitud de onda. El blanco utilizado fue la misma mezcla de reacción sin DCPIP.

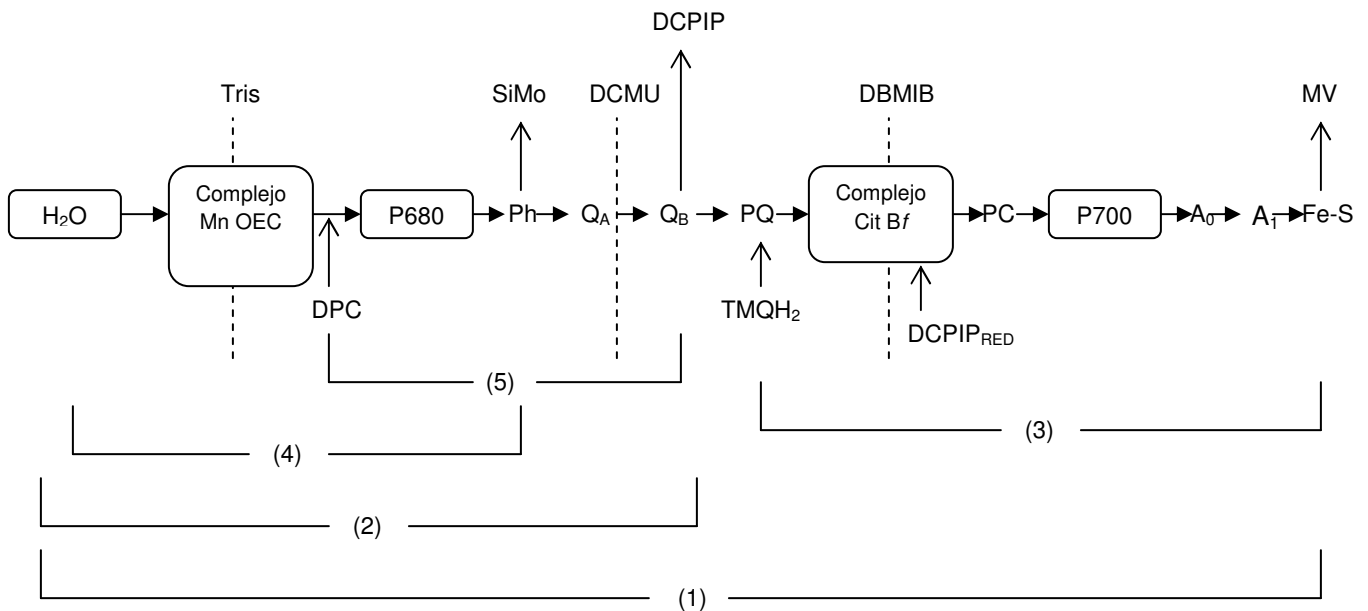


Figura 13. Transporte de electrones en cloroplastos, los sitios de inhibición se muestran con líneas punteadas y los sitios de donación y aceptación de electrones con flechas.

4.3.8 Fluorescencia de la Chl α del FSII en cloroplastos aislados.

Alícuotas que contenían 15 μg de clorofila se transfirieron por gravedad sobre papel filtro (1cm^2) con un aparato Dot-blot (bio-rad USA) para asegurar una distribución homogénea y reproducible de la gota en el papel. Los cloroplastos infiltrados se introdujeron inmediatamente a viales que contenían 3 mL de medio de transporte de electrones con MV, y en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos ensayados, empleando como controles positivos DCMU y cloroplastos tratados con 0.8 M Tris pH 8.0 (ver reacción parcial DPC a DCPIP), los cuales se incubaron por 5 minutos en la oscuridad. Las curvas de inducción de

fluorescencia de la clorofila *a*, se midieron a temperatura ambiente con un aparato Hansatech Fluorescence Handy PEA (Strasser et al. 1995). El análisis cinético de la fluorescencia se llevo a cabo con el programa biolyser obteniendo los siguientes parámetros: PHI(Po), el quantum yield e indica la eficiencia del FSII para reducir el pool de plastoquinonas = $(1-F_0/F_m)$; dV/dt_0 (Mo), indica el funcionamiento de la enzima que fotoliza el agua (OEC) = $4[(F_{300}-F_0)/(F_m-F_0)]$; V_J , fluorescencia variable a los 2 ms = $(F_J-F_0)/(F_m-F_0)$; (ABS/RC), la absorción de fotones por centro de reacción activo, tamaño de la antena = $(Mo/V_J)/PHI(Po)$; (ETo/RC), el transporte de electrones por centro de reacción activo = $(Mo/V_J)(1-V_J)$; (Dlo/RC), es la disipación no fotoquímica de la energía en forma de calor por centro de reacción activo = $ABS/RC - (Mo/V_J)$; (RC/CS), es la cantidad de centros de reacción de FSII funcionales = $F_m \cdot PHI(Po) \cdot V_J/Mo$; Sm, área total normalizada sobre O-J-I-P, que refleja la reducción de $Q_A = (Area)/(F_m - F_0)$; N, número de recambio: número de eventos de reducciones de Q_A entre el tiempo cero (t_0) y el tiempo $t_{Fm} = SmMo(1 - V_J)$; Kp, constante de actividad fotoquímica; Kn, constante de actividad no fotoquímica

4.3.9 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo *Artemia salina*

4.3.9.1 Preparación de los organismos

Se preparó una solución de sales de mar, 38 g de medio salino artificial por litro de agua destilada, en un recipiente de vidrio y se oxigenó la solución aproximadamente 20 minutos usando una bomba de oxígeno. Posteriormente se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* Leach, y se incubaron 48 horas en un baño de agua con temperatura controlada (28-30 °C).

4.3.9.2 Preparación de las muestras

Se pesaron 20 mg del compuesto uvaol en un tubo de ensayo por separado, se agregaron 2 mL de acetona para disolver la muestra, posteriormente se tomaron de cada tubo de ensayo, alícuotas por triplicado de 500, 50 y 5 μ L, una vez evaporado el disolvente, se aforó con solución salina de agua de mar (5 mL) para obtener concentraciones de 10, 100 y 1000 μ g/mL.

4.3.9.3 Bioensayo

Pasado el tiempo de incubación descrito en el punto 4.3.9.1, se depositaron 10 larvas de *A. salina* en cada uno de los tubos con la muestra a evaluar y sin alterar el volumen de 5 mL de la solución de agua de mar; se dejaron las larvas 24 horas en contacto con la muestra a 28°C, posteriormente se contaron los crustáceos sobrevivientes y el resultado se expresó por medio de el valor CL₅₀ (el cálculo se realizó graficando organismos vivos y muertos acumulados vs. el logaritmo de la concentración).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Actividad *in vivo* de los extractos orgánicos de plantas endémicas Mexicanas.

De los tallos y de las hojas de las plantas Mexicanas seleccionadas se obtuvieron 16 extractos hexánicos, 16 extractos clorofórmicos y 16 extractos metanólicos.

De todos los extractos ensayados, se observó que los extractos clorofórmicos de las hojas de las plantas *Cercocarpus macrophyllus* y *Pendilanthus calcaratus* afectaron las curvas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII, medido *in vivo* en las hojas de las plantas *L. multiflorum* (pasto) y *T. alexandrinum* (trébol) de 15 días de crecimiento en el invernadero (Figuras 14 y 15).

También se observó que a los 15 días de haber sido tratadas las plantas con los extractos clorofórmicos, se disminuyó su crecimiento y las hojas se observaron necrosadas y marchitas (Figuras 16 y 17).

La emisión de fluorescencia del FSII de las plantas *L. multiflorum* y *T. alexandrinum*, se vio mayormente afectada a las 24 horas después del tratamiento con los extractos y con la concentración más baja (10 ppm) (Figuras 14 y 15). Los resultados sugieren que a concentraciones bajas, los extractos penetran más rápido en *L. multiflorum* y *T. alexandrinum* presentando un efecto inhibitorio.

A las 48 y 72 horas después de tratamiento (curvas no mostradas) las plantas muestran una recuperación en su actividad fotosintética (Tabla 2 y 3), lo cual sugiere que las plantas activan sus mecanismos de regulación (homeostasis) para poder adaptarse al estrés que ejercen los extractos.

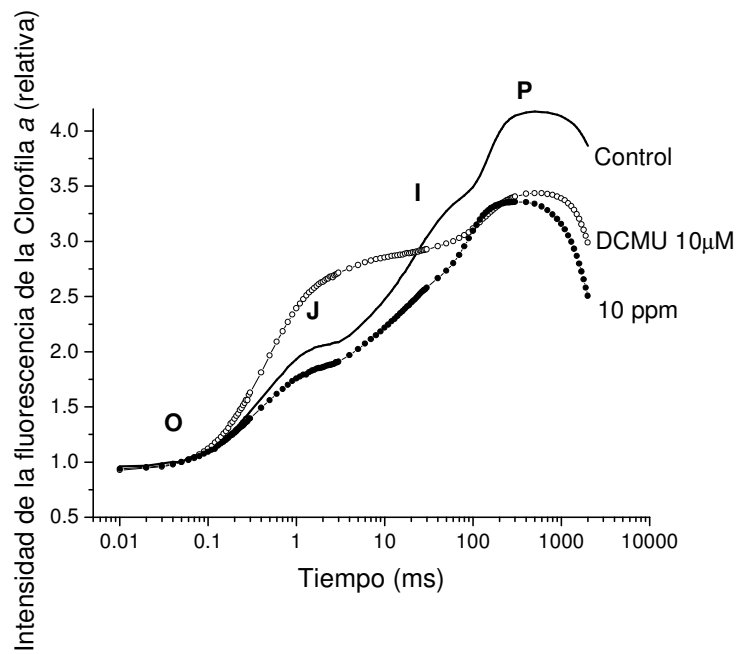
5.2 Análisis de la emisión de fluorescencia de la Chl *a* del FSII

Para este análisis se tomó en cuenta la cinética (OJIP) de la inducción polifásica de la fluorescencia de la Chl *a* del FSII.

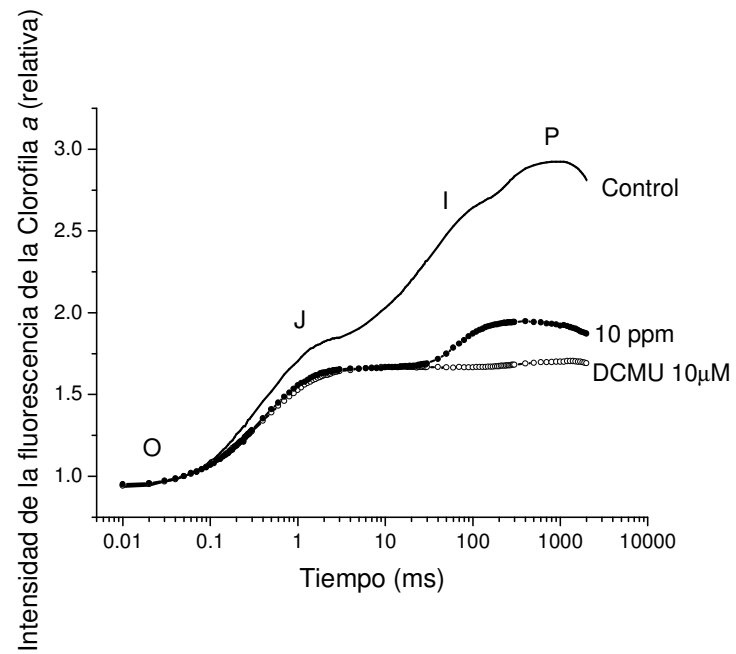
La fase fotoquímica (**O-J**), indica el transporte de electrones de P_{680}^* a Q_A , una vez reducido Q_A^- (punto **J**), cede su electrón a Q_B (punto **I**), la fase fototermal (**I-P**), indica el transporte de electrones de Q_B^- al Pool de quinonas (Figura 8).

En la grafica de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de la planta *L. multiflorum* tratada con el extracto clorofórmico de hojas de *C. macrophyllus*, se observó una disminución de los transientes de fluorescencia J - I - P, lo que indica que el aparato fotosintético de las plantas pierde gradualmente la capacidad de transportar electrones al pool de quinonas (Figura 14). El incremento del punto J, en *T. alexandrinum* es un indicativo de que existe una acumulación de especies Q_A^- , la disminución del punto I (Q_B) y de punto P (PQH), refleja que se bloquea el flujo de electrones más allá de este aceptor reducido. Estos resultados indican que los eventos fototermales (reducción de Q_B y PQ), son afectados. La actividad que presenta el extracto clorofórmico es similar a la del DCMU (herbicida utilizado como control positivo), donde se disminuye dramáticamente el área sobre la curva, debido a que existe una acumulación de Q_A^- (aumento de la fase J), afectando la capacidad de transportar electrones hacia Q_B y PQ (disminución de la fase I - P).

Las curvas de emisión de la fluorescencia medidas a las 24 horas en las plantas tratadas con 10 ppm del extracto clorofórmico de las hojas de *P. calcaratus* son similares a las mostradas con el extracto clorofórmico de *C. macrophyllus*, con menor potencia (Figura 14 y 15).

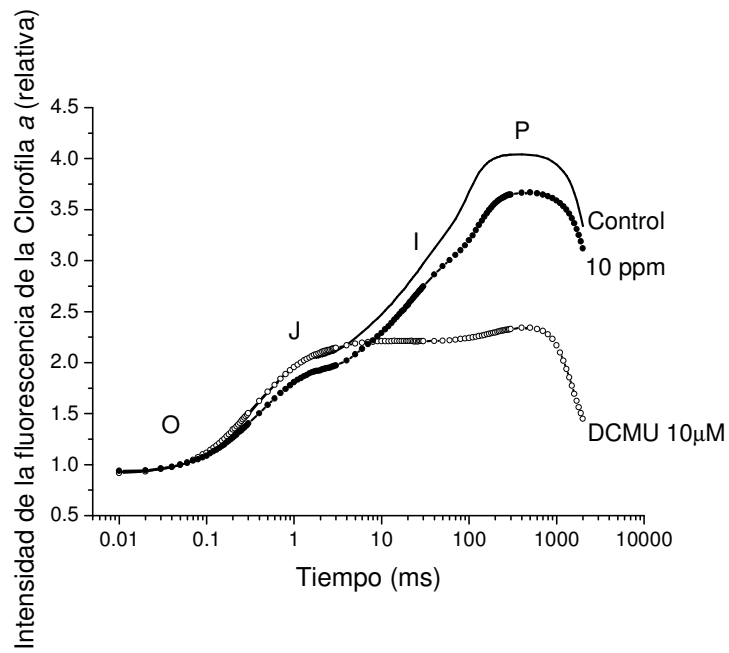


a)

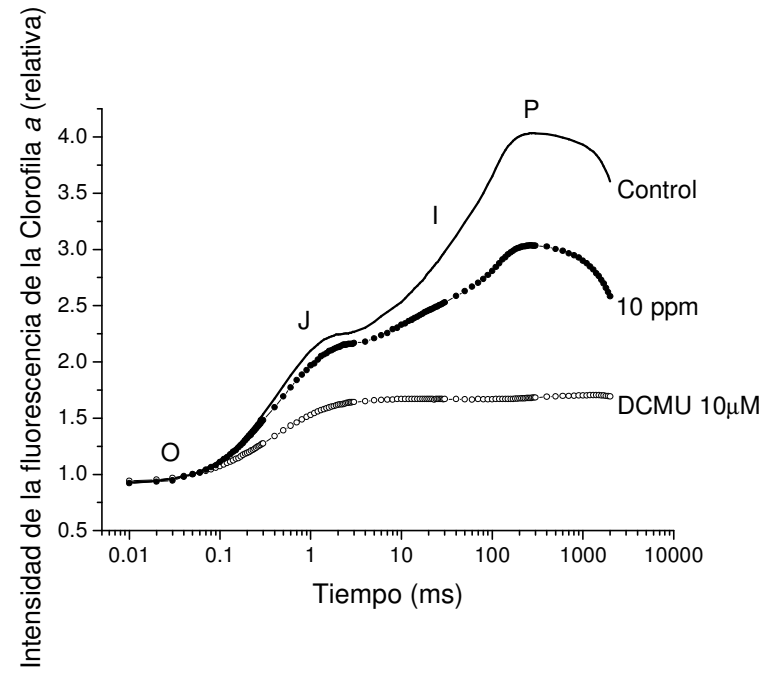


b)

Figura 14. Desarrollo de la fluorescencia de la Chl *a* medida en hojas de a) *Lolium multiflorum* (pasto) y b) *Trifolium alexandrinum* (trébol) tratadas por 24 hrs con el extractos clorofórmicos de las hojas de *Cercocarpus macrophyllus* a 10 ppm. Cada curva representa la media de 2 repeticiones.



a)



b)

Figura 15. Desarrollo de fluorescencia de la Chl *a* medida en hojas de a) *Lolium multiflorum* (pasto) y b) *Trifolium alexandrinum* (trébol) con los extractos clorofórmicos de las hojas de la planta *Pendilanthus calcaratus* a 10 ppm a las 24 hrs. Cada curva representa la media de 2 repeticiones.



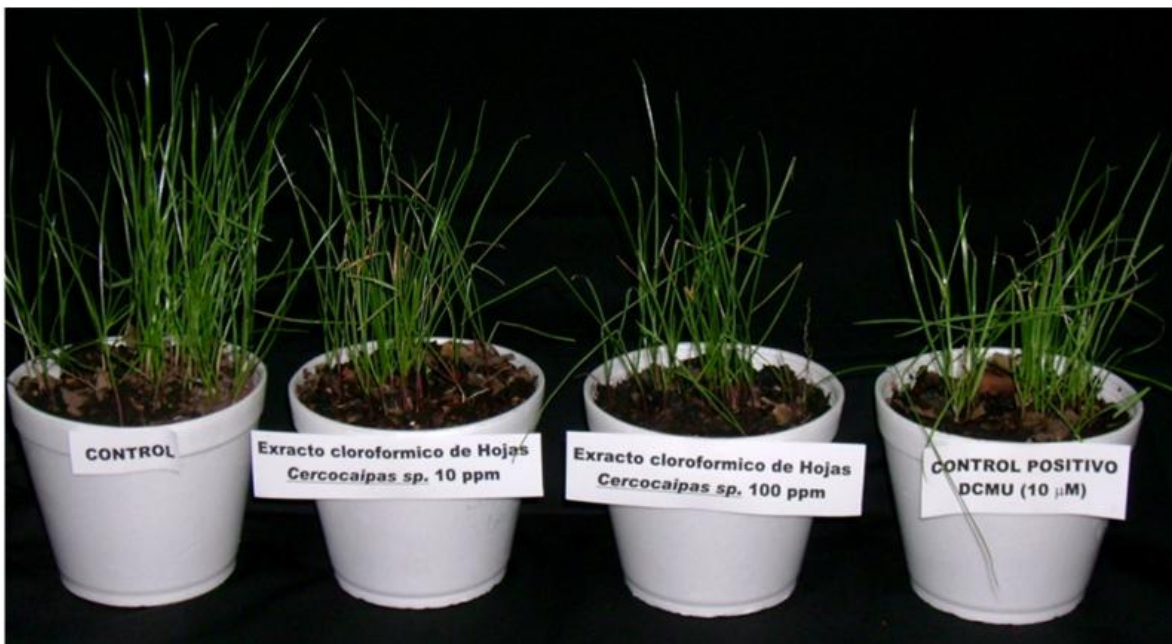
a)

b)

c)

d)

Figura 16. *Trifolium alexandrinum* (trébol) tratado con los extractos cloroformicos de las hojas de *Cercocarpus macrophyllus* a) Control negativo b) 10 ppm c) 100 ppm d) Control positivo DCMU 10 μ M



a)

b)

c)

d)

Figura 17. *Lolium multiflorum* (pastol) tratado con los extractos cloroformicos de las hojas de *Cercocarpus macrophyllus* a) Control negativo b) 10 ppm c) 100ppm d) Control positivo DCMU 10 μ M

5.3 Parámetros de emisión de fluorescencia de la Chl *a* del FSII

A partir de los datos de inducción de la fluorescencia de la Chl *a* se obtuvieron los parámetros: Fo, Fm, Fv, Fv/FM, área, kn, kp, Sum K y Dlo/CSo (Strasser, et. al 2000). Los datos se procesaron con los programas Handy PEA y Biolyzer (Maldonado-Rodrigues, 2002).

En la tabla 2 se muestran los parámetros de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII del *T. alexandrinum* (trébol) tratada con los extractos clorofórmicos de las hojas de las plantas *C. macrophyllus* y *P. calcaratus*. A las 24 horas después del tratamiento, se registró el aumento de la fluorescencia mínima (Fo), los datos indican una oxidación deficiente de Q_A^- afectando la reducción de Q_B y PQH (procesos fototermiales), lo cual se refleja en la disminución de los parámetros Fm y Fv que están relacionados con el cierre de los centros de reacción e induce una menor reducción de Q_A , y pool de quinonas respectivamente. También se disminuye la eficiencia de la fotoquímica primaria (Fv/Fm) indicando que se afecta la eficiencia del FSII. Otros parámetros que se ven afectados son: la constante fotoquímica (kp), que disminuye, lo que demuestra que se afectan los procesos fotoquímicos del FSII de los tréboles; el incremento de la constante no fotoquímica (kn) así como el aumento de Dlo/CSo, indican que estas plantas tienden a disipar la energía en forma de calor. Este comportamiento se mantuvo a las 48 y hasta las 72 horas, lo que indica que el transporte de electrones se ve afectado por el extracto clorofórmico de *C. macrophyllus*.

El extracto hexánico (Tablas 4 y 5) y metanólico (datos no mostrados) de *C. macrophyllus*, tiene un efecto similar en la inducción de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII en trébol y pasto, la potencia es menor comparada con el extracto clorofórmico.

Los tréboles tratados con el extracto clorofórmico de *P. calcaratus*, mostraron el mismo comportamiento pero en menor proporción que las plantas

tratadas con *C. macrophyllus* a las 24 horas; la disminución de k_p , probablemente es un mecanismo de regulación para evitar la acumulación de NADPH y ATP, además la energía luminosa captada no se disipa en forma de calor ya que es ocupada en su mayor parte en las actividades fotoquímicas. Sin embargo, a las 48 horas se observa un incremento de k_p y un decremento de k_n , así como el aumento de la Sum K, lo cual indica que las plantas activaron mecanismos de regulación, sin embargo a las 72 horas nuevamente se observó la disminución de k_p , el aumento de k_n y el valor de la Sum K fue menor, por lo cual las plantas de trébol no se recuperaron del tratamiento con el extracto clorofórmico al que fueron sometidas; y esto coincide con el disminución de F_o .

En la tabla 3 se observa que *L. multiflorum* tratado con el extracto clorofórmico de *C. macrophyllus*, muestra un incremento de F_o , acompañado de la disminución de los parámetros F_m , F_v , la eficiencia de la fotoquímica primaria (F_v/F_m) y la constante de la fotoquímica de oxidación (k_p); Los resultados indican que la oxidación de Q_A^- es deficiente. Uno de los mecanismos de adaptación que han desarrollado la mayoría de las plantas es disipar el exceso de energía luminosa en forma de calor para evitar daños oxidativos, relacionado a esto se encuentra el aumento de D_{lo}/C_{So} . Este comportamiento al igual que en el trébol se mantiene hasta las 72 horas, lo cual nos indica que los efectos inhibitorios en las fases fotoquímica y fototermal del extracto clorofórmico de hojas de *C. macrophyllus* se mantienen en ambas plantas (trébol y pasto) y no se recuperan.

En las plantas de *L. multiflorum* tratadas con el extracto clorofórmico de *P. calcaratus* (Tabla 3), a las 24 horas se observa que los parámetros F_m y F_v disminuyen, lo cual es precedido del incremento de F_o . Sin embargo, a las 48 y 72 horas se presenta el decremento de F_o y k_p aumenta, lo que indica que la fase fotoquímica se recupera y aunque los parámetros F_m , F_v y F_v/F_m siguen disminuidos, la planta de *L. multiflorum* se recupera de los efectos del extracto. Estos datos sugieren que el extracto clorofórmico de *P. calcaratus*, no afecta considerablemente los eventos fotoquímicos y fototermales en el trébol y pasto.

Tabla 2. Parámetros de fluorescencia de la Chl *a* del FSII de la planta *Trifolium alexandrinum* (trébol) tratada con los extractos clorofórmicos de hojas de *Cercocarpus macrophyllus* y *Pedilantus calcaratus* a 10 ppm. Los datos presentados son la media de 2 repeticiones de diferentes hojas.

Horas	Tratamiento	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Área	Kn	Kp	Sum K	Dlo/CSo
24 hr.	Control (-)	311	1424	1113	0.78	35000	0.70	2.13	2.83	87.51
	DCMU (+)	660	1117	457	0.41	3400	0.89	0.52	1.41	448.73
	<i>C. macrophyllus</i>	330	1096	766	0.69	18408	0.78	2.19	2.98	88.40
	<i>P. calcaratus</i>	323	1105	782	0.71	19200	0.91	1.84	2.75	119.90
48 hr.	Control (-)	307	1219	912	0.75	28600	0.82	2.03	2.85	101.05
	DCMU (+)	515	1071	556	0.52	13600	0.93	0.85	1.79	292.82
	<i>C. macrophyllus</i>	327	1088	761	0.69	15400	0.92	1.81	2.73	123.12
	<i>P. calcaratus</i>	326	1316	990	0.75	22000	0.68	2.29	2.97	77.37
72 hr.	Control (-)	360	1288	928	0.72	15400	0.78	1.65	2.43	131.80
	DCMU (+)	536	1027	491	0.48	5000	0.97	0.75	1.73	326.44
	<i>C. macrophyllus</i>	400	911	511	0.56	9800	1.09	1.22	2.32	203.91
	<i>P. calcaratus</i>	349	1243	894	0.72	17200	0.81	1.75	2.56	123.01

Tabla 3. Parámetros de fluorescencia de la Chl *a* del FSII de la planta *Lolium multiflorum* (pastol) tratada con los extractos clorofórmicos de hojas de *Cercocarpus macrophyllus* y *Pedilantus calcaratus* a 10 ppm. Los datos presentados son la media de 2 repeticiones de diferentes hojas.

Horas	Tratamiento	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Área	Kn	Kp	Sum K	Dlo/CSo
24 hr.	Control (-)	398	1819	1421	0.78	65800	0.55	1.74	2.29	104.51
	DCMU (+)	332	1316	984	0.78	27400	0.76	1.85	2.61	111.45
	<i>C. macrophyllus</i>	433	1598	1165	0.72	35400	0.63	1.48	2.10	141.80
	<i>P. calcaratus</i>	422	1756	1334	0.76	41000	0.57	1.54	2.11	128.49
48 hr.	Control (-)	403	1766	1363	0.72	52400	0.57	1.62	2.19	118.27
	DCMU (+)	654	1657	1003	0.60	24400	0.60	0.73	1.34	336.74
	<i>C. macrophyllus</i>	422	1560	1138	0.73	45200	0.64	1.48	2.13	141.61
	<i>P. calcaratus</i>	370	1583	1213	0.77	50400	0.63	1.80	2.43	106.69
72 hr.	Control (-)	406	1854	1448	0.78	46400	0.54	1.63	2.18	113.65
	DCMU (+)	554	1468	919	0.62	13800	0.68	0.91	1.59	267.79
	<i>C. macrophyllus</i>	444	1602	1158	0.72	33200	0.62	1.40	2.02	152.35
	<i>P. calcaratus</i>	389	1574	1185	0.75	47200	0.64	1.69	2.33	116.95

Tabla 4. Parámetros de fluorescencia de la Chl *a* del FSII de la planta *T. alexandrinum* (trébol) tratada con el extracto hexánico de hojas de *C. macrophyllus* a 10 ppm. Los datos presentados son la media de 2 repeticiones de diferentes hojas.

Horas	Tratamiento	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Área	Kn	Kp	Sum K	Dlo/CSo
24 hr.	Control (-)	331	1888	1557	0.83	37499	0.46	1.40	1.86	133.96
	DCMU (+)	683	1378	695	0.50	1535	0.47	0.66	1.13	367.22
	<i>C. macrophyllus</i>	345	1810	1465	0.81	33670	0.50	1.38	1.89	141.55
48 hr.	Control (-)	364	1792	1428	0.80	28438	0.45	1.44	1.89	125.37
	DCMU (+)	630	996	366	0.37	311	0.47	0.33	0.81	735.79
	<i>C. macrophyllus</i>	348	1802	1454	0.81	21581	0.41	1.25	1.67	148.12
72 hr.	Control (-)	404	1700	1296	0.76	32122	0.44	1.36	1.77	139.74
	DCMU (+)	635	888	253	0.28	475	0.63	0.49	1.12	504.99
	<i>C. macrophyllus</i>	356	1798	1442	0.80	23089	0.45	1.43	1.87	127.78

Tabla 5. Parámetros de fluorescencia de la Chl *a* del FSII de la planta *L. multiflorum* (pastol) tratada con el extracto hexánico de hojas de *C. macrophyllus* a 10 ppm. Los datos presentados son la media de 2 repeticiones de diferentes hojas.

Horas	Tratamiento	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Área	Kn	Kp	Sum K	Dlo/CSo
24 hr.	Control (-)	430	2232	1802	0.80	37331	0.45	1.44	1.89	125.37
	DCMU (+)	1103	2093	990	0.47	8800	0.48	0.33	0.81	735.79
	<i>C. macrophyllus</i>	463	2414	1951	0.81	31800	0.41	1.25	1.67	148.12
48 hr.	Control (-)	464	2268	1804	0.80	39135	0.44	1.33	1.77	139.74
	DCMU (+)	811	1579	768	0.49	5000	0.63	0.48	1.12	504.99
	<i>C. macrophyllus</i>	442	2329	1887	0.81	39800	0.43	1.37	1.80	132.25
72 hr.	Control (-)	447	2137	1690	0.79	37400	0.47	1.40	1.87	133.96
	DCMU (+)	718	2109	1391	0.66	12000	0.48	0.66	1.34	367.22
	<i>C. macrophyllus</i>	440	1962	1522	0.77	29000	0.50	1.39	1.89	141.55

El extracto hexánico de las hojas de *C. macrophyllus* también mostró actividad en los ensayos *in vivo*, afectando los parámetros de emisión de fluorescencia de la Chl *a* del FII en las plantas *L. multiflorum* y *T. alexandrinum*, de la misma forma que el extracto clorofórmico, pero la inhibición fue menor (Tablas 4 y 5).

5.4 Biomasa seca

Después de 15 días de haber sido tratados los pastos y tréboles, su biomasa seca disminuyó. Las plantas que fueron tratadas con la concentración mayor (100 ppm) produjeron menor cantidad de biomasa que las tratadas con 10 ppm (Tabla 6), esta observación indica que la inhibición de la fotosíntesis en estas plantas no es dependiente de la concentración. Sin embargo, los extractos pueden estar afectando otros sitios u otras vías metabólicas implicadas en el crecimiento de las plantas y en este caso sí son dependientes de la concentración. También se observó que la actividad de los extractos es mayor en los tréboles, lo que sugiere selectividad de los extractos para plantas eudicotiledóneas (Tabla 6).

Tabla 6. Datos de Biomasa seca a) *T. alexandrinum* y b) *L. multiflorum* determinada a los 15 días después del tratamiento con los extractos orgánicos y Controles (+) y (-).

Planta y concentración.	a)	a)	b)	b)
	gramos	%	gramos	%
Control Negativo	0.6870	100	0.3229	100
Control positivo (DCMU 10)	0.427	63.6	0.1981	61.4
<i>Cercocarpus macrophyllus</i> 10 ppm	0.428	62.3	0.2603	80.6
<i>Cercocarpus macrophyllus</i> 100ppm	0.385	56	0.2056	63.6
<i>Pendilanthus calcaratus</i> 10 ppm	0.5849	85.1	0.2407	74.5
<i>Pendilanthus calcaratus</i> 100 ppm	0.437	63.6	0.2337	72.3

La planta *Cercocarpus macrophyllus*, presentó la mayor actividad inhibitoria en el ensayo de la fluorescencia de la clorofila *a in vivo* y en la determinación de biomasa seca, por lo cual se escogió para continuar con el estudio biodirigido para encontrar el o los metabolitos secundarios responsables de estas actividades.

5.5 Actividad inhibitoria en la síntesis de ATP de los extractos orgánicos de *Cercocarpus macrophyllus*

Una vez que se escogió la planta *C. macrophyllus*, se estudió el efecto de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de hojas en la síntesis de ATP, de cloroplastos aislados de hojas de espinaca y lisados al momento de utilizarse (ensayos *in vitro*). Los extractos inhibieron la síntesis de ATP en función de la concentración. El extracto hexánico presentó mayor actividad inhibitoria con un valor de I_{50} de 98.9, seguido por el extracto clorofórmico y el menos activo el extracto metanólico con valores de I_{50} de 125.4 y 212.3 ppm respectivamente (Figura 18).

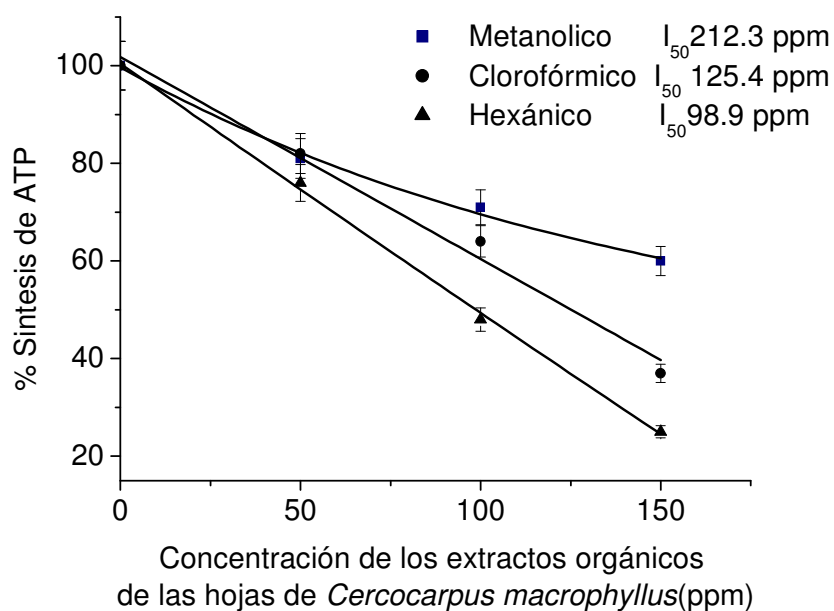


Figura 18: Efecto de los extractos orgánicos de las hojas de *Cercocarpus macrophyllus*, en la síntesis de ATP en tilacoides aislados de espinacas. El valor del control fue de 1050 $\mu\text{M ATP mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$.

El extracto hexánico de hojas de *Cercocarpus macrophyllus*, se eligió para realizar el bio-fraccionamiento, debido a que mostró la mayor actividad inhibitoria en la síntesis de ATP y también presentó actividad en los ensayos *in vivo* (Tabla 4 y 5).

5.6 Fraccionamiento primario mediante una columna cromatográfica abierta del extracto hexánico de las hojas de *Cercocarpus macrophyllus*.

Del fraccionamiento primario del extracto hexánico, se obtuvieron 425 fracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud en cromatografía de capa fina en 15 fracciones, En la tabla 7 se muestran las fracciones obtenidas así como los sistemas de elución empleados.

Tabla 7. Fracciones obtenidas del fraccionamiento primario del extracto hexánico de las hojas de *Cercocarpus macrophyllus*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Peso (g)	Clave
Hexano	100	1-19	0.8142	F1
Hexano	100	20-32	0.3353	F2
Hexano-AcOEt	90:10	33-64	0.0957	F3
Hexano-AcOEt	90:10	65-69	1.8297	F4
Hexano-AcOEt	90:10	70-82	2.2085	F5
Hexano-AcOEt	90:10	83-98	2.3134	F6
Hexano-AcOEt	80:20	99-108	0.5561	F7
Hexano-AcOEt	80:20	109-138	0.2985	F8
Hexano-AcOEt	70:30	139-169	0.2576	F9
Hexano-AcOEt	70:30	170-196	2.0013	F10
Hexano-AcOEt	50:50	197-250	1.3432	F11
Hexano-AcOEt	30:70	251-273	1.3878	F12
Hexano-AcOEt	20:80	274-300	0.7220	F13
AcOEt	100	301-361	0.5441	F14
Acetona	100	362-425	0.6325	F15

5.7 Actividad en la síntesis de ATP de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento primario.

Se obtuvieron 15 fracciones de las cuales solo se probaron 6 en el bioensayo de síntesis de ATP, esto debido a que la cantidad de muestra obtenida en las otras fracciones no fue suficiente o era una mezcla muy compleja de componentes. Las fracciones 10,11 y 12 inhibieron la síntesis de ATP, con I_{50} 42.5, 35.0 y 31.5 ppm respectivamente (Figura 19). Se eligió la fracción 10 para su purificación dado que ésta cristalizó espontáneamente, además de ser la menos contaminada según lo observado en cromatografía en capa fina y corroborado en IR y RMN¹H.

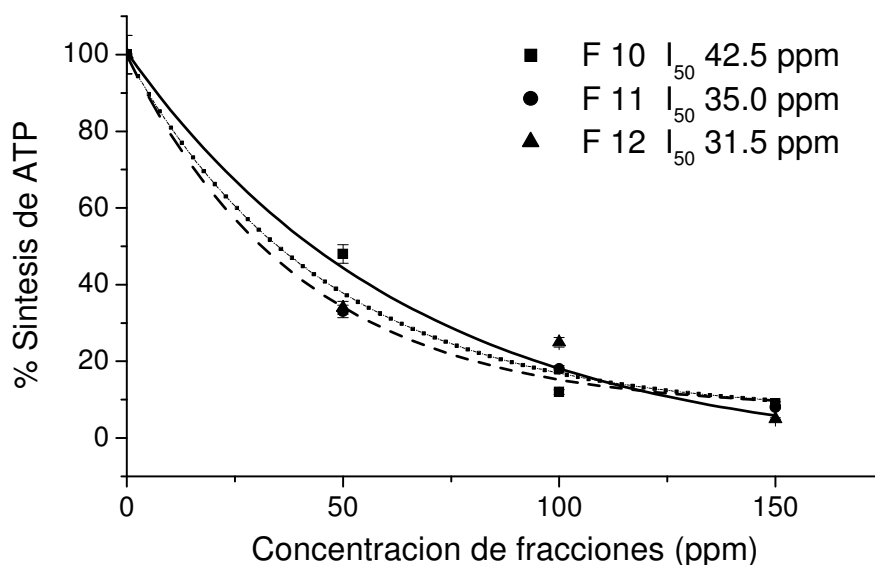


Figura 19. Efecto en la síntesis de ATP de las fracciones activas. El valor del control fue de $1094 \mu\text{M ATP mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$.

5.8 Purificación y caracterización química de 3β,28-dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)

De la fracción primaria 10 se aisló un compuesto que precipitó espontáneamente el cual fue mayoritario como se comprobó por el análisis de cromatografía en capa fina ($R_f = 0.66$, hexano-AcOEt). La recristalización de este compuesto dio como resultado cristales blancos translúcidos que fueron estructuralmente caracterizados por análisis espectroscópicos y espectrométricos (Tabla 8).

Tabla 8. Características físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 3β,28-dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)

P.f.	230-231 °C
F.M.	$C_{30}H_{50}O_2$
IR, $\nu_{\text{máx}}$ (pastilla), cm^{-1}, (Espectro 1)	3427,2928,2869,1631,1456,1386,1375
RMN ^1H, 300 MHz, CDCl_3, δ (Espectro 2)	5.13(1H, t, $J=3.6\text{Hz}$, H-12), 3.53(1H, d, $J_{\text{gem}}=11.1\text{Hz}$, H-28), 3.19(1H, d, $J_{\text{gem}}=11.1\text{Hz}$, H-28), 3.21(1H, m, H-3), 1.1, 1.0, 0.9(s, CH_3), 1.79(s, 3x CH_3), 0.94(d, $J=6\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 0.8(d, $J=6\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{-CH}$).
RMN ^{13}C, 75.5 MHz, CDCl_3, δ (Espectro 3)	139(C-13), 125(C-12), 79(C-3), 69.9(C-28), 55.1(C-5), 54(C-18), 47.6(C-9), 42(C-14), 41(C-8), 39.9(C-4), 39.4(C-20), 39.3(C-19), 38.7(C-1), 37.9(C-10), 36.8(C-17), 35.1(C-21), 32.8(C-7), 30.6(C-22), 28.1 (C-23), 29(C-15), 27.2(C-2), 25.9(C-11), 23.3(C-16), 23.3(C-27), 21.3(C-30), 18.3(C-6), 16.7(C-29), 17.3(C-26), 15.6(C-25) y 15.6(C-24).
CG-EM t.r.=20.03 (Espectro 6)	442 (M^+ , $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, 5.1), 425 ($\text{M}^+ \text{-OH}$, 8.1), 424 ($\text{M}^+ \text{-H}_2\text{O}$, 4.8), 409 ($\text{M}^+ \text{-H}_2\text{O-CH}_3$, 2.0), 407 ($\text{M}^+ \text{-OH-H}_2\text{O}$, 1.2), 234 ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}$, 12), 203 ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O} \text{-CH}_2\text{OH}$, 100), 216 ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{-H}_2\text{O}$, 34), 201 ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O-H}_2\text{O-CH}_3$, 4.5), 189 ($\text{C}_{14}\text{H}_{21}$, 4.3) and 175 ($\text{C}_{13}\text{H}_{19}$, 3.4)

En el espectro en el IR (Espectro 1), se observó una banda ancha a 3427 cm^{-1} , la cual se asoció a la presencia de grupos hidroxilo presentes en la molécula; en 2928 y 2869 cm^{-1} , se observaron las bandas de absorción características de grupos metilo y metileno, la banda de absorción a 1631 cm^{-1} , se identificó como la señal de vibración carbono-carbono de doble ligadura y las bandas en 1456 , 1386 y 1375 cm^{-1} representan la unión de carbonos-hidrógeno saturados e insaturados, metilos y metilenos.

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- ^1H) (Espectro 2), mostró señales de hidrógenos alifáticos, hidrógenos en carbono base de oxígeno e hidrógenos vinílicos. El espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C (Espectro 3), mostró señales que correspondieron a 6 carbonos cuaternarios, 7 terciarios, 10 secundarios y 7 carbonos de metilo; dos señales (metileno y metino) son de carbonos base de un oxígeno, con lo que se suman 30 átomos de carbono y dos de oxígeno en la molécula. Lo anterior se correlacionó con la existencia de un compuesto de tipo triterpenoide.

La suma de los pesos atómicos de los grupos hasta aquí mencionado dio como resultado 442 umas que coincidió con el peso molecular observado en el espectro de masas de este compuesto (Espectro 6).

Las señales de los carbonos de tipo metino y metileno en δ 79.0 y 69.9, se asignaron a un alcohol secundario y primario respectivamente. Las señales en δ 125 y 165, se asignaron a un doble enlace trisustituido siendo la primera señal correspondiente a un metino (Espectro 3). La presencia de dos hidrógenos en uno de los carbonos base de oxígeno se observó en el espectro Hetcor (Espectro 5) y por las señales dobles a δ 3.53 y a 3.20, ambas con constante de acoplamiento de 11.1Hz y fueron asignadas a los hidrógenos de un alcohol de tipo primario. Una señal adicional de un hidrógeno en carbono base de oxígeno de tipo secundario también observada en el espectro Hetcor (Espectro 5) se asignó a un hidroxilo en la posición 3 de la molécula del triterpenoide. Los 5 metilos singulete y dos doblete con constantes de acoplamiento de 6.0 Hz observados en el espectro de RMN- ^1H

(Espectro 2) dieron la pauta para inferir la identidad de un esqueleto de tipo ursano.

La posición del doble enlace en la molécula se definió por el pico base del espectro de masas del compuesto (Espectro 6), con 203 umas que según la literatura corresponde a la fragmentación de tipo retro Diels-Alder del esqueleto Δ^{12} de un triterpenoide de tipo ursano o oleanano ($C_{16}H_{26}O-CH_2OH$). Otros picos diagnósticos de la estructura fueron en m/z 234 que corresponde a la pérdida de la fragmentación $C_{16}H_{26}O$, y en m/z 133, la pérdida de la fragmentación $C_{10}H_{13}$. Un esquema representativo de estas fragmentaciones se muestra en la Figura 20. El pico en m/z 234 también indicó que el hidroximetileno observado en RMN se encuentra en el fragmento *a* de la Figura 20. Sin embargo existen cuatro posiciones en las que pudiera estar localizado (14, 17, 19 y 20) en el esqueleto del ursano. La posición exacta del grupo hidroxilo primario se obtuvo por comparación de las características físicas (punto de fusión) y espectroscópicas (RMN- 1H y RMN- ^{13}C) (Tabla 8) del compuesto con las reportadas en la literatura (Siddiqui et al. 1986) tras lo cual se asignó a este compuesto la estructura del 3 β ,28-dihidroxiurs-12-eno (Uvaol), triterpenoide de tipo α -amirina.

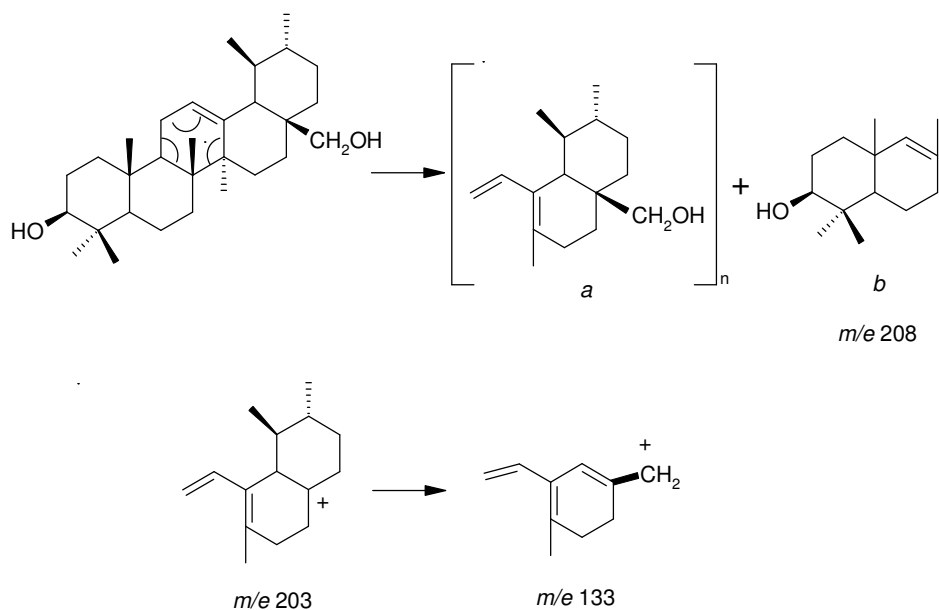


Figura 20. Fragmentación del 3 β ,28-dihidroxiurs-12-eno tipo retro Diels-Alder

Este compuesto ha sido aislado con anterioridad de las especies *Nerium oleander* L. (Siddiqui et al. 1986), *Amaracus dictamnus* B. (Piozzi et al. 1986), *Salvia lanata* R. (Mukherjee et al. 1984)

5.9 Actividad en Síntesis de ATP del Uvaol

El triterpeno uvaol inhibe la síntesis de ATP (Fig. 21), con un valor de I_{50} de 60 ppm mayor que la de la fracción 10 (42.5 ppm), este resultado sugiere un efecto sinérgico con otros componentes de la fracción, los cuales no se identificaron debido a que se encuentran en concentraciones muy bajas en la fracción.

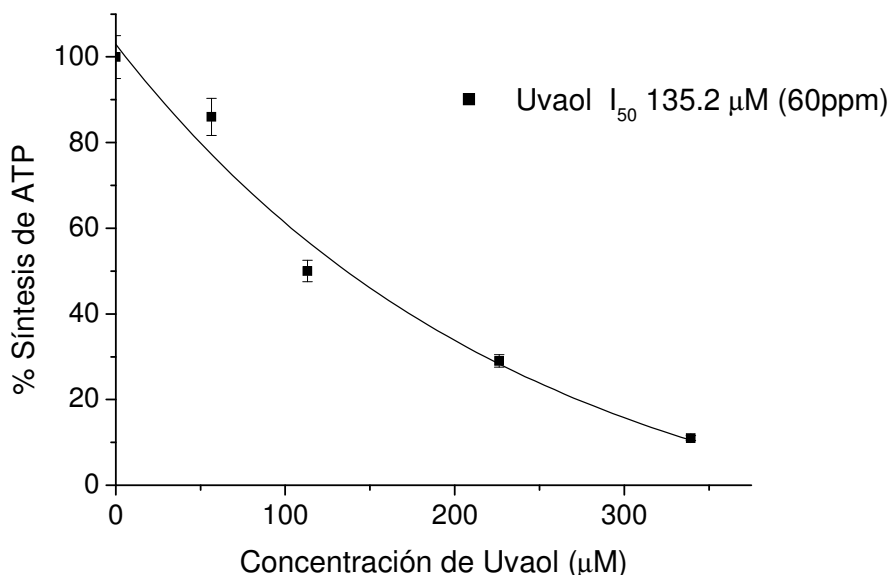


Figura 21: Efecto del Uvaol en la síntesis de ATP en tilacoides de espinacas. El valor del control fue de $1094\mu\text{M ATP mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$.

La fotofosforilación está acoplada al transporte de electrones, por lo que la formación de ATP puede ser inhibida por el bloqueo de el transporte de electrones, por una inhibición directa de la H^+ -ATPasa o por desacoplamiento de la síntesis de ATP del transporte de electrones (Good et al., 1981). Para elucidar

el mecanismo de acción del uvaol en la fotosíntesis, se investigó su efecto sobre el transporte de electrones no cíclico de agua a MV en sus tres estados: basal, fosforilante y desacoplado.

5.10 Actividad del Uvaol, en el transporte de electrones; basal, fosforilante y desacoplado

El triterpeno Uvaol inhibe parcialmente el transporte de electrones en sus tres estados, siendo el transporte desacoplado el más inhibido (90 % a 339 μM). Los valores de I_{50} para los transportes basal, fosforilante y desacoplado fueron: 218.8, 158.6 y 46.6 μM respectivamente (Figura 22). Los resultados de inhibición de los tres estados del flujo de electrones, indican que este compuesto actúa como un inhibidor de la Reacción de Hill (Macias et al. 1999).

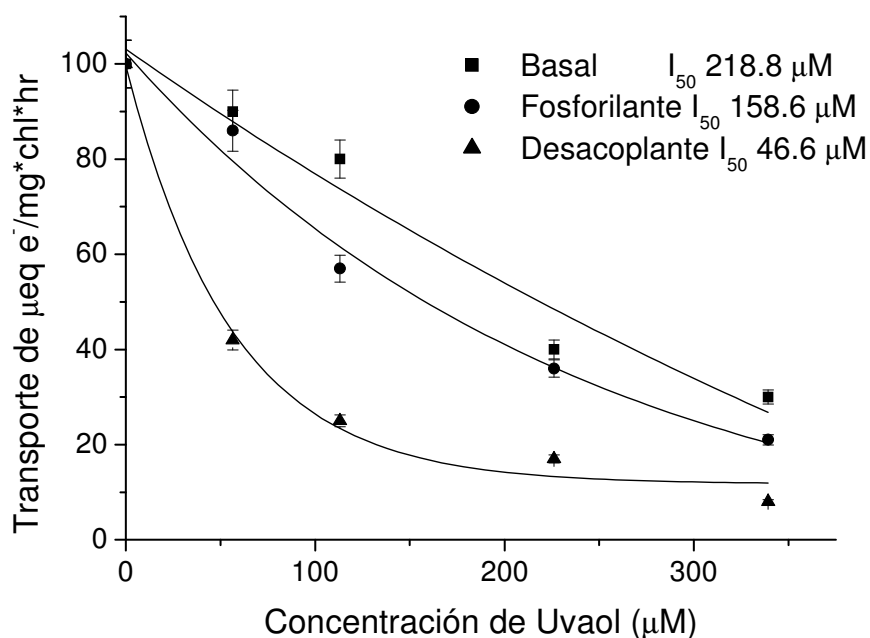


Figura 22. Efecto del Uvaol en el transporte de electrones no cíclico de agua a metilviologen. (■) Basal, (●) Fosforilante y (▲) Desacoplante, en tilacoides aislados de espinacas. Los valores para los controles fueron de 800, 1120 y 960 $\mu\text{eq e}^- \text{mg}^{-1}\text{Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$.

5.11 Efecto del Uvaol en las reacciones parciales del FSII y FSI

Para localizar el sitio de inhibición del tritrepeno Uvaol sobre la cadena transportadora de electrones en la fotosíntesis, se midió el efecto de concentraciones crecientes de uvaol en el FSII, el FSI y sus reacciones parciales, para lo cual se emplearon donadores y aceptores de electrones artificiales adecuados, así como los inhibidores apropiados (Figura10) (Allen y Holmes 1986). En la tabla 10 se muestra que el compuesto inhibe al 100 % a la concentración de 339 μM en el FSII medido de agua a DCPIP, utilizando DBMIB como inhibidor del FSI. Las reacciones parciales del flujo de electrones del FSII medidas de agua a SiMo y de DPC a DCPIP también fueron inhibidas parcialmente (83 y 44% respectivamente) por el compuesto. Sin embargo, el FSI medido de TMQH_2 a MV no fue afectado por el compuesto. Dado que el transporte de electrones de agua a DCPIP fue inhibido 100% y las otras reacciones solo parcialmente, los resultados indican que el tritrepeno Uvaol tiene más de un sitio de inhibición e interacción en el FSII (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto del tritrepeno Uvaol, sobre el FSII, FSI, y las reacciones parciales del FSII.

[μM]	FSII		FSII		FSII		FSI	
	H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP		TMQH ₂ a MV	
	$\mu\text{eq e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$	%	$\mu\text{eq e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$	%	$\mu\text{M DCPIP}_{\text{red}} \text{mg}^{-1} \text{Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$	%	$\mu\text{eq e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$	%
56.5	399.9	86	266.6	67	585.2	100	1333.3	100
113.1	266.3	57	133.3	34	538.3	92	1333.3	100
226.2	133.3	28	133.3	34	433.04	74	1333.3	100
339.3	0	0	16.6	17	386.2	66	1333.3	100

5.12 Fluorescencia de la Chl *a* del FSII en cloroplastos infiltrados con Uvaol

Para corroborar el sitio de interacción del compuesto en el FSII, se midió la fluorescencia de la clorofila *a* en cloroplastos aislados. Se emplearon como controles positivos 10 μ M de DCMU y cloroplastos tratados con 0.8 M Tris pH 8.0. Los tilacoides control muestran una curva de fluorescencia polifásica con una secuencia OJIP de fluorescencia, similar a la previamente descrita para plantas, algas verdes y cianobacterias por Strasser y colaboradores (1995).

La adición de 10 μ M de DCMU induce un rápido aumento del desarrollo de la fluorescencia durante los 2 primeros ms de iluminación, transformando así la secuencia regular OJIP en una curva OJ (Figura 23). Cuando los tilacoides son tratados con Tris (un inhibidor del lado donador del FSII), la fluorescencia máxima es reducida, se observa un rápido ascenso con un máximo pico a los 300 μ s (banda K), seguida por una disminución del nivel de fluorescencia cercano a F_0 (Figura 23). La respuesta de los tilacoides es muy similar a los cloroplastos tratados con calor en los cuales ocurre daño al complejo enzimático que fotoliza el agua (OEC).

Al medir la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII en cloroplastos aislados, bajo el efecto de diferentes concentraciones de uvaol, se encontró que a 136 μ M la fluorescencia máxima (F_m) disminuyó y la fluorescencia inicial aumentó ligeramente (Tabla 11), sin ser ambas modificadas significativamente. Sin embargo, el área sobre la curva, el valor de recambio de Q_A^- (N) y la eficiencia fotosintética PI(abs) disminuyeron considerablemente en un 55, 49 y 40 % respectivamente (Tabla 10), lo que indica que el tamaño del pool de aceptores de electrones del FSII (Q_A) está bloqueado. También, la capacidad de que un fotón mande un electrón más allá de Q_A (PHI(E_0)), y la capacidad de que el excitón mande un electrón más allá de Q_A (PSI o) se ven disminuidos en 20 y 18 %, respectivamente (Tabla 11).

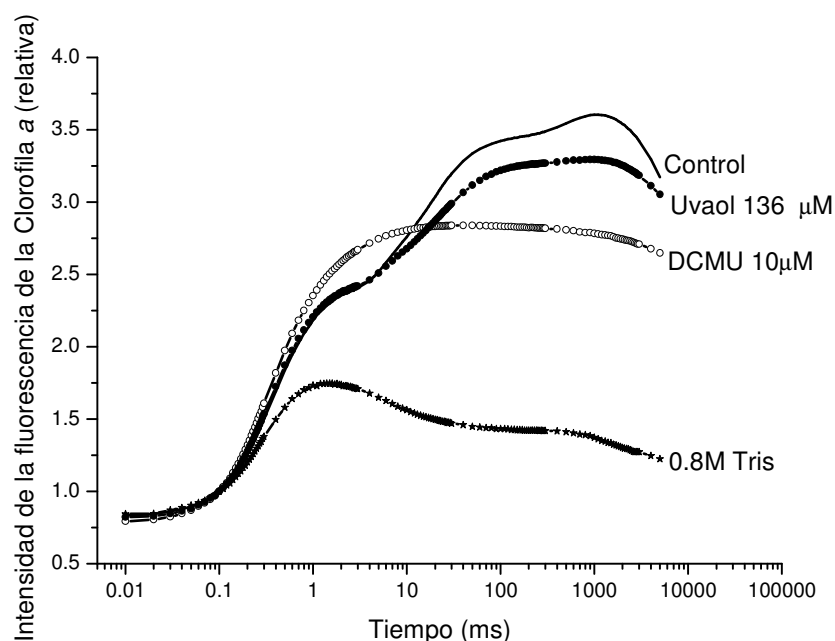


Figura 23. Desarrollo de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII en cloroplastos aislados, para control (-), DCMU 10 μM, Tris 0.8 M y Uvaol 136 μM

Estos resultados indican que la actividad del compuesto es parcialmente similar al DCMU, pero esto se encuentra en controversia con los resultados polarográficos de las reacciones parciales (Tabla 9). Esta controversia se puede deber a que probablemente el sitio de inhibición en el FSII sea en el lado aceptor de electrones del FSII, con una inhibición en feofitina y por tanto el bloqueo de la reducción de Q_A^- , sin afectar la enzima que fotoliza el agua y sin crear centros de reacción silenciosos, pues al calcular la cantidad de centros de reacción activos que quedan después de el tratamiento con 136 μM del compuesto, el 92 % de centros de reacción permanecen activos, calculados como $(RC)_t / (RC)_c = (ABS/RC)_c / (ABS/RC)_t$, en donde $(RC)_t$ es la cantidad de los centros de reacción tratados y $(RC)_c$, son los no tratados.

Tabla 10. Parámetros de la emisión de fluorescencia de la Chl *a* del FSII en cloroplastos aislados infiltrados con Uvaol.

Tratamiento	Area	Fo	Fm	N	Sum k	Kn	Kp
Control (-)	32544	282	1312	54.84	3.07	0.76	2.31
TRIS	97	296	646	0.71	2.99	1.55	1.45
DCMU	1053	346	1368	1.91	2.39	0.73	1.66
136 μ M	14609	286	1252	27.86	2.99	0.79	2.19

Tratamiento	PSI _o	PHI(E _o)	PHI(P _o)	ABS/RC	Tro/RC	Eto/RC	Dlo/RC	PI(abs)
Control (-)	0.46	0.35	0.75	2.21	1.66	0.77	0.55	11.67
TRIS	0.01	0.005	0.48	4.72	2.28	0.02	2.44	0.02
DCMU	0.13	0.09	0.69	2.48	1.72	0.22	0.76	8.95
136 μ M	0.38	0.28	0.73	2.39	1.75	0.67	0.64	7.06

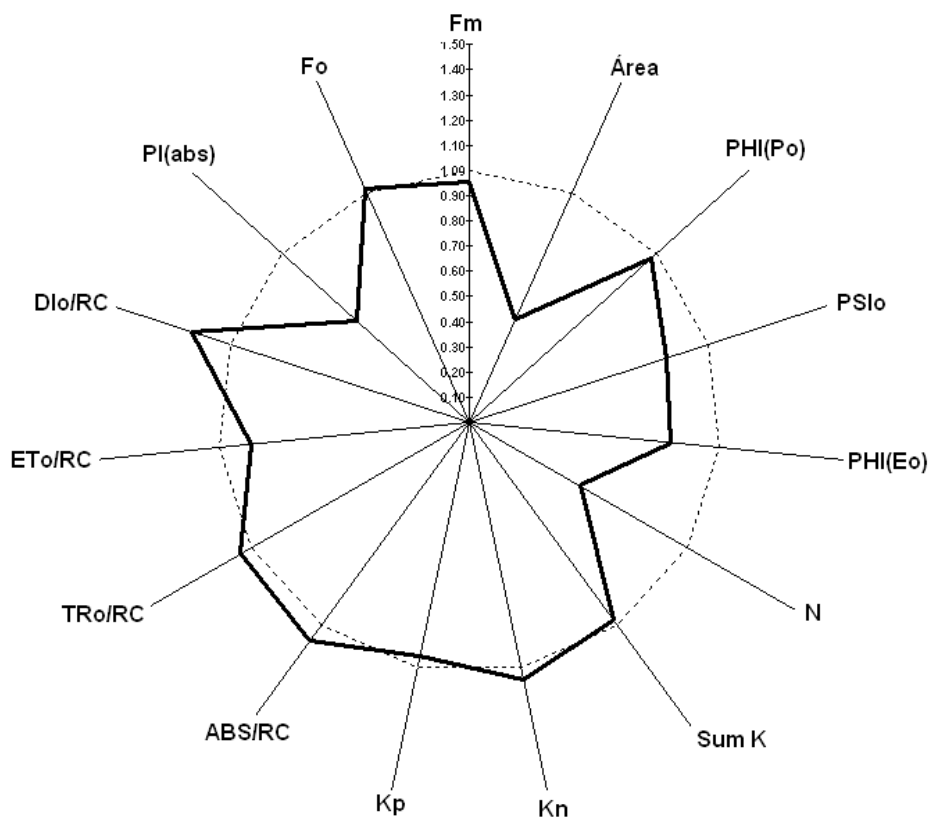


Figura 24. Gráfica de radar de los parámetros de emisión de fluorescencia de la Chl *a* del FSII en cloroplastos aislados infiltrados con Uvaol a 136 μ M.

5.13 Determinación de la actividad tóxica en *Artemia salina* del triterpeno Uvaol

En el ensayo de toxicidad con el crustáceo *Artemia salina*, el compuesto mostró no ser tóxico, ya que la CL_{50} es mayor a 1000 ppm, como se puede ver en la Figura 25.

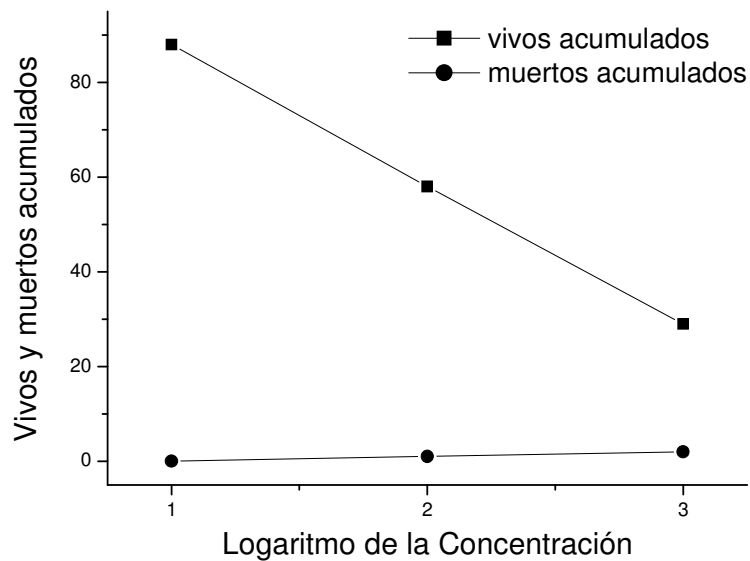


Figura 25. Gráfica que muestra la actividad tóxica del Uvaol

6. CONCLUSIONES

- En ensayos *in vivo*, los extractos de las plantas *Pendilanthus calcaratus* y *Cercocarpus macrophyllus* mostraron actividad alelopática, al disminuir su crecimiento y las curvas de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII en las plantas mono y eudicotiledóneas (pasto y trébol).
- Del extracto hexánico de las hojas de la planta *Cercocarpus macrophyllus* se aisló por primera vez el compuesto 3β,28-dihidroxiurs-12-eno (Uvaol).
- El compuesto Uvaol Inhibió el FSII, encontrándose dos sitios de inhibición uno en feofitina afectando la reducción de Q_A y otro en Q_B similar al comportamiento del DCMU.
- El compuesto uvaol no mostró ser tóxico en la Prueba de Toxicidad con el crustáceo *Artemia salina*, teniendo una CL₅₀ mayor a 1000 ppm, siendo menos tóxicos que otros compuestos no naturales o sintéticos.
- Se sugiere que el compuesto Uvaol puede ser utilizado como líder para el desarrollo de nuevos herbicidas más eficaces, biodegradables y menos tóxicos.

7. REFERENCIAS

- Allen JF and Holmes NG. (1986). Electron transport partial reactions. En: Hipkinns MF, Baker NR (eds) Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach, Chapter 5. IRL Press, Oxford United Kingdom, pp 103-141.
- Arnon DI (1949). Cooper enzymes in isolated chloroplasts polypenoxidase in *Beta vulgaris* Plant Physiol 24:1-15
- Baker DD and Schwintzer CR (1990). Introduction in The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants. (eds) Schwintzer CR and Tjepkema JD, pp 1-31. Academic Press, New York
- Begum S, Hassan SI, Ali SN, Siddiqui BS (2004). Chemical constituents from the leaves of *Psidium gujava*, Natural Product research 18:135-140.
- Blauer AC, Plummer AP, Mc Arthur ED, Stevens R, and Giunta BC. (1975). Characteristics and hybridization of important Intermountain shrubs. I. Rose family. USDA Forest Service Research Paper INT-169. 36 pgs.
- 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 Enviroment. A Field and laboratory Manual. Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC and Longs SP. Chapman and Hall, London, UK pp193-205
- 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*. Pytochemistry 40:419-425
- Delosme R. (1971). New results about chlorophyll fluorescence "in vitro". En: Forti G, Avron M and Melandri A (eds). Proceedings of the 2nd. International Congress on Photosynthesis Research. pp187-195
- Dewick PM. (2002). Medicinal Natural Products, 2da Edición, John Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra. Pp 167-231.
- Dilley R. (1972). Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+}) exchange phenomena. Meth Enzymol 24:68-74

- Duke SO, Dayan FE, Romagni JG and Rimando AM. (2000). Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*. 40:99-111
- Duke SO, Lyndon J. (1987). Herbicides from natural compounds. *Weed technology*. 1:122-128.
- Einhellig FA. (1995). Allelopathy: organisms, processes and applications. (Inderjit, Darkshini y Einhellig Ed.), Vol 582, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 1-24.
- Gonzalez IM, Farfán N, Trejo C, Uribe S, and Lotina HB. (2005). Selective Herbicide Activity of 2,5-Di(benzylamine)-p-benzoquinone against the Monocot Weed *Echinochloa crusgalli*. An in Vivo Analysis of Photosynthesis and Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:3415-3420.
- 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 pp75-112
- Hauska G and Trebs A. (1977). Artificial acceptors and Donors En: (trebsA, Avron M (eds). *Enciclopedia of Plant Physiol. New Series*. Springer-Verlag. Nueva York, USA, Vol 5, pp 226-282.
- Hipkins MF and Baker NR. (1986). *Photosynthesis transduction a practical approach* IRL Press Oxford Washington.
- Isawa S. (1980). Acceptors and donors for chloroplast electron transport. *Meths in enzimol* 69:413-433
- Jiménez A, Mata R, Lotina HB and Anaya AL. (1998). Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. *Z Naturforsch* 53c:55-59
- Klemmedson JO. (1979). Ecological importance of actinomycete-nodulated plants in the western U.S. *Botanical Gazette* 140(suppl.):S91-S96.
- Kogan MA, Perez AJ (2003) *Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile Pp. 22-31

- Lotina HB and Cruz M. (1986). Aceptores y donares artificiales de electrones en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis. 2: 49-59
- Macias ML, Rojas IS, Mata R and Blas LH. (1999). Effect of selected coumarins of spinach chloroplast photosynthesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 2137-2140.
- Maldonado Rodríguez. Biolyser program. 2000.
<http://www.unige.ch/sciences/biology/bionen>
- Morales FF, Aguilar 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
- Mukherjee KS, Ghosh PK and Mukherjee RK. (1985). Indian Chemistry. Soc. 62, 77
- Ouitrakul R and Izawa S. (1973). Electron transport and photophosphorylation in chloroplast a function of electron-acceptor 2. acceptor-specific inhibition by KCN. Biochim Biophys Acta 305:105-118
- Piozzi F, Paternostro M, Passannanti S and Baitiz EG. (1986). Phytochemistry. 25,539.
- Rice EL. (1984). Allelopathy, 2edn. Academic Press, Orldando, FL.
- Rickert KW, Sears J, Beck WF and Brudvig GW. (1991). Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris (hydroxymethyl)aminomethane. Biochemistry 30:7888-7894
- 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.
- Sanchez AN, Priego CF and Luque de Castro MD. (2007). Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography-mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. Journal of Chromatography A. 1165: 158-165
- Siddiqui BS, Hafeez F, Begum S and Siddiqui BS. (1986). Natural Products. Lloydia. 49, 1086.

- Siddiqui BS, Ilyas F, Rasheed M and Begum S. (2004). Chemical constituents of leaves and stem bark of *Plumeria obtuse*. *Phytochemistry*. 65:2077-2084
- Strasser RJ, Srivastava A and Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 66:32-45.
- Strasser RJ, Srivastava and Tsmill. (2002). The Fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In Yunus. M. Pathrc. U. Mohonty, P. (eds) *Probing Photosynthesis. Mechanism, regulation and adaptation*. Taylor and Francis. New York. London. Pp 445-483.
- Swain J. (1977). Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28,479-501
- Uddin AV, ur-Rahman A. (1994). *Handbook of Natural Products*. 1ra Edición. Amsterdam, Holanda, Vol 2. pp 533-534.
- Vander H. (2002). *Molecular Systematics of Cercocarpus H.B.K. (Rosaceae)*. The University of Texas at Austin.
- Wu H, Pratley J, Lemerle D, Haig T y Haig T. (1998). Differential allelopathic potential among wheat accessions to annual ryegrass. In: *Proceedings 9th Australian Agronomy Conference, Wagga Wagga, Australia, 567-571*.
- Wu H, Pratley J, Lemerle D, Haig T y Haig T. (1999). Crop cultivars whit allelopathic capability In: *Proceedings 9th Australian Agronomy Conference, Wagga Wagga, Australia*.
- Yamaguchi K. (1970) *Spectral Data of Natural Products*. Vol 1. pp146-147.

8. APENDICE

8. I Medios

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio de transporte de electrones.

Compuesto	Concentración	Peso (g/L)
Sacarosa	100 mM	34.22

KCl	10 mM	0.7455
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mM	1.0165
Tricita	1 mM	2.688
KCN	0.5 mM	0.0325
MV	50 μM	0.01286

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio de transporte de electrones sin MV

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio de transporte de electrones para FSII

Compuesto	Concentración	Para 1 L
NH ₄ Cl	6 Mm	24ml solución 250 mM
DCPIP*	100 μM	2.5ml solución 20 mM
K ₃ [Fe(CN) ₆]	300 μM	7.5 solución 40 mM

Se afora a 1L con medio de transporte de electrones sin MV

Ajustar el pH a 8.0 con KOH.

* se debe preparar el mismo día.

Medio de transporte de electrones para FSI.

Compuesto	Concentración	Para 1 L
NH ₄ Cl	6 mM	24 ml solución 250 mM
DCPIP*	100 μM	2.5 ml solución 20 mM
Ascorbato de Sodio	300 μM	45 μl solución 20 mM

Se afora a 1L con medio de transporte de electrones sin MV

Ajustar el pH a 8.0 con KOH.

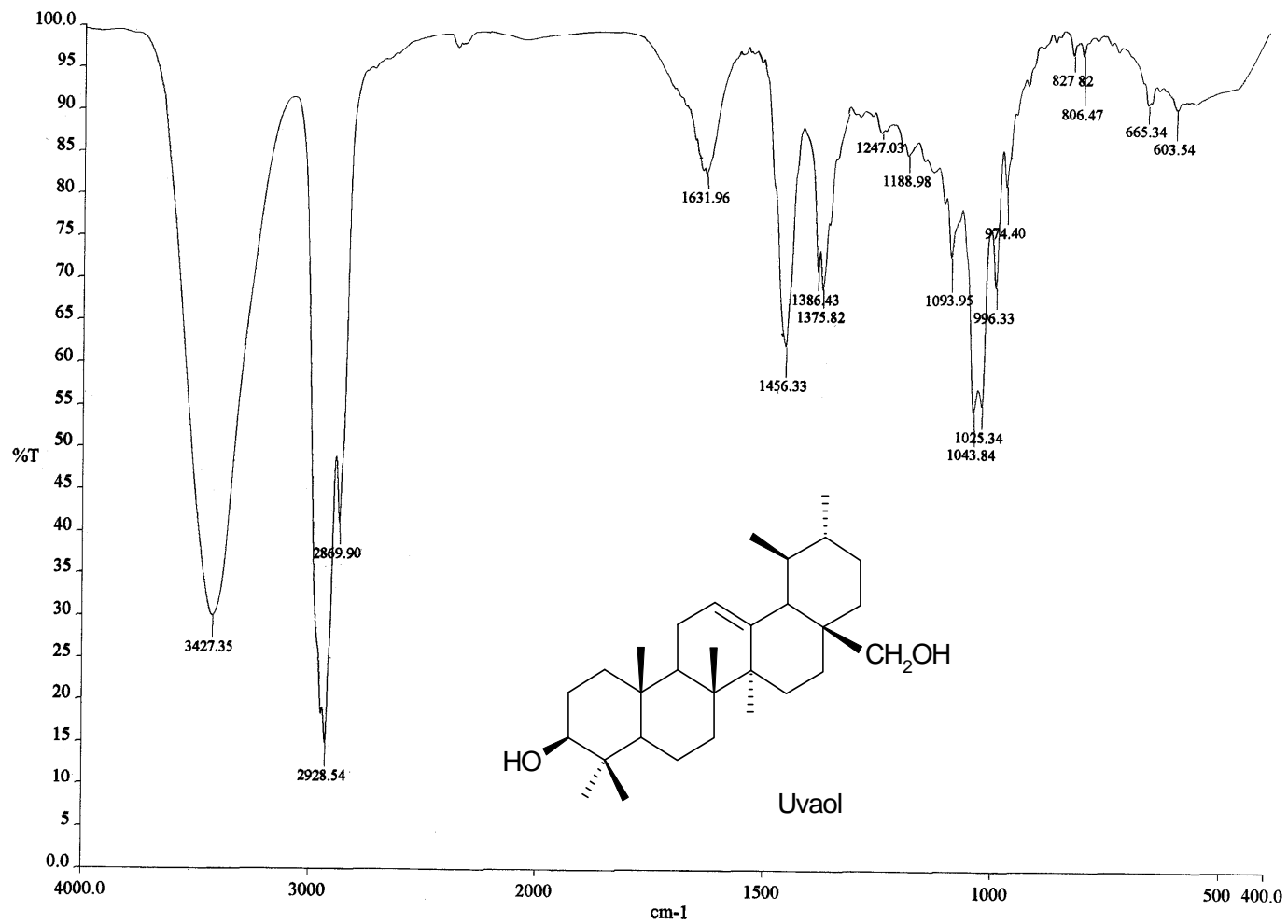
* se debe preparar el mismo día.

Preparación de Sulfato cérico amoniacal.

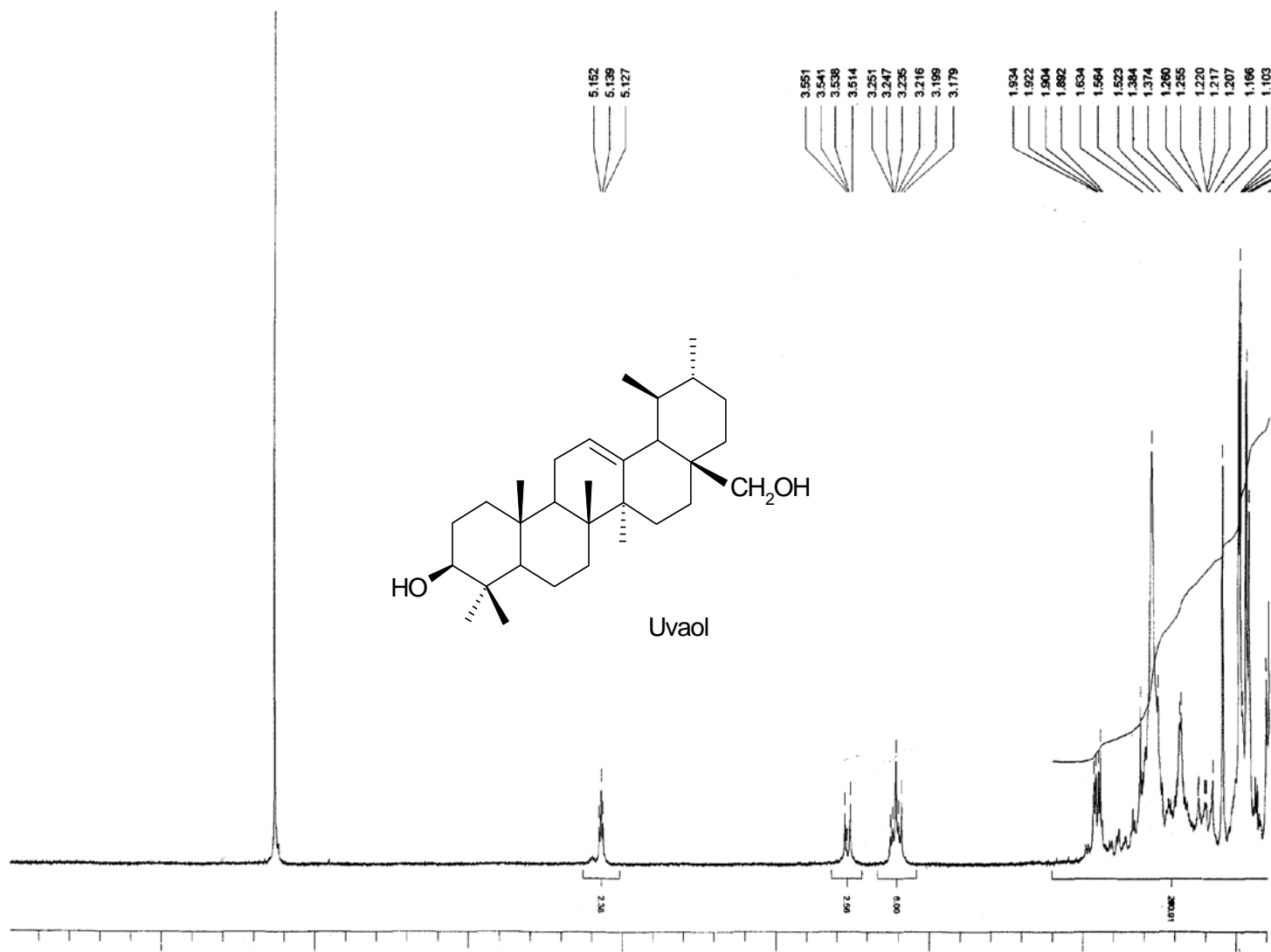
Compuesto	Cantidad
Hielo	350 g
Sulfato cérico amoniacal	12 g
H ₂ SO ₄ concentrado	22 ml

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).

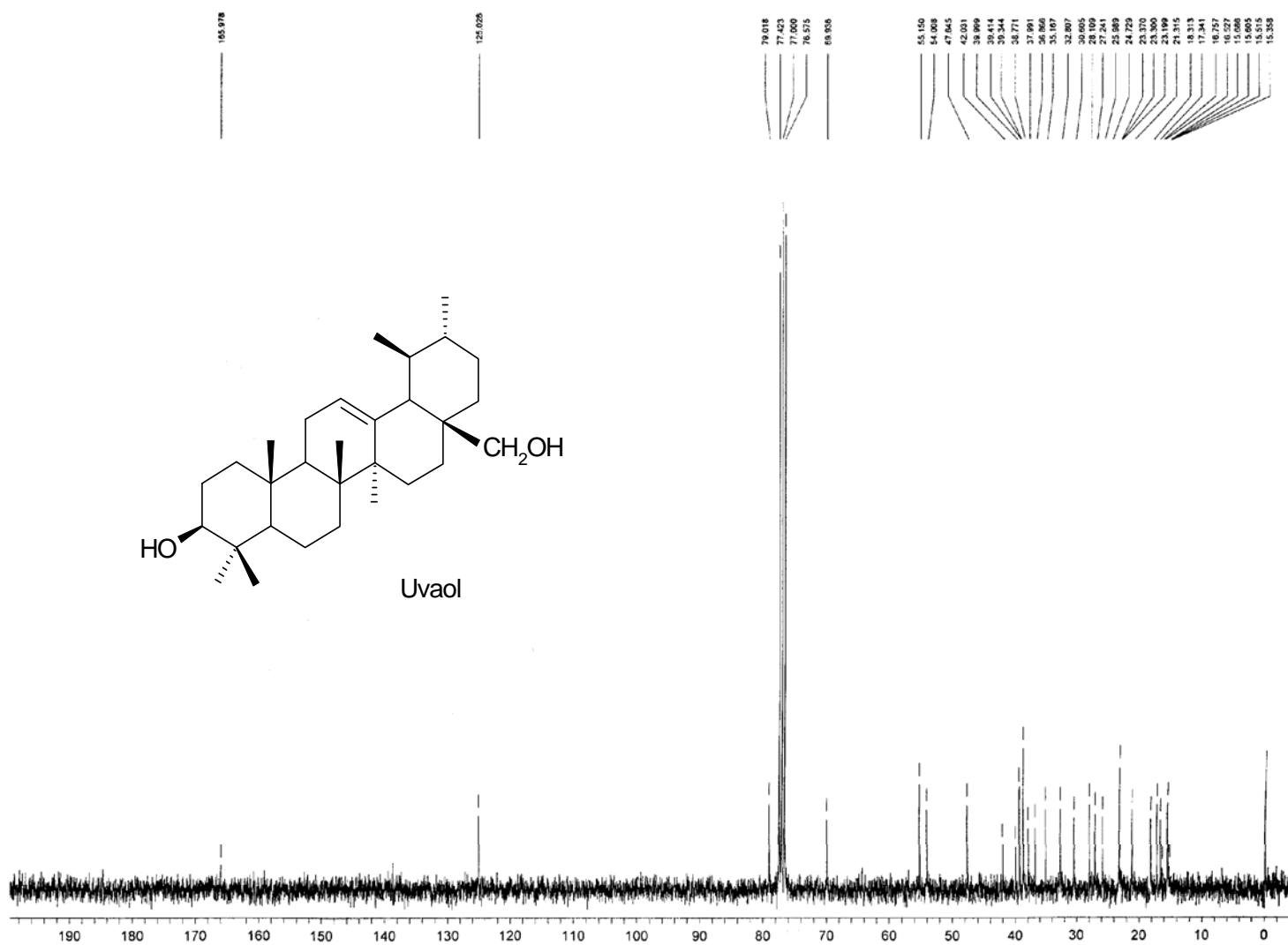
8.2 Espectros



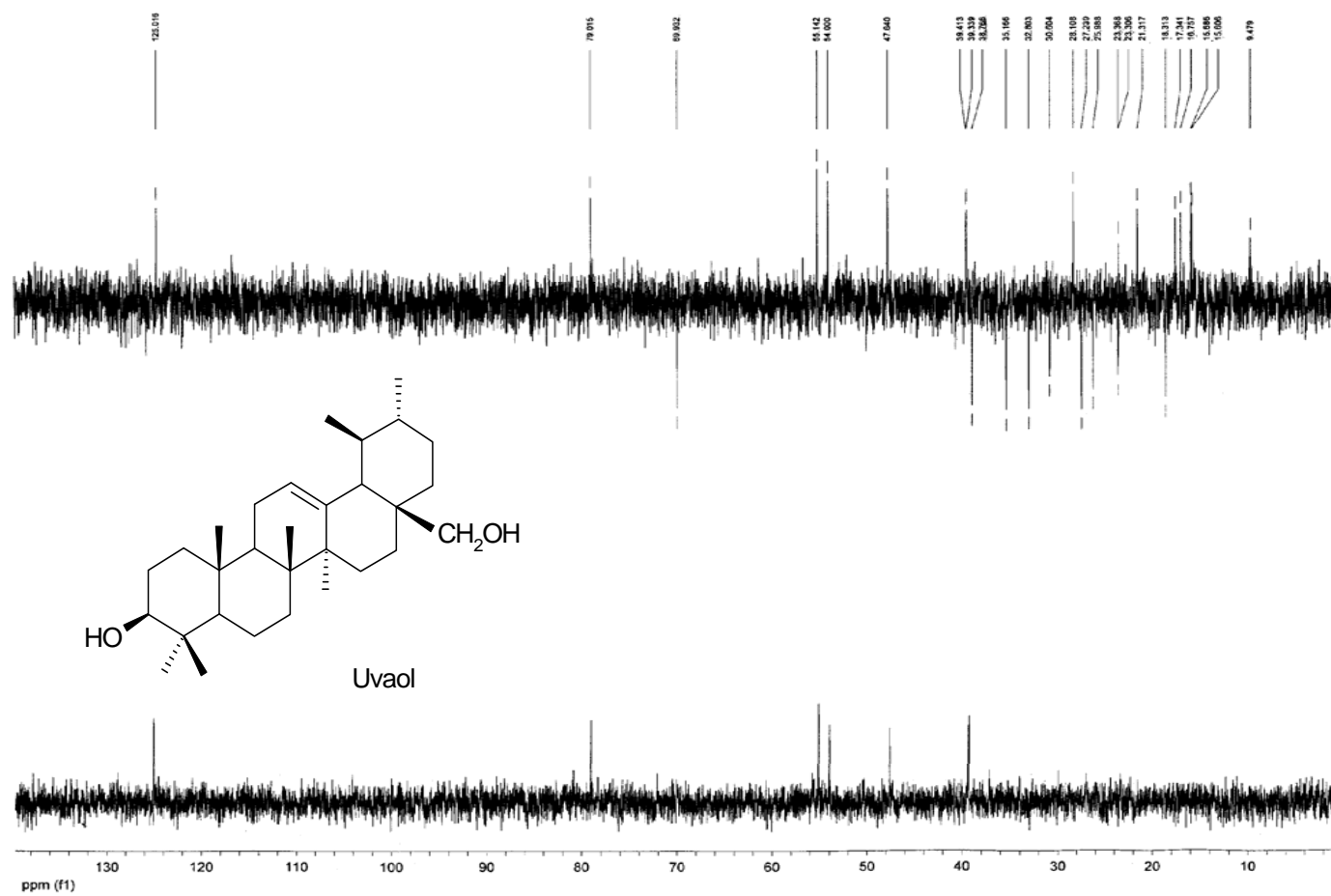
Espectro 1 Espectro IR del triterpene 3 β ,28-Dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)



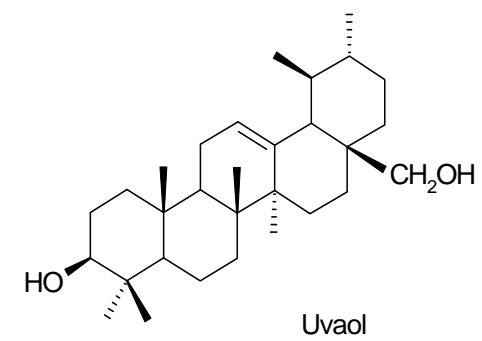
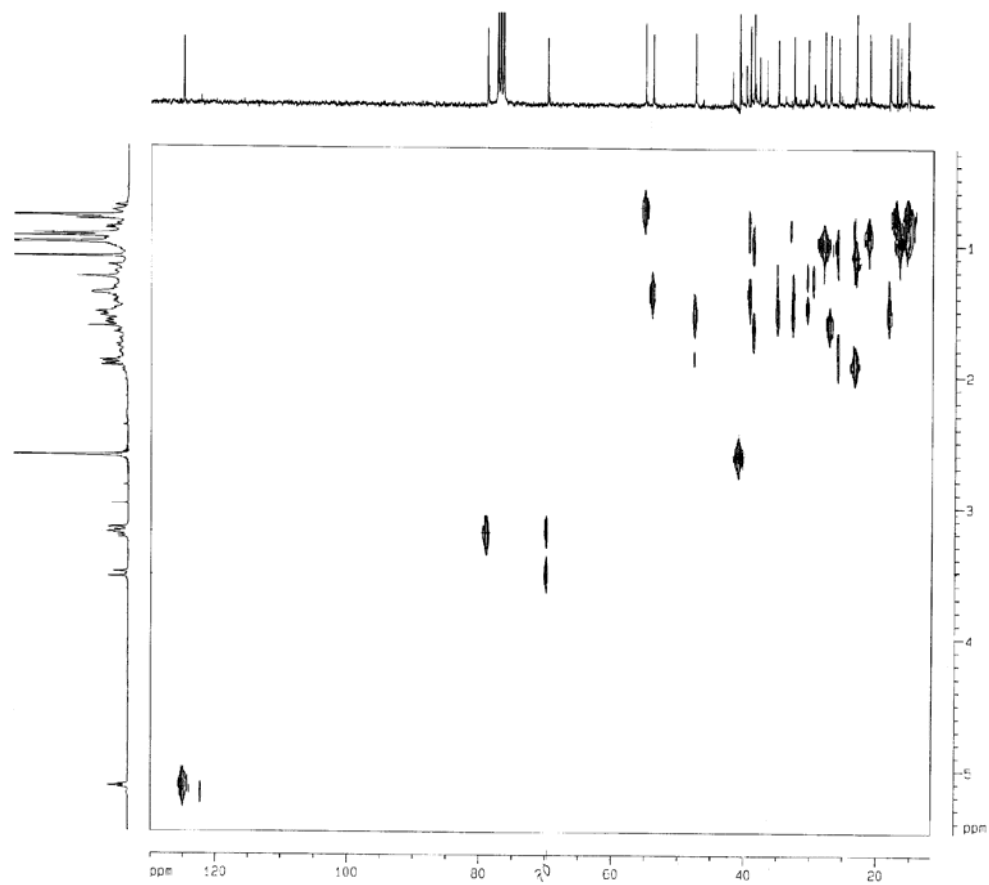
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H del triterpeno $3\beta,28$ -Dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)



Espectro 3. Espectro de RMN ¹³C del triterpeno 3β,28-Dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)

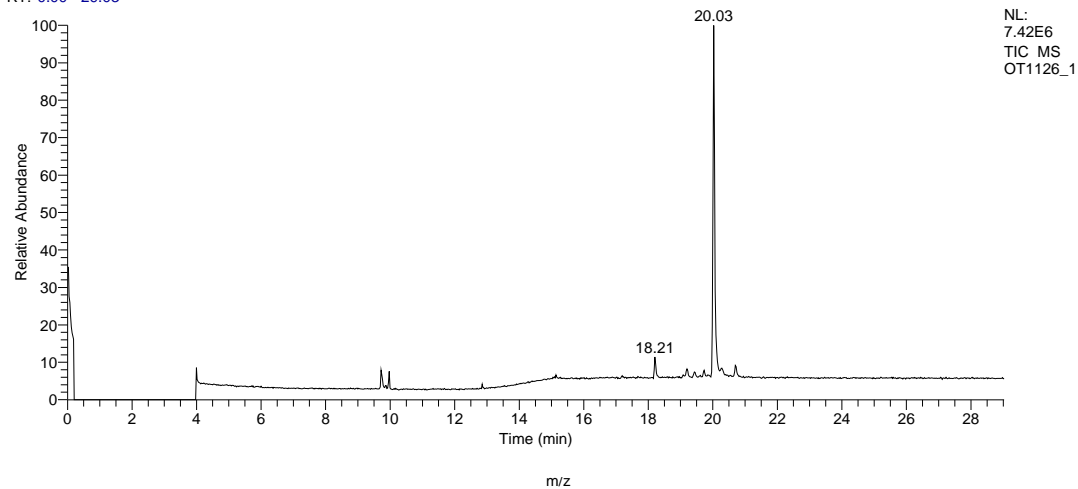
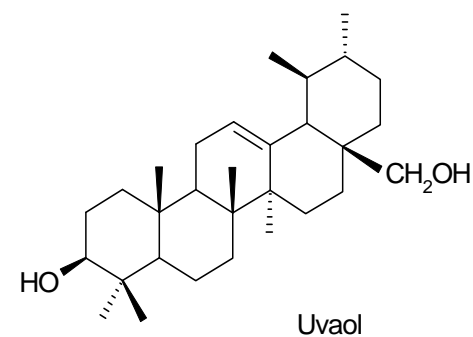
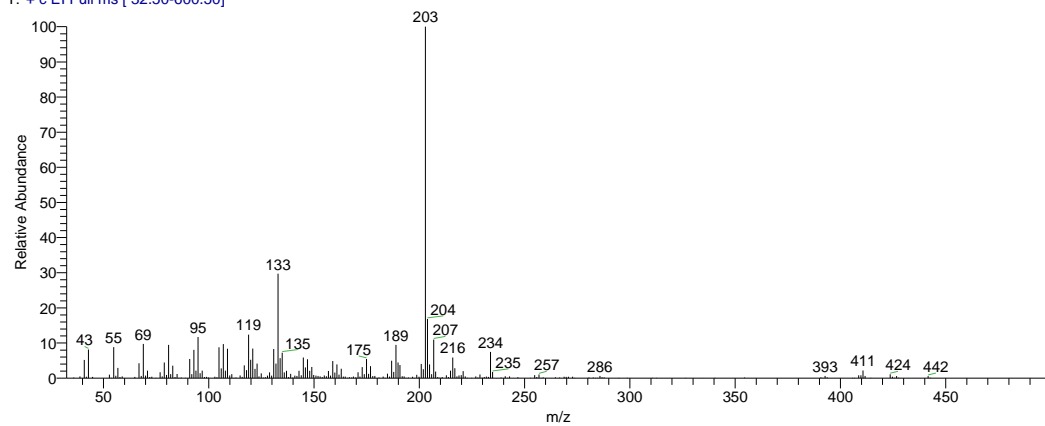


Espectro 4 Espectro DEPT del triterpene 3 β ,28-Dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)



Espectro 5. Espectro HeteroCor del triterpeneo 3 β ,28-Dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)

RT: 0.00 - 29.03

OT1126_1 #867-869 RT: 20.01-20.05 AV: 3 SB: 16 20.24-20.42, 19.75-19.89 NL: 9.78E5
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]

Espectro 6. Espectro de masas por impacto electrónico del triterpeno 3 β ,28-Dihidroxiurs-12-eno (Uvaol)