



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Influencia de los Glucósidos de Turbina Corymbosa en la
Germinación de Semillas de Ipomea Murucoides

T E S I S

Que para obtener el Título de

BIOLOGO

P r e s e n t a

Oliva del Rey Cruz



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 está 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.

INDICE

	PAG.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. OBJETIVOS	18
IV. UBICACION TAXONOMICA	19
1) Clasificación	
2) Sinonímias	
3) Descripción de la especie	
4) Usos	
V. METODOLOGIA	23
1) Métodos	
2) Diagramas experimentales	
VI. RESULTADOS	29
VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES	57
VIII. BIBLIOGRAFIA	68
IX. ANEXOS	71

RESUMEN

Se investigó el papel de los glucósidos de Turbina corymbosa en la germinación de semillas de Ipomoea murucoides.

El ensayo se efectuó con embriones y endospermos, probando soluciones de los glucósidos a distintas concentraciones (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11}). Se empleó agua y AG_3 como testigos.

Se obtuvo actividad enzimática, tanto en embrión como en endospermo, para degradar el material de reserva y para síntesis de proteínas.

Por medio del análisis estadístico se puede afirmar -- que los resultados obtenidos son debidos a las combinaciones de concentración, tiempo y substancia. Todas las diferencias tuvieron un nivel de significancia del 0.0001 y 0.0005.

Paralelamente al ensayo biológico se efectuó un estudio químico preliminar de la semilla. Se analizaron tres extractos: hexánico, de acetato de etilo y metanólico.

Se determinó la composición del aceite obtenido del extracto hexánico.

Del extracto de acetato de etilo se obtuvieron varias fracciones en placa preparativa, dos de las cuales corresponden, por análisis espectroscópico, a una cera y un glicósido.

El extracto metanólico mostró en cromatografía en placa delgada una mancha a nivel de los kaurantrioles (mismo Rf) y -- manchas en la zona de los glucósidos kauranólicos.

INTRODUCCION

En el estudio de la botánica, en el área referente a la fisiología de la germinación en plantas superiores, es ineludible el referirse a "semilla" y "germinación" al mismo tiempo.

Gracias a la semilla, el desarrollo evolutivo que han podido tener los taxa que presentan dicha estructura (Pteridospermae, Gymnospermae y Angiospermae) es enorme, puesto que otorga al embrión protección y alimento seguros para su desarrollo, colocándolos así en una posición ventajosa sobre las demás especies. (1).

Las semillas verdaderas son el resultado de la fertilización de un óvulo maduro, con material de reserva, embrión y capas protectoras (2). Debido al desarrollo de nuevas técnicas y al uso del microscopio electrónico de barrido, el estudio histológico y anatómico de las semillas se ha facilitado notablemente. En cuanto a los aspectos fisiológicos, su análisis no ha alcanzado el mismo desarrollo.

Diversos investigadores tratan de esclarecer los mecanismos internos que mantienen viva la semilla y que le permiten germinar, mediante estudios diversos como: el descenso de actividad metabólica durante el reposo y fenómenos que inician la germinación como la hidratación, la movilización de reservas, etc. (3).

Así, cuando una semilla viable se imbebe, se desencadena el proceso de germinación que implica síntesis de proteínas, aumento en la división celular, mecanismos de regulación hormonal, hidrólisis de material de reserva, respiración y transpor-

te de nutrientes, finalizando este cuando emerge el hipocótilo e inmerge la radícula (4). Los factores, tanto internos como-
externos, por los que este proceso se inicia y desarrolla son-
diversos, ya que, a pesar de ser un proceso común en los vege-
tales, no sigue un patrón general.

Aunada a la cantidad de oxígeno disponible, temperatu-
ra adecuada, luz y agua, una condición de importancia en y du-
rante la germinación es el aporte de nutrientes para el embrión.
Para satisfacer tal requerimiento la semilla tiene almacenadas
reservas nutritivas en el endospermo(o perispermo) y en los co-
tiledones (dicotiledóneas) o en el endospermo (monocotiledo-
neas) en cantidad suficiente, las que, por medio de mecanismos
bioquímicos, se degradan y se transportan hacia el eje embrio-
nario.

Uno de los grupos de vegetales más estudiado desde mu-
chos puntos de vista y debido a su importancia económica es el
de los cereales, por lo que es en este grupo donde se conocen
más los procesos fisiológicos de la germinación.

Edelman et al (1959) demostraron que en las semillas-
de cereales la glucosa resultante de la degradación del almi-
dón se convierte en glucosa-6-fosfato por acción de una hexo-
quinasa en presencia de ATP, parte de la cual se transforma en
fructuosa-6-fosfato (F-6-P) y otra parte en glucosa-1-fosfato;
esta última se convierte en uridindifosfoglucosa (UDPG) en pre-
sencia de uridintrifosfato (UTP). Por condensación del UDPG y
de la F-6-P se forma la sacarosa en el escutelo, de donde se -
transporta al embrión. (5).

Los procesos que se presentan en la germinación invo-
lucran la presencia de enzimas, las cuales pueden ser sinteti-
zadas "de novo" o solamente activadas por la imbibición. Las-

enzimas relacionadas con la degradación del almidón y cuerpos proteícos existentes en la semilla se sintetizan "de novo" en la capa de aleurona. La formación de estas enzimas se induce por fitohormonas, entre las cuales se encuentran las giberelinas, tanto en gimnospermas como en angiospermas (6,7).

En semillas de trigo, el ácido giberélico (AG_3) procedente del embrión se difunde a través del endospermo hacia la capa de células de aleurona, activando los genes para la síntesis de hidrolasas (proteasas, peptidasas, alfa y beta amilasas) que luego son vertidas al endospermo, donde se inicia la degradación de las reservas (8, 9).

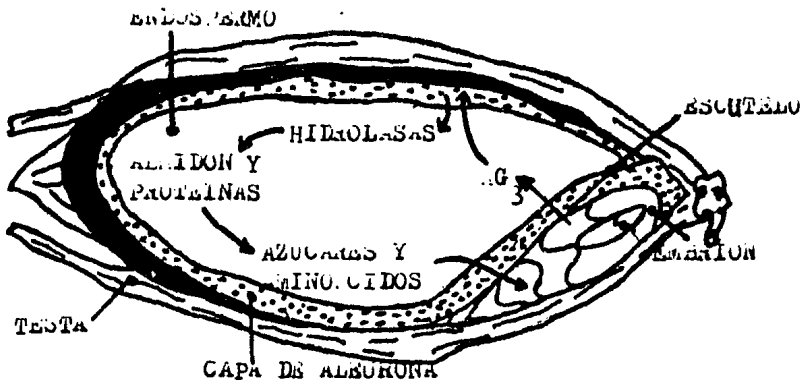


Fig. No. 1

Esquema de un corte longitudinal de semilla de cebada donde se señala la producción de AG_3 , síntesis de hidrolasas y movilización de material de reserva. (8, 10).

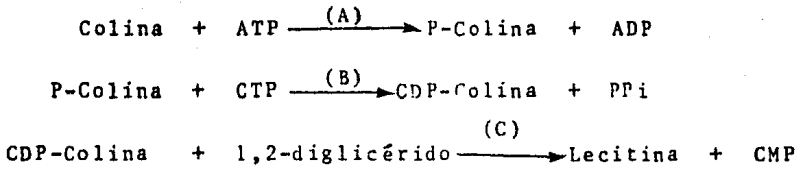
Aún no está totalmente aclarado el mecanismo de acción del ácido giberélico en las células de aleurona, a pesar de que se conoce el resultado de su acción: la desrepresión de los genes para la síntesis de alfa-amilasa y otros tipos de hidrolasas.

En estudios sobre el particular (8, 10) se describe un aumento en la síntesis de ribosomas, en la formación de polirribosomas y de retículo endoplásmico rugoso, de dos a cuatro horas después de la aplicación de ácido giberélico exógeno, alcanzándose un máximo a las doce horas. Los polirribosomas se unen al retículo endoplásmico y presentan marcas de triptofano y tiosina, los que son característicos en la composición de aminoácidos de la alfa-amilasa. Esto no quiere decir que la síntesis de la alfa-amilasa dependa de la formación de ribosomas (8).

Es probable que este aumento en polirribosomas sea un evento paralelo a la inducción en la síntesis proteica.

Otro suceso que se presenta en aleurona, como respuesta a AG_3 exógeno, es la incorporación de fósforo marcado (P^{32}) a fosfolípidos, lo que sugiere una conversión de lípidos de reserva, los cuales disminuyen en presencia de AG_3 . El mayor porcentaje de fosfolípidos presentes en aleurona lo ocupa la lecitina, en cuya síntesis intervienen tres enzimas: colinaquinasa (A), fosforilcolincitidiltransferasa (B) y fosforilcolingliceriltransferasa (C). El AG_3 incrementa la actividad de las dos últimas enzimas (8) en un período de quince minutos.

Paralelamente, o quizá antes del aumento de actividad de (B) y (C), se observa una incorporación mayor de fósforo marcado al citidintrifosfato (CTP, dador de energía) y varias horas después una mayor incorporación de colina marcada a los lípidos microsomales y de P^{32} a los fosfolípidos.



De acuerdo con esto se propuso un modelo de acción -- postranscripcional para el AG_3 , en el que la síntesis del retículo endoplásmico se inicia poco después de la aplicación del AG_3 y se completa en un lapso de cuatro a ocho horas; después se liberan enzimas hidrolíticas, cuya síntesis se efectúa a partir del RNAm , ya presente en aleurona antes de la acción del AG_3 .

El segundo modelo que se propuso para la acción del AG_3 es el transcripcional, basado en que el RNAm existente en aleurona tiene un ácido poliadenílico (poli-A) en su extremo $3' -\text{OH}$. Se sabe que el AG_3 aumenta la síntesis de RNAm durante las tres ó cuatro primeras horas de su aplicación, como indica el empleo de precursores marcados (adenosina o uridina), que confirma que la síntesis de las regiones poli-A y no poli-A del RNAm aumenta con el AG_3 .

En otros estudios "in vitro" se ha comprobado que el RNA_m específico para alfa-amilasa incrementa su actividad en presencia de AG_3 , lo cual, aunado a la formación de polisomas y a la cantidad de alfa-amilasa producida, indica que todos estos procesos están relacionados. (11)

Del empleo de inhibidores de la síntesis del RNA_m en en capa de aleurona de trigo y de los resultados observados se dedujo que: la síntesis rápida de alfa-amilasa después de doce horas de haber aplicado AG_3 es postranscripcional.

- El RNAm para alfa-amilasa debe ser sintetizado an-

tes o durante las doce primeras horas de la aplicación de AG_3 .

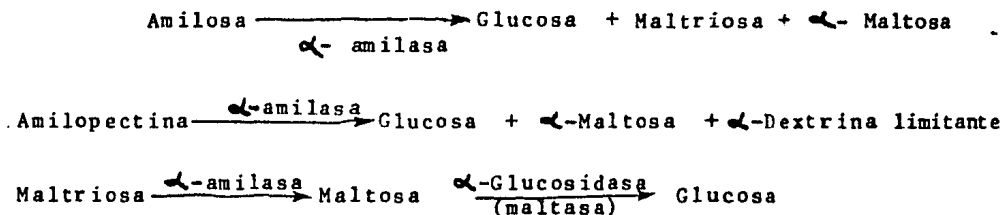
- El RNAm para alfa-amilasa es muy estable, ya que -- aunque se forma durante las primeras doce horas de tratamiento, funciona bien después de este período (12).

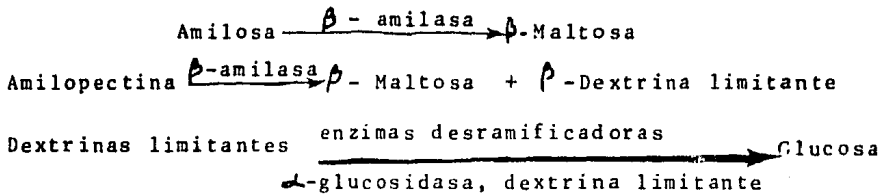
En 1976, Higgins y colaboradores, por medio de la inmunoprecipitación y electroforesis en gel de poliacrilamida, - analizaron los productos obtenidos al aislar RNA poli-A de células de aleurona, probándolos para alfa-amilasa en un sistema libre de células. Demostraron que el nivel de alfa-amilasa aumenta en los tejidos tratados con AG_3 paralelamente al incre--mento de la síntesis de enzimas (11).

Las sustancias de reserva de las semillas son polisacáridos, de los cuales se tratará únicamente el almidón, y proteínas.

Almidón. - El almidón está formado por dos polisacáridos: amilosa y amilopectina. La amilosa está constituida por cadenas lineales largas de alto peso molecular, con enlaces alfa 1,4 y conformación helicoidal. La amilopectina tiene una - estructura ramificada con enlaces alfa 1,4 y alfa 1,6.

Un esquema de la degradación del almidón se presenta en seguida:





Las dextrinas limitantes se forman debido a la incapacidad de la alfa-amilasa para hidrolizar los enlaces alfa-1,6 - de la amilopectina. Aparentemente la beta-amilasa no puede atacar la cadena de almidón como tal, solamente a las dextrinas liberadas por la acción anterior de la alfa-amilasa.

La maltosa producida por la acción conjunta de la alfa y beta amilasa es hidrolizada a glucosa por una alfa-glucosidasa (maltasa).

Los azúcares libres se desplazan al escutelo donde son absorbidos para llegar al embrión.

Proteínas.- La reserva de proteínas en las semillas - está localizada principalmente en la capa de células de aleurona y en el endospermo, la movilización de estas reservas parece desempeñar un papel muy importante en el aporte de aminoácidos-necesarios para la síntesis de enzimas hidrolíticas.

Osborne propone una clasificación para las proteínas - en semillas basada en su solubilidad:

Albúminas.- Solubles en agua a pH neutro o poco ácido; se coagulan con calor. Son principalmente proteínas enzimáticas.

Globulinas.- Insolubles en agua pero poco solubles en soluciones salinas y no son tan fácilmente coagulables con ca--

lor como las anteriores.

Gluteínas.- Insolubles en agua, soluciones salinas o en etanol. Pueden ser extraídas por soluciones alcalinas.

Prolaminas.- Solubles en etanol (90%) pero no en agua, con un alto contenido de prolina y amidas (glutamina y aspargina) y bajo en triptofano, lisina y metionina (13).

El tipo y cantidad de proteínas que se encuentra en la semilla depende de cada especie, por ejemplo en trigo la capa de aleurona es rica en proteínas con arginina y en arroz la aleurona tiene abundancia de albúminas. Las gramíneas tienen un alto contenido de prolaminas (no común en otras especies) y son deficientes en gluteínas (por ejemplo: lisina). En dicotiledóneas las proteínas predominantes son las globulinas, que en muchos casos han demostrado ser glicoproteínas.

Las proteínas en las semillas también se presentan en forma de cuerpos proteicos que son llamados por Harting "granos de aleurona", aunque esta forma de almacenaje no está restringida a la aleurona, puesto que en los cereales estos cuerpos se encuentran en la mayoría de las células del endospermo.

La forma de estos cuerpos proteicos varía de ovoide a redonda y están rodeados por una membrana de lipoproteínas. En cuanto a su composición, varía según la especie en la que se encuentren, por ejemplo en cereales pueden presentarse como inclusiones (cristaloides y/o globoides) de una sola proteína o varias.

En particular, en el trigo hay hidrólisis de proteínas en la capa de aleurona, (Fig. No. 2) cuyos aminoácidos sirven para la síntesis de enzimas hidrolíticas. Este sistema proba--

blemente esté controlado por giberelinas provenientes del embrión. En seguida hay movilización de las reservas en el endospermo, que se utilizan en la germinación, se sintetizan también proteínas que son secretadas por la aleurona (controlado por giberelinas), preformando y activando proteinasas por y en el endospermo y además, existe un sistema en el eje embrionario que puede ser de importancia para el regreso de las proteínas al embrión en crecimiento y/o para la hidrólisis de cualquier péptido pequeño transportado al escutelo del endospermo (13).

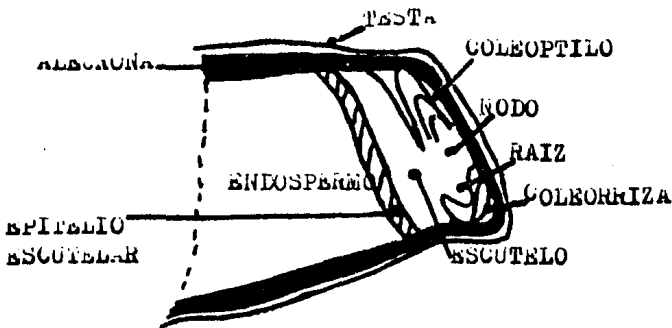


Fig. No. 2

Corte transversal de un grano de cereal en su región embrionaria (12).

En cuanto a las dicotiledóneas, el desdoblamiento de las reservas es diferente (dicotiledóneas endospérmicas).

En este tipo de semillas las sustancias de reserva son polisacáridos de distinta naturaleza, por ejemplo, en semillas -

de leguminosas se encuentran galactomananos o glucogalactomananos, cuyas unidades de manosa (enlaces beta-1,4) están unidas a la galactosa por enlaces alfa-1,6. En su degradación interviene la alfa-galactosidasa (rompe enlaces alfa-1,6), la beta manasa - (endoenzima), que hidroliza oligómeros de manosa (tetrasacáridos o más largos) a manotriosas, manobiosas y la beta-manosidasa que rompe los di y trisacáridos en manosas y puede también hidrolizar residuos de un oligomanano (actuando como una exomanopolisacaridasa).

La mayor parte de la glucosa y la manosa producidas en el endospermo (Fig. No. 3) es absorbida y metabolizada en el cotiledón. Varios autores proponen que estos azúcares son rápidamente fosforilados a galactosa-1-P y manosa-6-P, los cuales, si no se emplean directamente para producir energía, pueden transformarse en sacarosa o almidón, y llevarse después al eje embrionario. La enzima fosfomanoisomerasa (PMI), que convierte manosa-6-P a fructuosa-6-P, se ha aislado de los cotiledones de varias dicotiledóneas endospérmicas.

Las leguminosas endospérmicas son el único tipo de semillas cuyos cotiledones no sintetizan el almidón de reserva hasta después de que la germinación ha comenzado (13).

Las reservas endospérmicas de las dicotiledóneas y monocotiledóneas son diferentes, sin embargo, la hidrólisis de éstas en ambas se efectúa mediante enzimas liberadas por la capa de aleurona, siendo sus productos absorbidos y modificados por los cotiledones antes de pasar al eje embrionario.

Por lo que respecta a la hidrólisis de proteínas, en este mismo taxa no hay nada claro. No se puede establecer un mecanismo general puesto que los estudios realizados con diferentes especies arrojan diversos resultados, pero de ellos se-

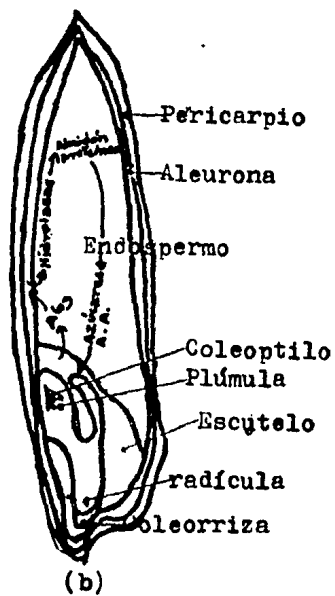
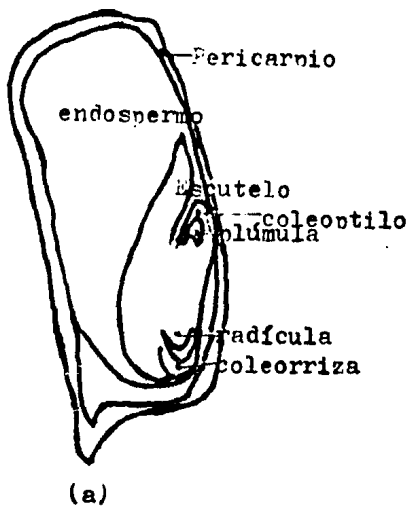


Fig. No. 3

Corte Longitudinal de Zea Mays (a) Triticum sp en semilla.

deduce que la degradación de proteínas se incrementa poco después de la imbibición (13).

En los últimos años se ha demostrado que las proteínas almacenadas en las leguminosas son glicoproteínas.

GIBERELINAS.- Dentro de las muchas sustancias involucradas en los mecanismos de regulación interna con los que cuenta la semilla están las giberelinas, a las cuales se les puede relacionar con el control enzimático de la semilla en germinación.

De las giberelinas identificadas, no todas tienen actividad biológica. Al parecer, algunas forman parte de la ruta de transformación hacia moléculas con actividad giberélica, y se ha visto que las más activas poseen una lactona unida al anillo "A". Al parecer, las giberelinas se sintetizan en varias partes de la planta pero en mayor proporción en las partes en crecimiento activo entre las que están los embriones. En un mismo tejido existen varias giberelinas con o sin actividad y cada especie puede reaccionar de diferente forma a una giberelina particular, las condiciones ambientales influyen también en su reactividad, por ejemplo, en plantas de chícharo y Pharbitis se ha visto que las que crecen en la obscuridad parecen tener un mayor aprovechamiento de giberelinas libres, ya que plantas de la misma especie, creciendo en condiciones de luz, necesitan mayor cantidad de giberelinas para lograr el mismo nivel de crecimiento. Trabajos realizados en plantas de chícharo parecen indicar que no difieren en la cantidad de giberelina sino en la sensibilidad de los tejidos a la giberelina y luz (10).

El patrón biosintético de las giberelinas (o al menos del AG_3) en plantas superiores, especialmente en trigo, es muy

conocido; a partir de mevalonato, ATP, enzimas, cationes divalentes y diversas reacciones, se obtiene kaureno por medio de la acción de la kaurensintetasa en la transformación del geranil-geranil-pirofosfato (GGPP) a copalilpirofosfato (CPP) (actividad "A") y su posterior conversión a ent-kaureno (actividad "B") y después de varios pasos más a gibano, el cual constituye el esqueleto carbonado de las giberelinas.

En raíces de chícharo se ha observado la síntesis de kaureno en tejidos meristemáticos.

El sitio de síntesis celular de las giberelinas aún no está totalmente establecido. Algunos autores postulan que es en los cloroplastos donde se sintetizan y luego son transportadas hacia la semilla o sitios en donde son requeridas. En la semilla permanecen inactivas hasta que se inicia la germinación, constituyendo así el aporte inicial necesario para la germinación temprana, pudiendo realizarse posteriormente síntesis "de novo" de ellas en el escutelo (10).

En las puntas de las raíces (tres a cuatro mm apicales), se ha demostrado que existe síntesis de giberelinas. Sitón Richmond y Vaadia, extrajeron giberelinas de las raíces de girasoles, reportando posteriormente que la incubación de las puntas de raíces en mevalonato ($2-^{14}\text{C}$) produce kaurenol. No se ha probado que las giberelinas sean esenciales para el crecimiento de la raíz o que lo estimule o inhiba (10).

En yemas apicales de hojas jóvenes se ha estudiado la síntesis de giberelinas en girasoles por medio de técnicas de escisión, aplicación de giberelinas, extracción, difusión y tratamientos con inhibidores de la síntesis giberelínica.

Existen diferentes formas químicas en las que se pre-

sentan las giberelinas, es decir, una giberelina puede estar libre en un momento determinado de la vida vegetativa de la planta o semilla, y estar conjugada con un azúcar en otro instante o sitio. Al parecer, esto está relacionado con las necesidades de transporte o acción (13).

Así mismo, existen varios esquemas que muestran interconversiones entre giberelinas. Hasta ahora se han demostrado algunas transformaciones reales y existen varias más propuestas para las características estructurales de cada una (10).

Teniendo en consideración que los estudios realizados en germinación se han centralizado en monocotiledóneas y que aún no están claros los diferentes sucesos que ocurren en este proceso, el presente estudio trata de ser una aportación al conocimiento de la actividad giberelínica obtenida con glucósidos kauranoicos en el proceso germinativo de dicotiledóneas, de la familia Convolvulaceae, específicamente en Ipomoea murucoides.

Metabolitos.- Como parte del metabolismo de la planta existen dos tipos de metabolitos, los primarios y los secundarios. Los metabolitos primarios son comunes a todos los vegetales y se presentan en grandes concentraciones (glúcidos, lípidos y prótidos). Los metabolitos secundarios, los cuales son de variada naturaleza química, se encuentran en muy pequeñas cantidades y no son comunes a todas las plantas, ni aún en la misma planta se presentan en iguales condiciones durante todo el ciclo vital, pudiendo incluso desaparecer en alguna etapa determinada. Dentro de este tipo de metabolitos se encuentran alcaloídes, glucósidos, flavonoides, terpenos y esteroides que por su característica especificidad para cada especie, se les ha tomado en ocasiones como herramienta taxonómica, o bien se les aísla para darles alguna aplicación.

Dada la importancia de los metabolitos secundarios en una especie, se hace también una aportación efectuando un análisis químico preliminar de los extractos obtenidos de semillas de Ipomoea murucoides.

OBJETIVOS

1.- Aportar una nueva evidencia que apoye la hipótesis que considera los glucósidos kauranóicos aislados de Turbina corymbosa como precursores de giberelinas mediante:

- Determinación de la capacidad del embrión y endospermo de la semilla de Ipomoea murucoides para hidrolizar los glucósidos turbicorina y corimbosina.

- Demostración de que las células de aleurona y el embrión de la semilla de Ipomoea murucoides responden al tratamiento con dichos glucósidos activando el sistema enzimático para hidrolizar polisacáridos de reserva de su endospermo y para sintetizar proteínas.

II.- Contribuir al conocimiento de la composición química realizando un análisis preliminar de los extractos de semilla de Ipomoea murucoides con hexano, acetato de etilo y metanol.

UBICACION TAXONOMICA

Clasificación:

Reino	Vegetal
División	Embryophyta Siphonogama
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Tubiflorae
Suborden	Convolvulineae
Familia	Convolvulaceae
Género	<u>Ipomoea</u>
Especie	<u>murucoides</u> Roemer et Schultes, - 1819.

SINONIMIAS:

Convolvulus macranthus H.B.K., Nov. Gen. Sped. pl. ---
III:85, 1818-1819

Ipomoea macrantha (H.B.K.) G.Don., Syst. IV:267.

DESCRIPCION:

Arbusto o árbol de 4 a 8 m, de madera blanda, con ramas floríferas de 5-6 mm de diámetro, longitudinalmente surcadas, finamente lanuginosas. Pecíolos de 1 - 3 cm, pubescentes, lanuginosos. Láminas elípticas, enteras de 9 - 17 cm de largo por 3.5-4.5 cm de ancho algo pubescentes en la cara superior glabrescentes, pubescentes lanuginosas sobre las nervaduras de la cara inferior. Pedúnculos de 1.0-1.5 cm, brácteas pequeñísimas, caedizas. Pedicelos de 3-4 cm finamente sericeo-pubescentes,-

claviformes. Flores solitarias, axilares o en panículas terminales. Sépalos desiguales; los exteriores de 20-25 mm de largo por 14-15 mm de ancho, densamente sericeo-pubescentes; los interiores de 7-20 mm de largo por 9-10 mm de ancho, pubescentes. Corola blanca, ampliamente acampanulada, pubescente por fuera, de 7.0 - 7.5 cm de diámetro; ovario cónico glabro. - Cápsula ablongiforme de 25 mm de largo, 4 valvas, 2 lobulares, 4 seminadas. Semillas de 11 - 12 mm de longitud, con largos pelos en la parte dorsal y superior y en los bordes, por lo demás, lisas (14).

Localidad tipo: México (O'Donnell, 1941).

Distribución (14, 15, 16, 17).

Sonora, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacan, Querétaro, Estado de México, - Puebla, Morelos, Guerrero, Oaxaca y Chiapas.

También existe en Guatemala y América Central. Según Standley (Op. Cit.), se localizan en matorral árido abierto, a menudo sobre pendiente rocosa o planas, o en bosque árido abierto, frecuentemente en setos o en bosques de roble, entre los 600 a 2000 m de altitud.

Nombres comunes:

Recibe diferentes nombres según la región del país, -- así:

Estado de México.- árbol del muerto
 árbol del venado
 ozote
 cazahuate
 cazahuate blanco
 cazahuate prieto

Morelos.- árbol del muerto
cazahuate
micaquahuitl
ozote
palo de ozote

Michoacan.-palo santo
siete camisas
siete capas

Oaxaca.- cazahuate blanco
cazahuate prieto
ozote
palo de ozote
palo de muerto
palo flojo
palo blanco
palo bobo
pájaro bobo

Querétaro.-palo de ozote
siete pellejos
tonche
tutumescuago
tutumescuavo
tutumuste

tutumuzco
tutumuzcual
Yaga-xuaga
cuasöhuacuabitl
cuasöhuatl

(18, 19, 20, 21,).

Usos:

De sus cenizas se hace lejía para la fabricación de jabones. Se dice que la Xiuhamolli (planta de jabón, 20) una especie del género Ipomoea (probablemente Ipomoea murucoides) - - -

se usa junto con otros ingredientes para evitar la caída del cabllo. El jugo lechoso de su corteza se unta sobre heridas provoca das por mordedura de serpiente. La corteza en cocimiento en bañ^o maría, se emplea para evitar parálisis por afecciones reumáticas. También es usado como combustible, para los hornos de cal. Ade-- más la ingestión de sus hojas por el ganado vacuno, provoca epi-- zootias debido a su acción tóxica (15, 19, 20, 21, 22). En su -- tronco caído y en épocas de lluvia crece un hongo comestible al-- cual en el estado de Morelos también llaman cazahuate.

METODOLOGIA

Este trabajo consta de un ensayo biológico con glucósidos kauranóicos y un estudio químico de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanólico de la semilla Ipomoea murucoides.

Las semillas de Ipomoea murucoides se colectaron en Malinalco, Estado de México.

El material de cristalería empleado se lavó con etanol al 5% y agua destilada y se esterilizó con calor seco en estufa a 120°C por 15 minutos.

ENSAYO BIOLÓGICO.

En estudios anteriores se determinó que el tiempo óptimo de imbibición que facilita la manipulación de la semilla es de 14 hrs. a 18°C (23).

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y se enjuagaron con agua corriente para eliminarlo. Después se escarificaron e imbibieron con 20 ml. de agua corriente, lotes de 25 semillas.

Se separaron embriones de endospermos, asegurándose de que no quedaran restos de embrión en el endospermo.

Se colocaron 0.5 g. de endospermo y embrión (por separado) en cajas de Petri sobre papel filtro y 1.5 ml de solución de las sustancias a probar: glucósidos (turbicorina y corimbosina en mezcla 3:1)

ácido giberélico (testigo) y
agua (testigo)

Se probaron 5 soluciones a concentraciones de 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} .

Para cada substancia, a cada una de las concentraciones, se empleo una caja de Petri (por triplicado) en los tiempos probados (24, 48 y 72 horas).

Las cajas de Petri con embriones y endospermos se incubaron a 30°C en estufa de temperatura constante. Al término del tiempo de incubación de cada ensayo se homogeneizaron en un mortero y el macerado obtenido se colocó en tubos de centrífuga. Se centrifugó a 5 000 rpm durante 15 min., de cantandose el sobrenadante.

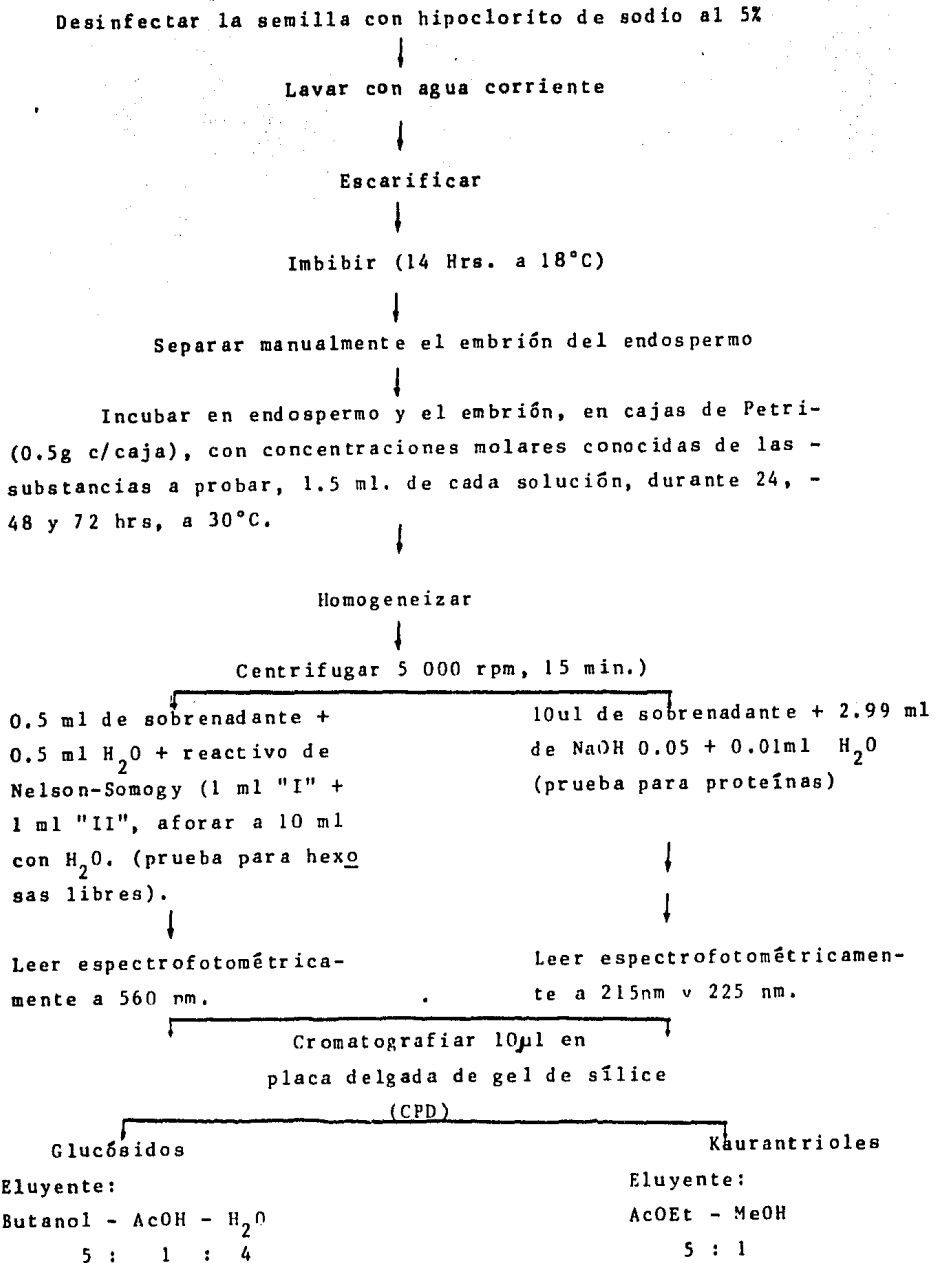
Se utilizaron 0.5 ml. de sobrenadante de cada tubo para realizar la prueba de Nelson-Somogyi para la determinación de azúcares reductores libres (ver anexos). Se midió la absorbancia con espectrofotómetro (Coleman mod. 219) a 650 nm

Con 10 microlitros de sobrenadante se practicó la prueba para determinar proteínas, tanto en embrión como en endospermo (ver anexos). Se midió la absorbancia a 215 nm y 225 nm.

Se cromatografiaron en placa fina 10 microlitros del sobrenadante de los diferentes ensayos para seguir la hidrólisis de los glucósidos. Los patrones fueron los glucósidos turbicorina y corimbosina y el corimbol (aglucona).

Se hizo una curva de calibración con soluciones de glucosa a concentraciones conocidas (1,2,3,4 y $5 \times 10^{-4}\text{M}$), para

DIAGRAMA DEL METODO PARA EL ENSAYO BIOLOGICO



poder calcular la concentración molar de las hexosas, correspondiente a las absorbancias obtenidas en los experimentos -- (Fig., No. 5 y Tabla No. 1).

ANALISIS QUIMICO.

Para el análisis químico las semillas (20g) se secaron a temperatura ambiente sobre papel y posteriormente se molieron tres veces en un molino de manivela.

Utilizando el método de Soxhlet se realizó la extracción de 20 g (500 ml /3 veces/8 hrs.) de semilla molida de -- Ipomoea murucoides, empleando como disolventes: hexano, acetato de etilo y metanol.

Por destilación a presión reducida se eliminó el disolvente, obteniéndose los extractos secos. El rendimiento de la extracción se reporta en la tabla No. 11.

Con el fin de determinar el número de componentes de los extractos, se analizaron éstos por cromatografía en placa delgada de gel de sílice Merck G-60, empleándose como eluyentes, para el extracto de acetato de etilo: cloroformo-metanol-9:1 y para el extracto metanólico: butanol-ácido acético-agua, 5 : 1 : 4 (Fig. No. 13).

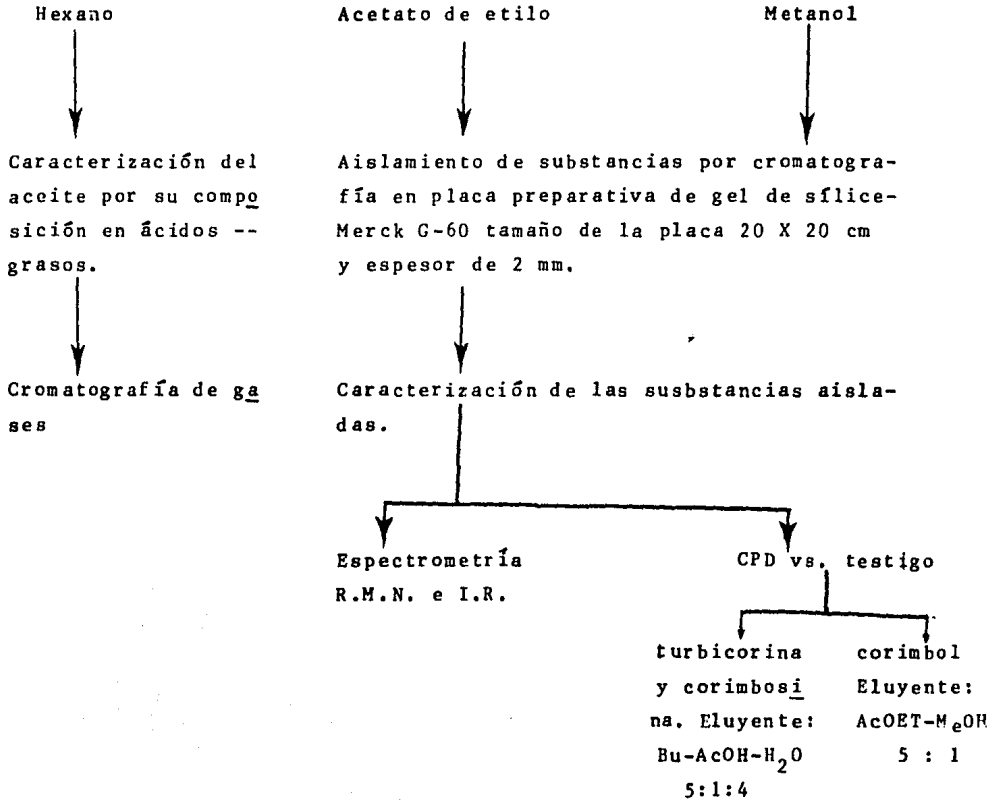
SEPARACION DE SUBSTANCIAS

Extracto hexánico.- El aceite que lo constituye (2.56 g) se transesterificó con potasa metanólica para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (1.54 g) (24) y éstos se analizaron por cromatografía de gases (Fig. 12; tabla No. 12).

Extracto de Acetato de Etilo.- En placa delgada se -

DIAGRAMA EXPERIMENTAL DEL ANALISIS QUIMICO

Extracción selectiva de la semilla molida (20 g).



obtuvieron seis manchas, que se separaron por cromatografía en placa preparativa. Se aplicaron 0.3510 g en cuatro placas de gel de sílice, corriéndose con el mismo sistema de disolventes que se empleó para la placa delgada. Los productos se extrajeron: con cloroformo las tres bandas menos polares (A, B y C) y con metanol caliente las tres bandas más polares (D, E y F) -- (Fig. No. 14). El rendimiento de las fracciones se encuentra en la tabla No. 13. Se determinó su espectro de resonancia -- magnética de protones (Fig. No. 15).

Extracto Metanólico. -- El extracto (0.3 g) se cromatografió en placa preparativa para separar los componentes observados en la placa fina. Se obtuvieron tres bandas (Fig. No. 16), las cuales se separaron y extrajeron con metanol; se eliminó el disolvente y se pesó el producto (tabla No. 15). Las fracciones obtenidas se analizaron en placa fina corridas contra testigos. Las fracciones A y B se eluyeron con AcOET -- MeOH 5:1 y la fracción C con Butanol-Acido Acético-Agua 5: 1:4.

Caracterización de Grupos Químicos:

Para determinar la presencia de glucósidos, se realizó la prueba de Mölich (anexo No. V), la cual resultó ligeramente positiva.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico aplicado fué el de varianza -- con tres criterios. Se efectuaron cuatro análisis separados -- y cada uno se realizó mediante un modelo estadístico de tres -- criterios de clasificación con interacción.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos, recopilados en forma de tablas y gráficas para una mayor facilidad en su análisis y comprensión.

El orden general de presentación de los resultados es:

Resultados del ensayo biológico.

Resultados del análisis químico.

Resultados del análisis estadístico.

La nomenclatura empleada en las gráficas se expone a continuación:

NOMENCLATURA

AGUA DESTILADA H_2O

GLUCOSIDOS G'S

CORIMBOL K

ACIDO GIBERELICO AG_3

RESULTADOS DEL ENSAYO BIOLÓGICO

TABLA No. 1

DATOS DE LA CURVA PATRON DE GLUCOSA

CONCENTRACION (M x 10 ⁻³)	D.O. (650 nm)
0.1	0.219
0.2	0.358
0.3	0.608
0.4	0.837
0.5	0.887

FIG. NO. 5

Curva Patrón de Hexosas

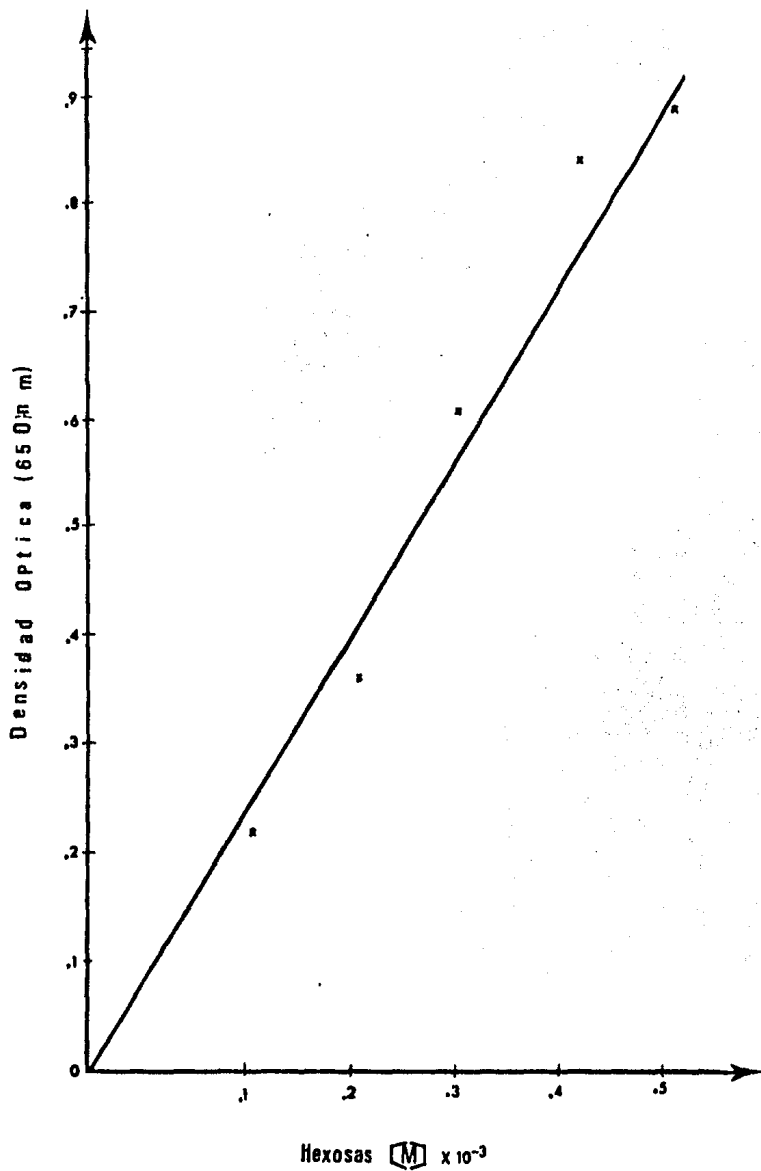


TABLA No. 2

CONCENTRACIONES MOLARES DE HEXOSAS EN ENDOSPERMO, CON AGUA

SUBSTANCIA	TIEMPO	CONCENTRACION MOLAR
Agua	00 hr	2.73 x 10 ⁻⁵
Agua	24 hr.	3.60 x 10 ⁻⁵
Agua	48 hr.	8.45 x 10 ⁻⁵
Agua	72 hr.	9.50 x 10 ⁻⁵

TABLA No. 3

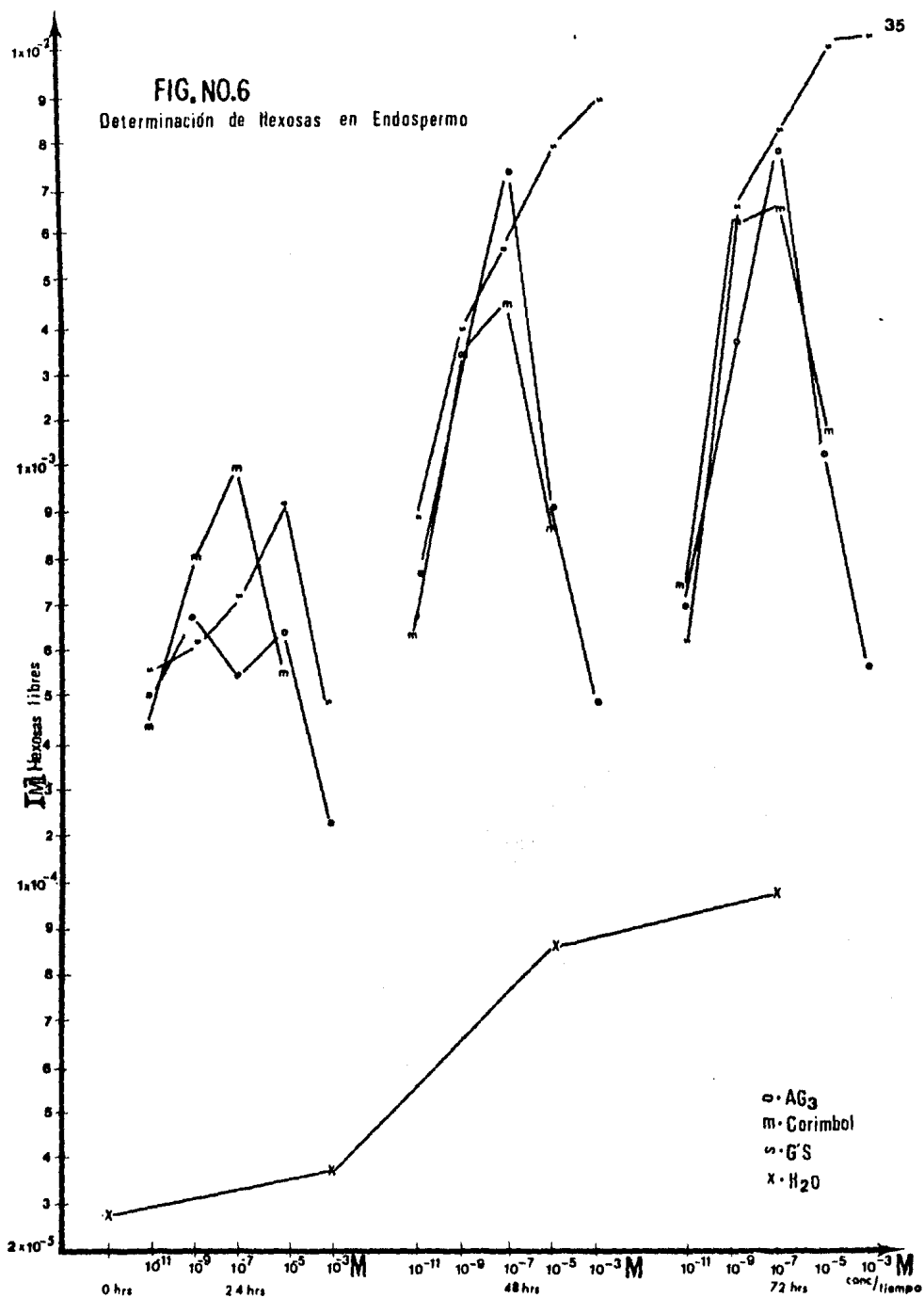
CONCENTRACION DE PROTEINAS EN ENDOSPERMO CON AGUA

SUBSTANCIA	TIEMPO	CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Agua	00 hr.	1.44
Agua	24 hr.	4.18
Agua	48 hr.	7.92
Agua	72 hr.	8.64

TABLA No. 4
 CONCENTRACION MOLAR DE HEXOSAS EN ENDOSPERMO

SUBSTANCIAS	CONCENTRACIONES MOLARES DE LAS SOLUCIONES APLICADAS				
	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
a 24 hr.					
AG ₃	4.75×10^{-4}	6.62×10^{-4}	5.3×10^{-4}	6.32×10^{-4}	2.16×10^{-4}
G'S	5.40×10^{-4}	6.09×10^{-4}	7.01×10^{-4}	9.10×10^{-4}	4.79×10^{-4}
K	4.21×10^{-4}	7.88×10^{-4}	9.85×10^{-4}	5.45×10^{-4}	
a 48 hr.					
AG ₃	7.5×10^{-4}	4.00×10^{-3}	7.28×10^{-3}	9.00×10^{-4}	4.72×10^{-4}
G'S	8.90×10^{-4}	3.98×10^{-3}	5.45×10^{-3}	7.85×10^{-3}	8.82×10^{-3}
K	6.60×10^{-4}	3.28×10^{-3}	4.42×10^{-3}	8.52×10^{-4}	
a 72 hr.					
AG ₃	6.75×10^{-4}	3.70×10^{-3}	7.68×10^{-3}	11.00×10^{-4}	5.49×10^{-4}
G'S	6.10×10^{-4}	6.50×10^{-3}	8.21×10^{-3}	10.04×10^{-3}	11.47×10^{-3}
K	7.00×10^{-4}	6.01×10^{-3}	6.40×10^{-3}	1.50×10^{-3}	

FIG. NO.6
Determinación de Hexosas en Endospermo



○ AG₃
 △ Corimbol
 □ G'S
 × H₂O

TABLA No. 5
 CONCENTRACION DE PROTEINAS EN ENDOSPERMO ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

SUBSTANCIAS	CONCENTRACIONES MOLARES DE LAS SOLUCIONES APLICADAS				
	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
a 24 hr.					
AG ₃	28.51	45.50	97.78	21.02	3.02
G'S	36.00	37.01	40.32	42.91	8.35
K	17.28	21.60	22.90	18.43	
a 48 hr.					
AG ₃	131.90	161.14	230.98	119.81	20.45
G'S	93.60	143.71	144.29	129.02	124.05
K	58.32	177.70	205.78	94.03	
a 72 hr.					
AG ₃	142.42	198.43	260.06	203.62	15.26
G'S	160.13	201.31	202.03	189.36	28.66
K	140.54	229.97	234.43	94.75	

FIG. NO.7 Determinación de Proteínas en Endospermo

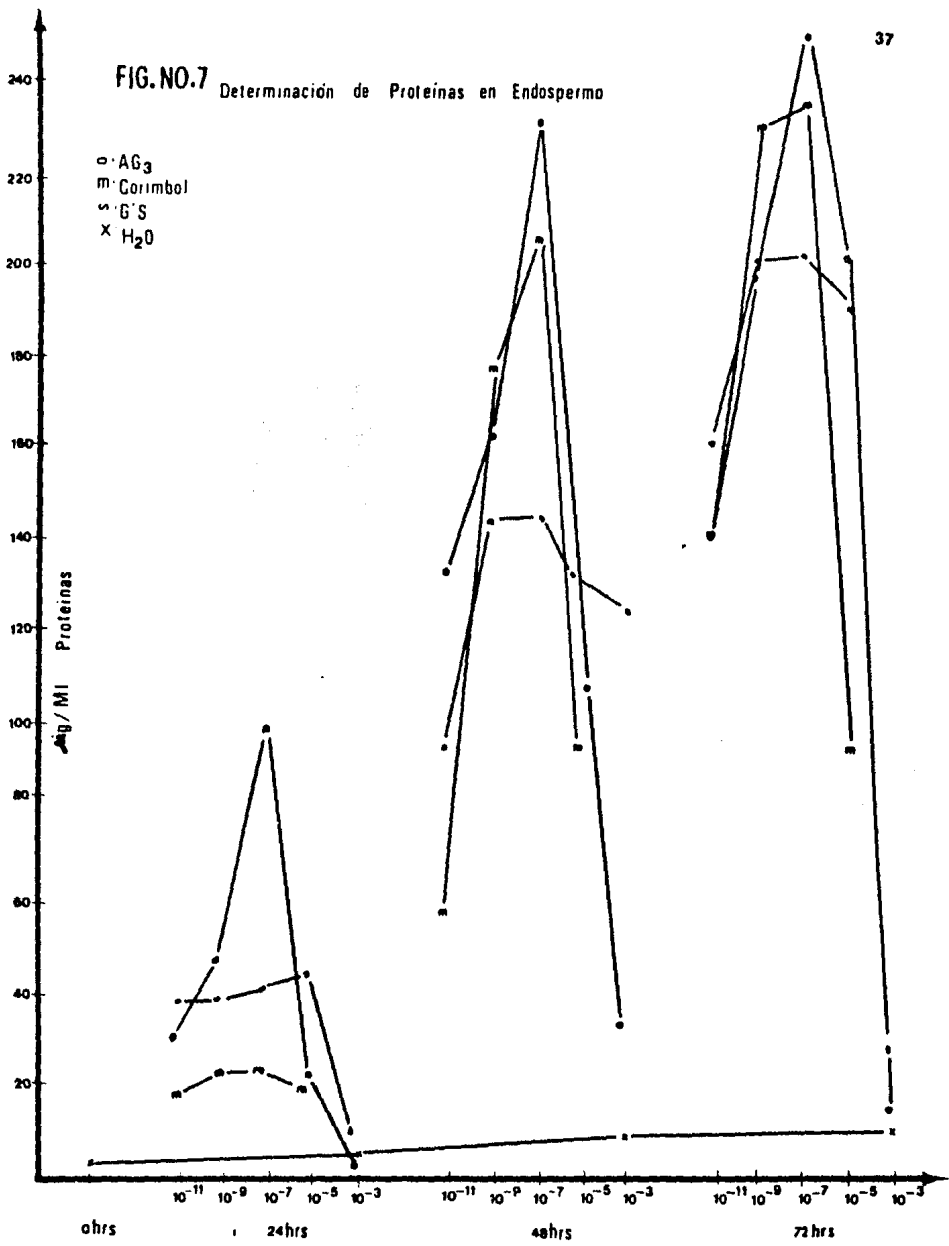


TABLA No. 6
CONCENTRACION MOLAR DE HEXOSAS EN EMBRION, CON AGUA

TIEMPO	SUBSTANCIA	CONCENTRACION MOLAR
00 hr.	Agua	2.30×10^{-4}
24 hr.	Agua	3.45×10^{-4}
48 hr.	Agua	4.28×10^{-4}
72 hr.	Agua	4.02×10^{-4}

TABLA No. 7
CONCENTRACION DE PROTEINAS EN EMBRION, CON AGUA

TIEMPO	SUBSTANCIA	CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)
00 hr.	Agua	28.51
24 hr.	Agua	45.07
48 hr.	Agua	51.26
72 hr.	Agua	52.41

TABLA No. 6
CONCENTRACION MOLAR DE HEXOSAS EN EMBRION, CON AGUA

TIEMPO	SUBSTANCIA	CONCENTRACION MOLAR
00 hr.	Agua	2.30×10^{-4}
24 hr.	Agua	3.45×10^{-4}
48 hr.	Agua	4.28×10^{-4}
72 hr.	Agua	4.02×10^{-4}

TABLA No. 7
CONCENTRACION DE PROTEINAS EN EMBRION, CON AGUA

TIEMPO	SUBSTANCIA	CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
00 hr.	Agua	28.51
24 hr.	Agua	45.07
48 hr.	Agua	51.26
72 hr.	Agua	52.41

TABLA No. 9
CONCENTRACION MOLAR DE HEXOSAS EN EMBRION

SUBSTANCIAS	CONCENTRACIONES MOLARES DE LAS SOLUCIONES APLICADAS.				
	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
a 24 hr.					
AG ₃	4.36×10^{-4}	4.68×10^{-4}	4.79×10^{-4}	4.95×10^{-4}	5.04×10^{-4}
G'S	4.28×10^{-4}	4.31×10^{-4}	4.50×10^{-4}	4.79×10^{-4}	5.52×10^{-4}
a 48 hr.					
AG ₃	5.75×10^{-4}	5.81×10^{-4}	5.84×10^{-4}	6.01×10^{-4}	6.07×10^{-4}
G'S	4.79×10^{-4}	4.99×10^{-4}	5.53×10^{-4}	5.79×10^{-4}	7.30×10^{-4}
a 72 hr.					
AG ₃	5.19×10^{-4}	5.95×10^{-4}	6.02×10^{-4}	6.09×10^{-4}	6.30×10^{-4}
G'S	5.00×10^{-4}	5.51×10^{-4}	6.15×10^{-4}	6.80×10^{-4}	11.00×10^{-4}

FIG. NO. 8 Determinación de Hexosas en Embrión

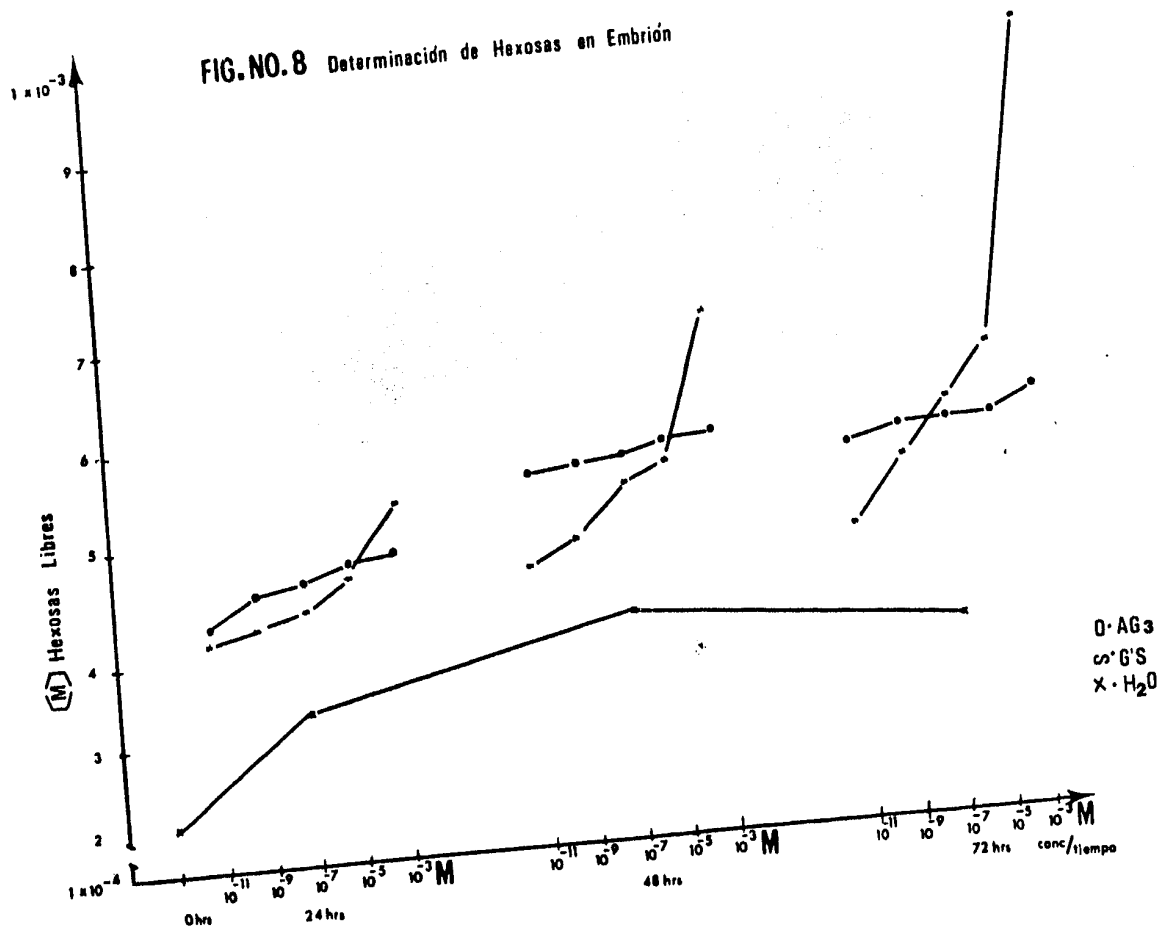


TABLA No. 9
CONCENTRACION DE PROTEINAS EN EMBRION ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

SUBSTANCIAS	CONDICIONES MOLARES DE LAS SOLUCIONES APLICADAS				
	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
a 24 hr					
AG ₃	43.49	44.21	44.78	45.36	47.52
G'S	66.38	68.40	70.13	71.71	76.32
a 48 hr					
AG ₃	44.35	44.93	45.79	46.84	49.68
G'S	72.29	74.16	76.03	86.54	89.28
a 72 hr					
AG ₃	48.53	49.25	50.54	51.26	54.86
G'S	73.73	75.02	77.90	89.14	128.30

FIG. NO. 9 Determinación de Proteínas en Embrión.

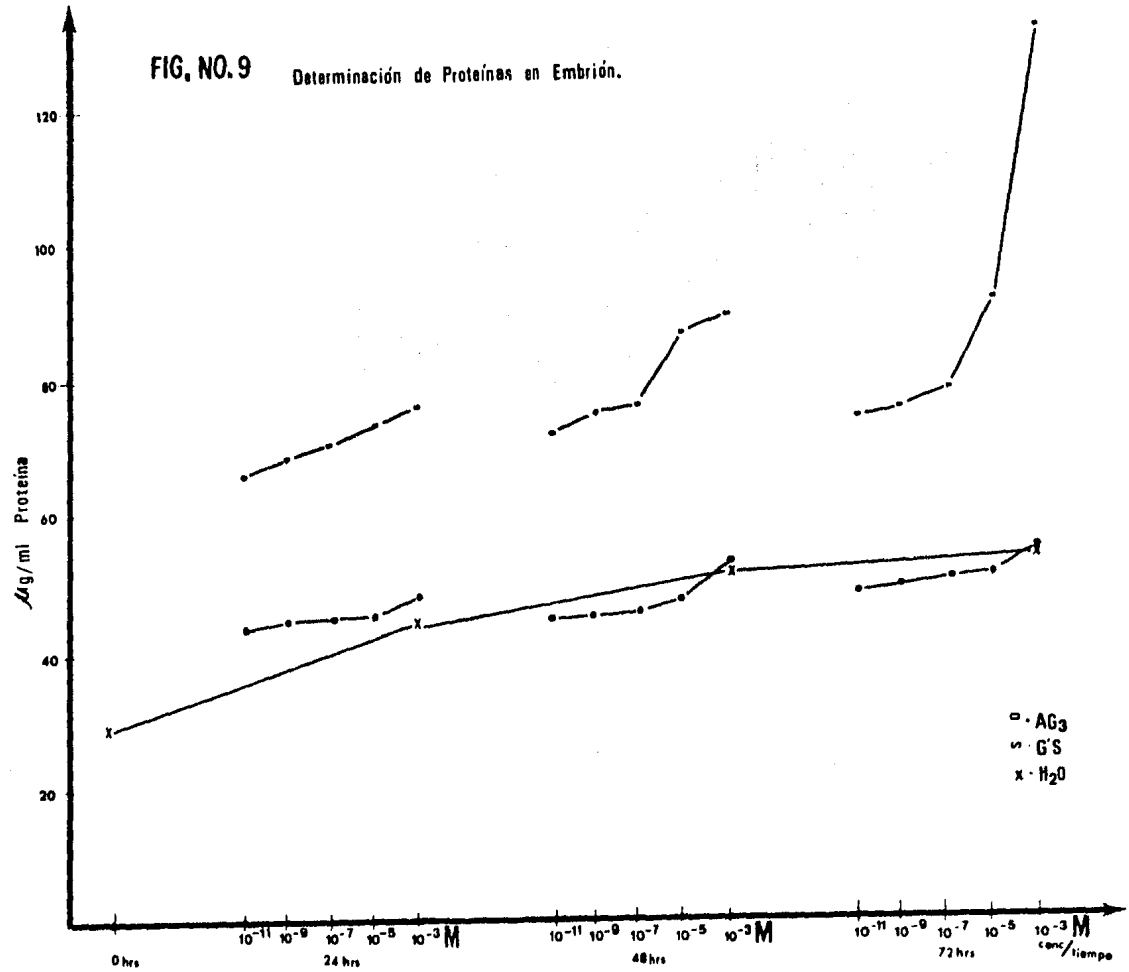
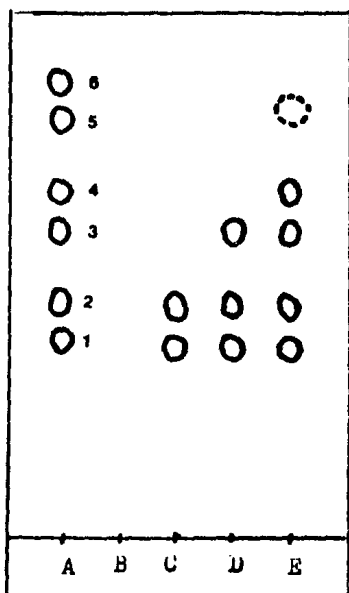
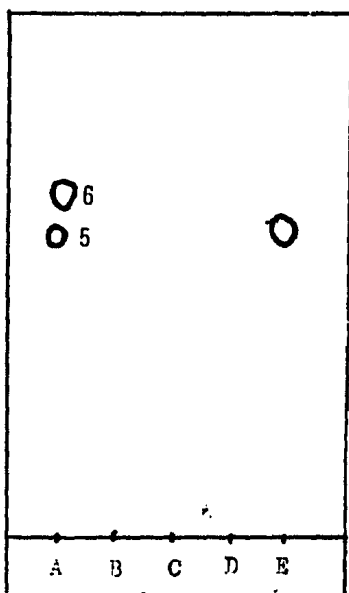


TABLA No. 10
 PORCENTAJE RELATIVO DE ACTIVIDAD DE LAS SUBSTANCIAS
 PRÓBADAS EN ENDOSPERMO

SUBSTANCIA	HEXOSAS (M)		PROTEINAS ($\mu\text{g/ml}$)	
	CONCENTRACION MAXIMA	ACTIVIDAD	CONCENTRACION MAXIMA	ACTIVIDAD
	A 72 hr y 10^{-7}M	%	A 72hrs y 10^{-7}M	%
AG ₃	76.80×10^{-4}	100	260.06	100
G'S	8.21×10^{-3}	106.90	202.03	77.68
K	6.40×10^{-3}	83.33	234.43	90.14



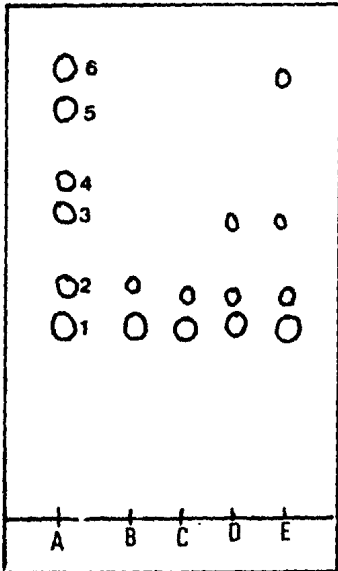
Metanol:ác. acético:agua
5 : 1 : 4
Fig. No. 10



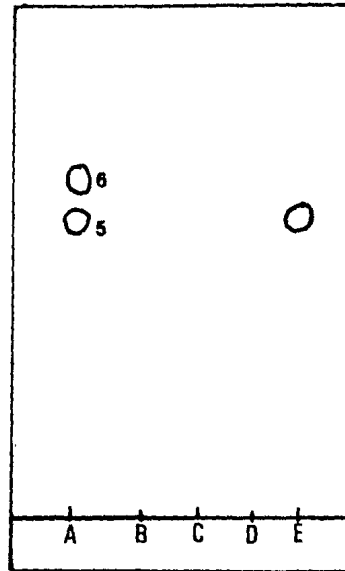
Acetato de etilo:Metanol
5 : 1

Determinación de la hidrólisis de glucósidos de Turbina corymbosa por endospermo de Ipomoea murucoides.

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| 1. Turbicorina | A) Patrón |
| 2. Corimbosina | B) Tiempo cero endospermo |
| 3. Turbicoritina | C) 24 Hrs. de imbibición |
| 4. Corimbositina | D) 48 Hrs. de imbibición |
| 5. Corimbol | E) 72 Hrs. de imbibición |
| 6. 16, 17, 19- Kaurantriol | |



butanol :Ac.Acético:Agua
5 : 1 : 4



Acetato de Etilo:Metanol
5 : 1

Fig. No. 11

Determinación de la hidrólisis de glucosidos de Turbina corymbosa por embrión de Ipomoea murucoides.

1. Turbicorina
2. Corimbosina
3. Turbicoritina
4. Corimboisina
5. Corimbol
6. 16, 17, 19- Kaurantriol

- A) Patrón
- B) Tiempo cero embrión
- C) 24 Hrs. de imbibición
- D) 48 Hrs. de imbibición
- E) 72 Hrs. de imbibición

RESULTADOS DEL ANALISIS QUIMICO

TABLA No. 11

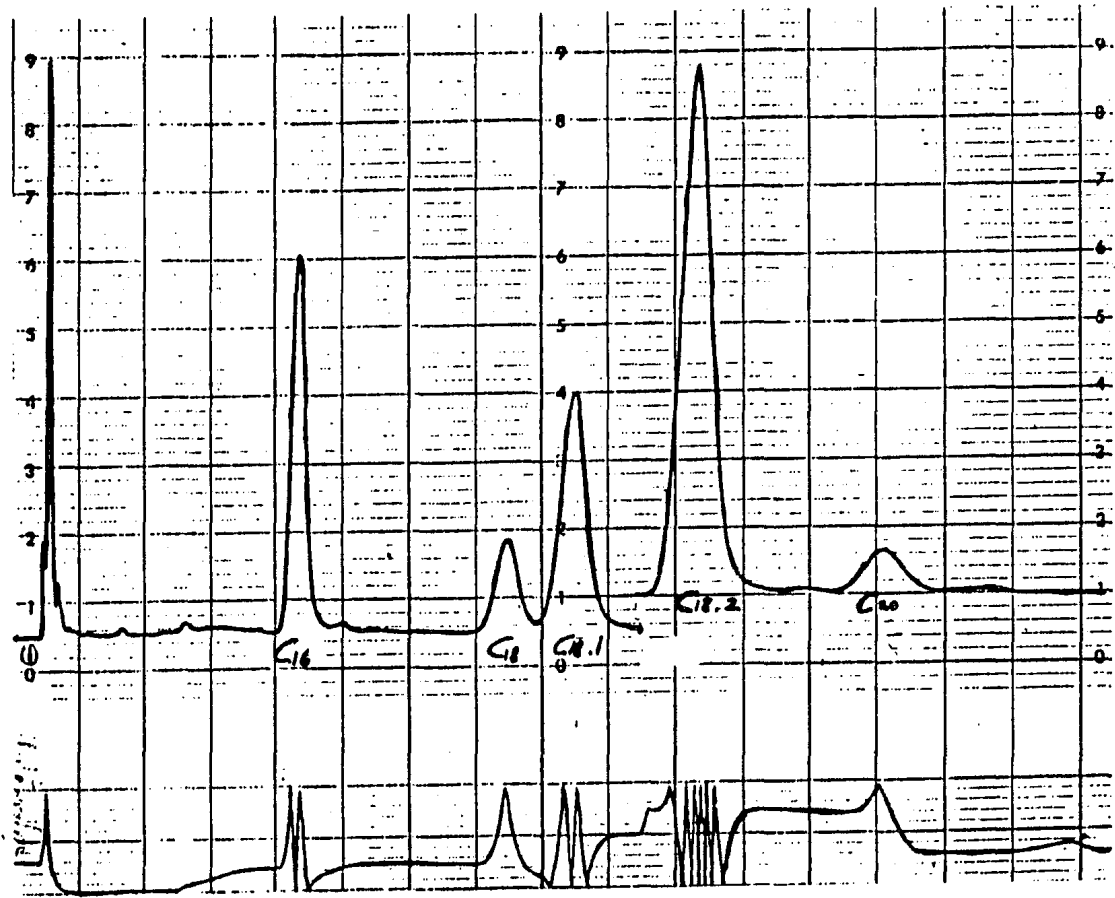
PESO DE LOS EXTRACTOS Y RENDIMIENTOS CALCULADOS
SOBRE SEMILLA SECA (20g)

EXTRACTO	PESO	RENDIMIENTO (%)
Hexano	2.56	12.80
Acetato de etilo	0.39	1.35
Metanólico	2.04	10.20

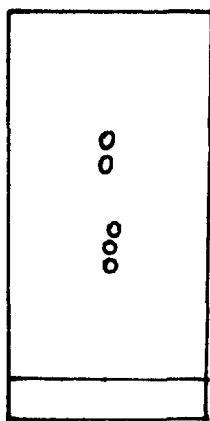
TABLA No. 12

COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL ACEITE DE SEMILLAS DE
Ipomoea murucoides (Malinalco, Estado de México)

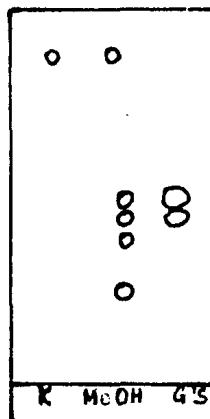
ACIDOS GRASOS	PORCENTAJE
Acido Palmítico (C _{16:0})	23.66
Acido Esteárico (C _{18:0})	10.24
Acido Oleico (C _{18:1})	27.50
Acido Linoleico (C _{18:2})	35.53
Acido Araquídico (C _{20:0})	2.97



CROMATOGRAFIA DE GASES DEL EXTRACTO HEXANICO



Extracto: acetato de etilo
 Eluyente: Cloroformo - Metanol
 9 : 1

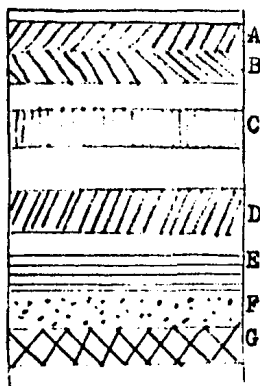


metanólico
 Butanol-Ac. Acético-Agua
 5 : 1 : 4

Fig. No. 13

Cromatografía en placa fina de los extractos de acetato de etilo y metanólico.

SEPARACION DE SUBSTANCIAS EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO



ELUYENTE:
 Cloroformo - Metanol
 9 : 1

Fig. No 14

Cromatografía en placa preparativa del extracto de acetato de etilo.

TABLA No. 13

PESO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA PLACA PREPARATIVA
DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

FRACCION	PESO (g)
A	0.0474
B	0.0381
C	0.0258
D	0.0192
E	0.0195
F	0.0382
G	0.0474

TABLA No. 14

INTERPRETACION DEL ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA
NUCLEAR DE LA FRACCION "A", DEL EXTRACTO DE ACETATO
DE ETILO

PATRONES	SEÑAL (ppm)
CH_3-	0.85
$-(\text{CH}_2)_n-$	1.20
$-\text{CH}_2-$ $\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} - \text{OR}$	2.25
$-\text{CH}_2-$ $\text{O} - \text{C}$	4.15

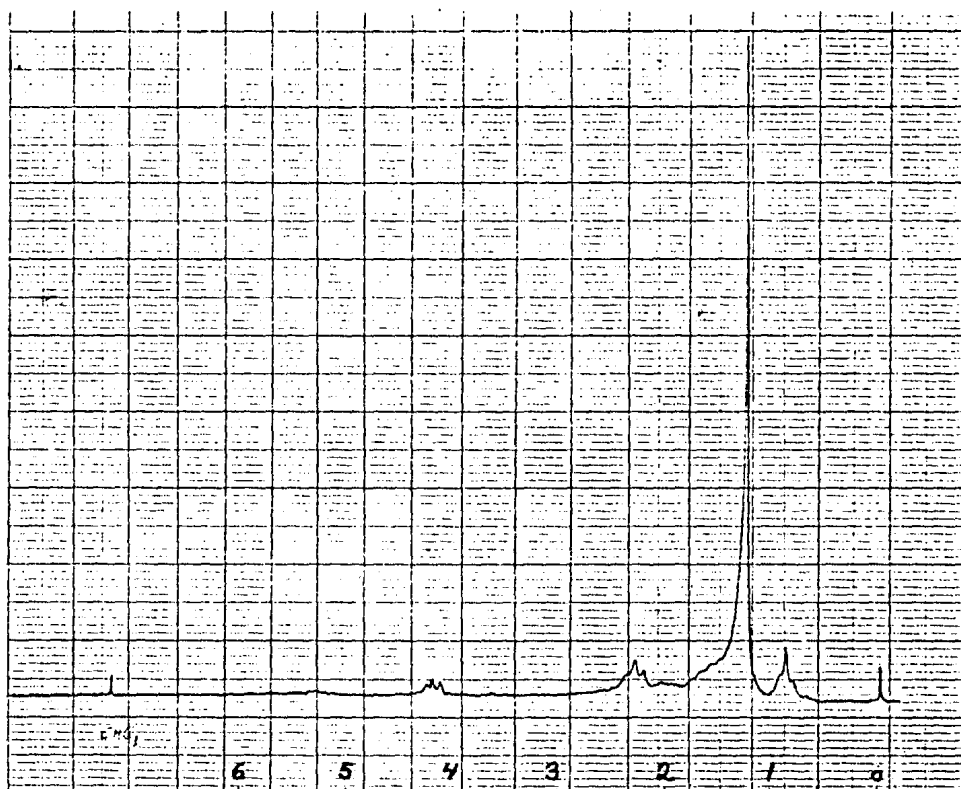


Fig. No 15

Espectro de resonancia magnética nuclear de la fracción "A"

TABLA No. 15
 INTERPRETACION DEL ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA
 NUCLEAR DE LA FRACCION "C" DEL EXTRACTO DE ACETATO
 DE ETILO

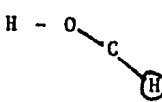
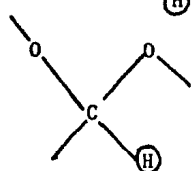
PROTONES	SEÑAL (ppm)
CH_3^-	0.75 (doblete)
$\text{CH}_3^- (\text{CH}_2)_n^-$	0.85
$-(\text{CH}_2)_n^-$	1.03
$\text{CH}_3^- \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-$	2.00
$-\text{CH}_2^- \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{R}$	2.25 (triplete)
$\text{O}-\text{CH}_2^-$	3.2 (multiplete)
	3.5 - 4.0 (varias)
	4.2 y 5.3

TABLA No. 16
 INTERPRETACION DEL ESPECTRO EN EL INFRA ROJO
 DE LA FRACCION "C"

PROTONES	SEÑAL (cm^{-1})
OH -	3380
$>\text{C}=\text{O}-$	1738

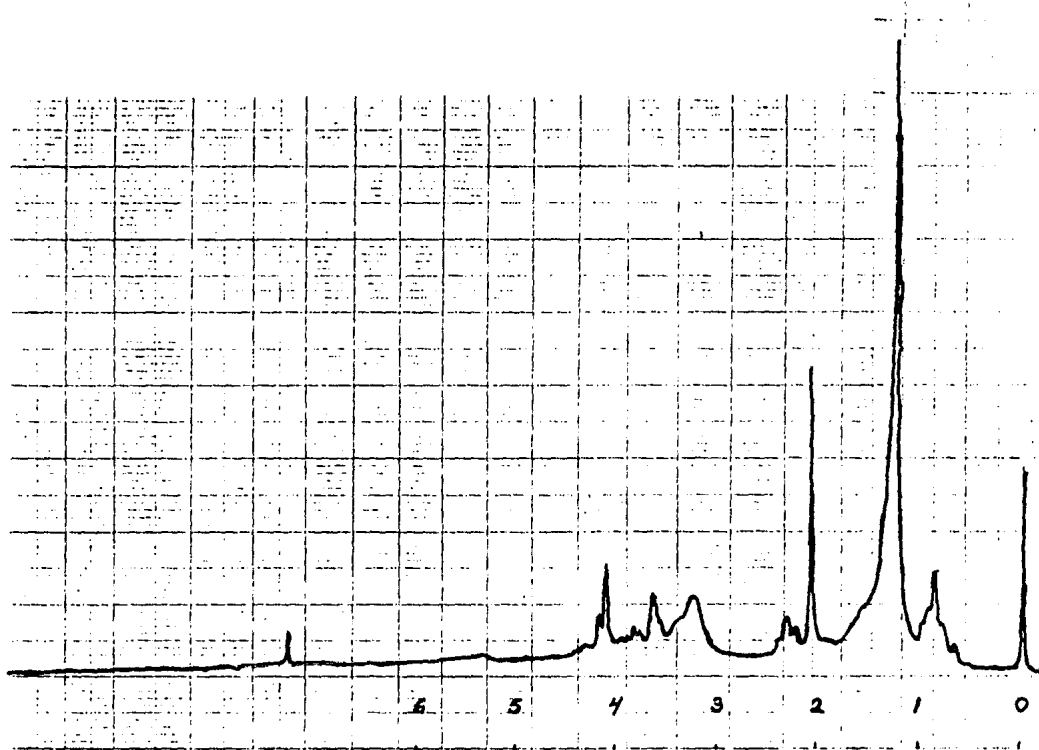
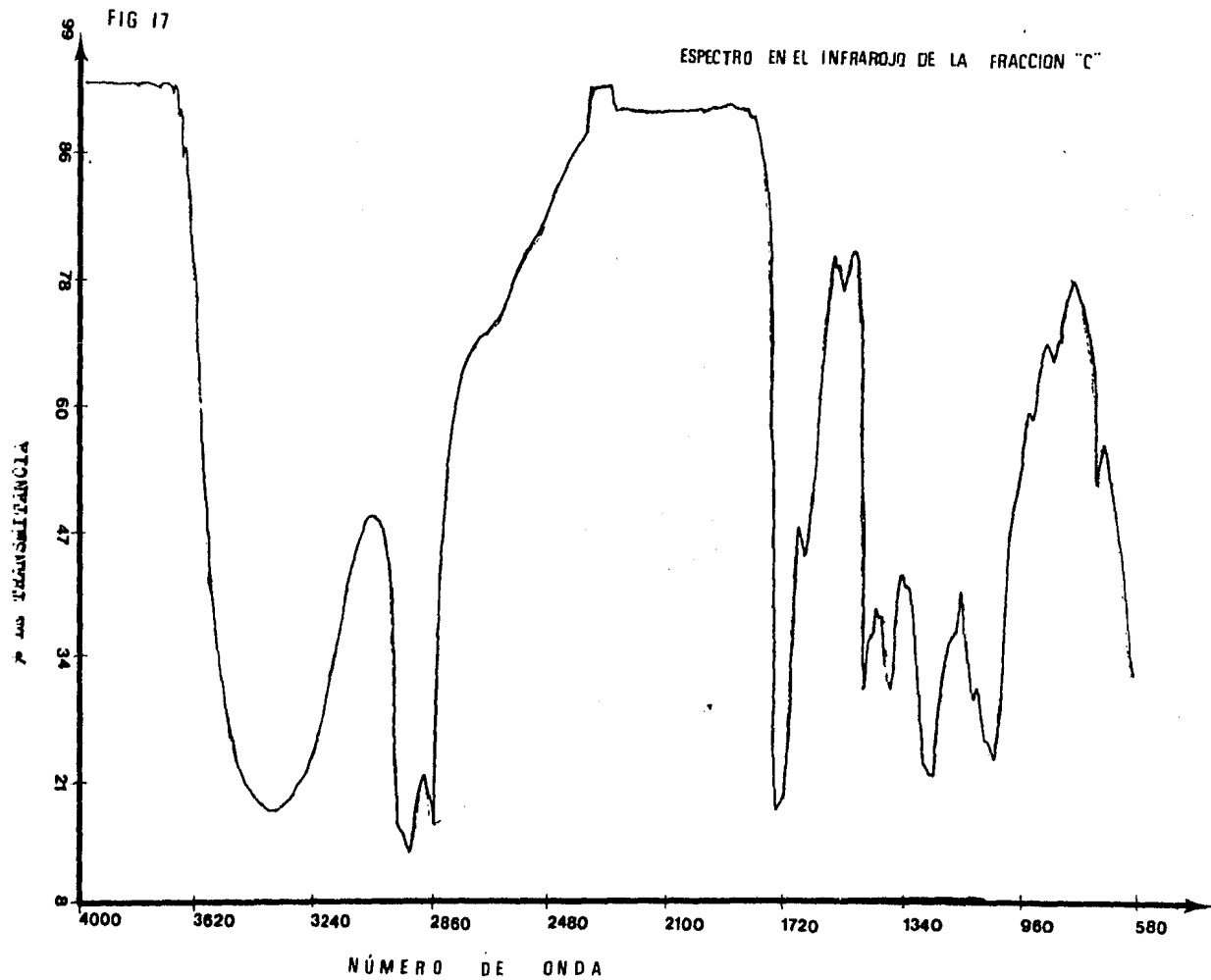
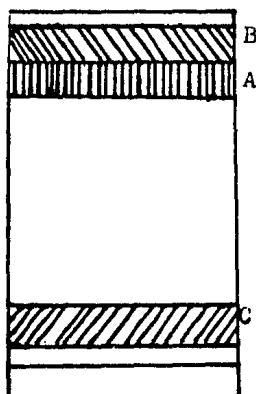


Fig. 16. Espectro de resonancia magnética nuclear de la fracción "C"



EXTRACTO METANOLICO



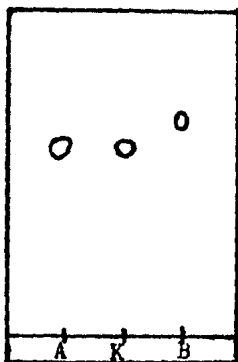
ELUYENTE:
Cloroformo - Metanol
9 : 1

Fig. No. 18

Cromatografía en Placa Preparativa del
Extracto Metanólico.

TABLA No. 17
PESOS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA PLACA PREPARATIVA
DEL EXTRACTO METANOLICO

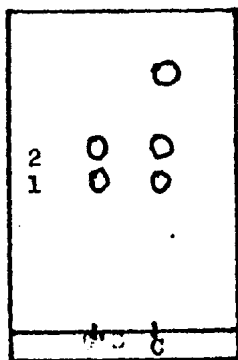
FRACCION	PESO (g)
A	0.0390
B	0.0968
C	0.1032



K - corimbol

Fig. No. 19

Placa Fina de las Fracciones "A" y "B"
del Extracto Metanólico.



ELUYENTE
Butanol-Ac. Acético-Agua
5 : 1 : 4

Fig. No. 20

1. Turbicornina
2. Corimbosina

Placa Final de la Fracción "C"
del Extracto Metanólico.

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO

Como en el método estadístico aplicado hubo interacción, de los criterios (tiempo, concentración y substancia) se fijó el criterio de menor interés, que fue tiempo y se estudiaron los modelos resultantes con dos criterios de clasificación con interacción. En total se analizaron 76 modelos. Los resultados obtenidos tuvieron un nivel de significancia estadístico del 0.0001 y 0.0005.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

ENSAYO BIOLOGICO

El ensayo biológico mostró que con los glucósidos kauranóicos aislados de semilla de Turbina corymbosa, aplicados -- exogenamente a endospermo y embrión de *Ipomoea murucoides*, se logra obtener una actividad similar a la del ácido giberélico -- para inducir la síntesis de hidrolasas que degraden el material de reserva y de enzimas que inicien la síntesis protéica.

La degradación del polisacárido de reserva se determinó midiendo azúcares reductores después de incubar el material durante 24, 48 y 72 Hrs.

Los resultados con endospermo, que se pueden ver en la gráfica de la figura No. 6, muestran que la mayor actividad se logró a las 72 horas y a una concentración de 10^{-7} con todas -- las substancias probadas y que fueron: AG_3 como testigo; glucósidos de Turbina corymbosa, turbicorina y corimbosina, en una muestra en la que se encuentran en proporción de 3:1, y corim--bol, la aglucona de la turbicorina. Tomando como 100% de actividad la del testigo, o sea la del AG_3 , con la mezcla de glucósidos se obtuvo una actividad ligeramente mayor (106.90%) y con el corimbol, menor (83.33%).

En el caso de los glucósidos, las determinaciones efectuadas a concentraciones de 10^{-5} y 10^{-3} , a 48 y 72 horas, se -- descartan debido a que a este nivel los azúcares provenientes -- de la hidrólisis de los glucósidos se encuentra ya en cantida--des suficientes como para alterar los resultados. Esto se dedu

ce del comportamiento que sigue el corimbol, la aglucona, en la que ya no hay azúcar. Con esta substancia, al igual que con el AG_3 , se alcanza un máximo y después decae la actividad, cosa -- que no ocurre con los glucósidos debido a la presencia adicional de azúcares provenientes de su hidrólisis en cantidad ya -- detectable por la medición.

En el perfil correspondiente a 24 horas no hay interferencia de los azúcares provenientes de la hidrólisis de los glucósidos y es con este perfil con el que mejor se puede dar apoyo a la hipótesis planteada en los objetivos. Los resultados -- concuerdan con lo esperado, hay actividad giberelínica con las -- dos substancias ensayadas. El corimbol presenta una mayor actividad que los glucósidos porque, siendo la aglucona, no requiere hidrólisis previa de la parte glucídica para que se inicie -- la transformación a giberelinas. Si el corimbol se transforma -- se en ácido giberélico, su actividad sería menor que la de éste a las 24 hrs., pero siendo mucho mayor, se postula la posibilidad de que la transformación se haga a una giberelina diferente, propia de la semilla y con una acción más efectiva sobre su sistema enzimático.

Respecto a la síntesis de proteínas en endospermo la -- actividad se midió por el método espectrofotométrico que mide -- la absorbancia del enlace peptídico (ver anexo No. IV). En la -- gráfica correspondiente (Fig. No. 7) se puede ver que el perfil a las 24 horas es diferente al de las hexosas (Fig. No. 6). En el perfil de proteínas el ácido giberélico el que tiene mucha -- mayor actividad. Los perfiles del AG_3 y del corimbol a las 48-- y 72 horas guardan similitud con los de las hexosas, los de los glucósidos son diferentes debido a que aquí no hay interferen--cia de los azúcares provenientes de la hidrólisis de éstos, en -- la determinación.

En este caso la mayor actividad se presentó también a

las 72 horas, igualmente a la concentración de 10^{-7} y con el corimbol se obtuvo una mayor actividad que con los glucósidos a las 48 y 72 horas (Tabla No. 5).

En las determinaciones con embrión los perfiles son diferentes a los obtenidos con endospermo, puesto que la actividad en estas dos partes de la semilla también es diferente.

En los perfiles de hexosas de embrión el AG_3 mostró mayor actividad que los glucósidos (excepto a la concentración de 10^{-3}) a las 24 y 48 horas. A las 72 horas la actividad con los glucósidos es mayor a las concentraciones de 10^{-5} y 10^{-3} . Como ya se indicó en la determinación con endospermo estas concentraciones se descartan por estar alteradas las lecturas con la presencia de los azúcares provenientes de la hidrólisis de los glucósidos.

En los perfiles de síntesis protéicas se observa mayor actividad con los glucósidos, siendo la influencia del ácido giberélico sobre la síntesis prácticamente nula.

Al igual que en el endospermo, la mayor actividad se presentó, tanto para hexosas como para proteínas, a las 72 ho--ras, aumentando ésta con la concentración de las soluciones empleadas.

Al mismo tiempo que se efectuaron las determinaciones de azúcares reductores y proteínas, se hizo un análisis en placa delgada con el sobrenadante del macerado de los diferentes ensayos para observar la hidrólisis de los glucósidos.

Los glucósidos kauranólicos aislados de Turbina corym--bosa son dos isómeros denominados turbicorina y corimbosina, cuya parte glucídica es idéntica y está constituida por celobiosa (Fig. No. 21).

Estos glucósidos pueden hidrolizarse parcial o totalmente según la enzima que se utilice. Con -glucosidasa se fragmenta una de las unidades de glucosa, dando la turbicoritina y la corimbositina, y con celulasa se fragmenta todo el disacárido, obteniéndose las agluconas correspondientes, el 6, 16, 17--kaurantriol, denominado corimbol, y el 16, 17, 19-kaurantriol - (Fig. No. 21).

En el bioensayo con endospermo y embrión de semillas - de Ipomoea murucoides se pudieron detectar en placa delgada los dos diferentes productos de hidrólisis.

En endospermo al tiempo cero hay ausencia de glucósi-- dos, puesto que estos se localizan en el embrión. A las 24 horas los glucósidos ya se han difundido en el endospermo, a las 48 horas se presenta el producto de hidrólisis parcial y a las 72 horas se encuentran tanto los productos de hidrólisis parcial como total. En el embrión el perfil cromatográfico es - - igual, a excepción del tiempo cero puesto que desde el inicio - hay glucosidos, ya que endogenamente se localizan en esta parte de la semilla.

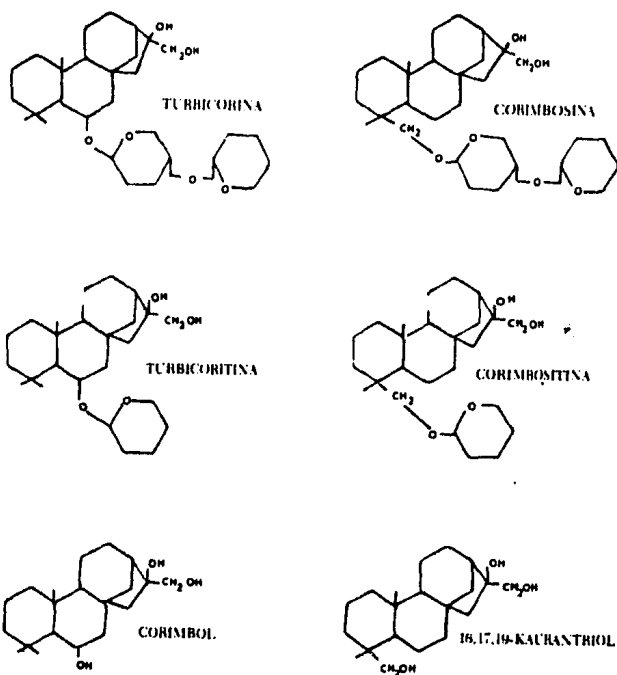


Fig. No. 21.

Glucósidos y sus Productos de Hidrólisis.

ANALISIS QUIMICO

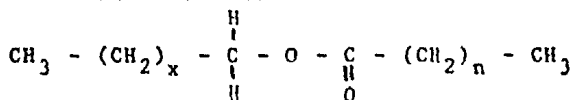
El análisis químico mostró que el extracto hexánico está constituido por un aceite, el cual se caracterizó por su composición en ácidos grasos. En la Tabla No. 12 se encuentra dicha composición y la proporción en que se hallan cada uno de los ácidos grasos principales que fueron: palmítico, esteárico, oleico y linoleico.

El extracto de acetato de etilo presentó una composición compleja, con varios componentes, como lo indicó la placa delgada que se corrió con este fin (Fig. No. 13).

Dada la pequeña cantidad de extracto obtenida (0.3510-g), la separación de los productos se intentó en placa preparativa, lograndose separar seis bandas correspondientes a otros productos.

El producto "A" es una cera, como se puede deducir de su espectro de R.M.N. En dicho espectro se observan señales de metilo (0.85 ppm) y de metilenos (1.20 ppm) que nos indican la existencia de una cadena hidrocarbonada larga. A 2.25 ppm se encuentran los protones vecinos al carbonilo del grupo ácido y a 4.15 ppm los protones vecinos al oxígeno del alcohol. Estos dos grupos son los que, esterificados, constituyen la cera, que es un producto de color ámbar.

El espectro de masas del producto no se pudo determinar debido a que la muestra no fue suficientemente volátil y no entró al aparato, por lo que no se pudo tener su peso molecular. El compuesto A, por lo tanto se formula como:



Los productos de "B" a "F" tienen espectros de RMN similares y de ellos sólo se analizó en detalle el compuesto "C", cuyo espectro dió mayor información. El producto "C" presenta espectros de I.R. y R.M.N. muy similares a los obtenidos para un producto aislado de raíz de Ipomoea tyrianthina y que resultó ser una resina glucosídica, cuya estructura esta actualmente en estudio. Estas resinas son características de miembros de la familia y están constituidas por un ácido graso hidroxilado-unido a uno o varios azúcares, como el ácido operculínico (26), aislado de Ipomoea operculata (Fig. No. 22).

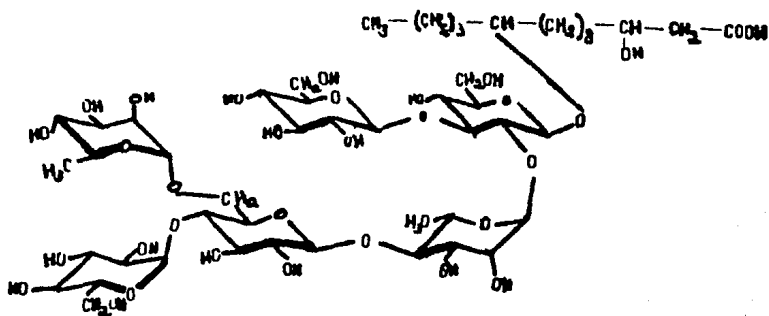


Fig. No. 22. Acido Operculínico.

En el espectro de I.R. de nuestro compuesto se observa, además de una banda ancha correspondiente a oxhidrilos (3380 cm^{-1}), la característica de carbonilo (1738 cm^{-1}), lo que da cuenta de la existencia del ácido.

El espectro de R.N.M. muestra una señal de protones de metilo en cadena larga a 0.85 ppm y una señal intensa de proto-

nes de metilenos a 1.03 ppm que corresponden a la cadena hidrocarbonada del ácido graso. La señal de 2.25 ppm, de protones - vecinos a carbonilo, confirma la existencia del grupo carboxilo, indicada ya en el espectro en el I.R.

Las señales que corresponden a la parte glucídica se encuentran a 3.2 ppm para los protones vecinos a -OH primario; - entre 3.5 y 4.0 ppm señales correspondientes a protones base de -OH secundario y a 4.2 y 5.3 ppm dos señales correspondientes a protones anoméricos.

Para proponer una estructura definida se requiere una mayor cantidad de producto que la que se obtuvo en este trabajo, para continuar la investigación, por lo que ahora solo se postula el compuesto como una probable resina glucosídica.

Debido a la alta polaridad del extracto metanólico, la separación de los componentes se efectuó igualmente por placa preparativa. Se obtuvieron tres fracciones, la "A" y la "B" -- con polaridad muy diferente a la de "C".

En vista de que ya se tenía una orientación por la placa delgada del extracto crudo que se corrió previamente contra testigo de extracto de Turbina corymbosa y en la cual se observaron manchas con R_{fs} iguales a los de la turbicorina, la corimbosina y el corimbol, los compuestos aislados se caracterizaron por comparación en placa delgada contra testigos de los compuestos originales.

Los dos compuestos de menor polaridad se compararon -- con una muestra de corimbol. El compuesto "A" se desplazó con un R_f igual al del corimbol y el compuesto "B" tuvo un desplazamiento ligeramente mayor con un R_f correspondiente al del 16, - 17, 19-Kaurantriol.

La banda "C" tuvo un desplazamiento muy pequeño en la placa preparativa. Al correr esta fracción en placa delgada, - contra muestras de turbicorina y corimbosina, se vió que era -- todavía una mezcla de compuestos, dos de los cuales concordaron en sus R_{fs} con los de los glucósidos testigo.

CONCLUSIONES

I. DEL ENSAYO BIOLÓGICO

Tanto en embrión como en endospermo de la semilla de Ipomoea murucoides se observó que hay:

- Hidrolisis de los glucósidos turbicorina y corimbosina, y
- Aumento de la actividad de síntesis proteica y degradación de material de reserva, por consiguiente:
- La hipótesis que postula los glucósidos de Turbina-corymbosa como precursores de giberelinas se ve apoyada con este ensayo.

II. DEL ENSAYO QUÍMICO.

- Extracto hexánico: Se obtuvo un aceite que se caracterizó por su composición en ácidos grasos.
- Extracto de acetato de etilo: Se caracterizaron dos productos:
 - Una cera y
 - Un glucósido, al parecer perteneciente al grupo de resinas glucosídicas.
- Extracto metanólico: Se obtuvieron tres fracciones:
 - Fracción "A": Producto idéntico al corimbol por R_f en CPD.
 - Fracción "B": Producto con R_f igual al del 16, 17, 19-kaurantriol.

- Fracción "C": Mezcla de productos, dos con R_{fs} - - iguales a los de la turbicorina y la corimbosina.

III. DEL ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos tuvieron un nivel de significancia del 0.0001 y 0.0005.

BIBLIOGRAFIA

1. Scagel, R.F., Bandoni, R.J., Rouse, G.E., Schofield, W. B. Stein, J. R., y Taylor, T. M. C. (1977) El Reino Vegetal.-Omega. Barcelona, España.
2. Esau, K. (1977) Anatomy of Seed Plants. 2° ed. Wiley. New-York.
3. Nikolaeva, M.G. (1977) Factors controlling the seed dormancy pattern. In The Physiology and Biochemistry of seed -- Dormancy and Germination. (Ed. A. A. KHAN), North - -- Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 55 - 74.
4. Cordoba, V.C. (1976) Fisiología Vegetal. H. Blume Ed. España, pp. 5 - 31.
5. Mayer, A. M. and A. Poljakoff - Mayber. (1975) The Germination of Seeds. 2a. ed. Pergamon Press. Great Britain. -- p. 192.
6. Jones, R. L. (1973) Gibberellins: Their Physiological Role. Annu. Rev. Plant Physiol. 24, 571 - 598.
7. Yomo, H., Varner, J. E. (1971) Hormonal control of a secretory tissue. Curr. Top. Dev. Biol. 6. 111 - 144.
8. Tuan-Hua David Ho. (1979) Hormonal control of enzyme formation in barley aleurone layers. In Molecular Biology of -- Plants. Academic Press, London. pp. 217 - 240.
9. Chispeels M. J. and J. E. Varner. (1967) Plant Physiology. 42, 398 - 406.

10. Moore, T. C. (1979) Biochemistry and Physiology of Plant - Hormones. Springer - Verlag. New York: pp. 90-145.
11. Osborne D. J. (1977) Nucleic acids and seed germination. - In The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. - - pp. 319 - 321, 326 - 334.
12. Jones L. R. and J. L. Stoddart. (1977) Gibberellins and -- seed germination. In The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and d germination. Elsevier/North-Holland - Biomedical Press. pp. 77 - 109.
13. Bewley, J. D., and M. Black. (1978) Physiology and Bioche mistry of Seeds. Springer - Verlag. Berlín Heidelberg New York. pp. 1-32,58,213-220.
14. Matuda, E. (1966) Las Convolvulaceas del Estado de México. Comisión Botánica exploradora del Estado, Gobierno del Es tado de México. Dirección General de Agricultura y Ganade ría. Toluca, México. pp. 22.
15. Altamirano, F. (1905) Notas para la Historia del Palo -- Bobo. Ann. Inst. Med. Nac. México, 7: 61 - 63.
16. Standley, C.P. (1924) Trees and Shrubs of México. U.S.A. - Herbarium. Smithsonian Institution, Washington, D.C., - - Smithsonian Press, Part 4, 23:1205.
17. O'Donell, C. A. (1941) Convolvulaceae mexicanae: I. Nota - sobre algunas convolvulaceae austro mexicanas. Ipomoea - murucoides. Ann. Inst. Biol. Méx. Tomo XII: 98 - 100.
18. Matuda, E. (1963) El género Ipomoea en México (II). Ana- les Inst. Biol., UNAM. Tomo XXXV. No. 25., pp. 61-64.

19. Jiménez. M. C. (1895) Estudio sobre algunas plantas resinosas Indígenas. Ann. Inst. Med. Nac. Méx. Folleto del Tomo I., 7 : 99 - 107.
20. Martínez, M. (1959) Plantas Útiles de la Flora Mexicana. - pp. 138-139.
21. O'Gorman (1963) Plantas y Flores de México, Dirección General de Publicaciones. U.N.A.M. p. 30
22. Villada, M. (1903) Apuntes acerca de Plantas Indígenas de la Familia de las Convolvulaceas empleadas en Medicina. -- Gac. Med. Méx., Tomo II (3); 351 - 354. ,
23. Osuna F. M., (1983) Actividad de los Kauranolidos sobre el material de Reserva en semillas de Turbina corymbosa (Convolvulaceae). Tesis U.N.A.M.
24. Pérez Amador, M. C., A. González E., D. Saloma, F. García-Jiménez y O. Collera. (1982) Estudio Comparativo de Aceites de Semillas de Convolvulaceae. Phyton, 42, 93 - 101.
25. Pérez Amador, M. C., J. Márquez G., G. Laguna - Hernández, F. García J. (1981) Hidrólisis enzimática de la Turbicorina y la corimbosina en la semilla de Turbina corymbosa. -- Fiton. 40 (2) : 195 - 201; VI.
26. H. Wagner y P. Kazmaier. (1971) Tethahedron Letters, 35, - 3233-3236. Pergamon Press. Great Britan.
27. Segel, I. H. (1968) Biochemical Calculations. 2a. Ed. - - John Wiley & Sons. Inc. New York. pp. 334.
28. Domínguez, X. A. (1973) Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México. pp. 281.

ANEXOS

I. REACTIVO DE SOMOGYI

SOLUCION "A":

Tartrato de sodio y potasio (sal de La Rochelle)	1.2 g
Carbonato de sodio anhidro	2.4 g
Bicarbonato de sodio	1.6 g
Disolver todo en 80 ml de agua destilada.	

SOLUCION "B":

Sulfato de cobre pentahidratado	0.4 g
Sulfato de sodio	3.6 g
Disolver todo en 20 ml de agua destilada	

Mezclar ambas soluciones (4:1). El color del reactivo debe ser azul cielo.

II. REACTIVO DE ARSENIOMOLIBDATO DE AMONIO

SOLUCION "A":

Molibdato de amonio	5.0 g
Acido sulfúrico concentrado	5.0 ml
Disolver el molibdato de amonio en 90 ml de agua destilada y agregarle 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado.	

SOLUCION "B":

Arseniato sódico heptahidratado	0.6 g
Disolverlo en 5 ml. de agua destilada	
Agregar la solución "B" a la "A" y agitar. Colocar la mezcla a temperatura constante (37° C), durante 24 hrs. -	

El color del reactivo es verde limón; color verde oscuro o seco indican alteración del reactivo. Se guarda en - - frasco ámbar.

III. PRUEBA DE NELSON - SOMOGYI.

(Para determinar azúcares reductores)

1ml de sobrenadante + 1ml de reactivo de Somogyi



Calentamiento en baño María a ebullición (15 min)



Enfriamiento con agua corriente



Agregar 1ml de reactivo de arseniomolibdato de amonio y mezcla suavemente. Esperar que cese la efervescencia.



Aforar a 10 ml con agua destilada



Lectura en el espectrofotómetro (650 nm)

IV. METODO PARA DETERMINACION DE PROTEINAS

(Concentración de Proteínas $\mu\text{g/ml}$)

10 microlitros de muestra + 0.09 ml de agua destilada + 2.9 ml
 ↓ de sosa 0.05 N.

Aforar a 3 ml



Lectura en el espectrofotómetro (215 nm y 225 nm)

Método espectrofotométrico basado en la fuerte absorción que tienen todas las proteínas a longitudes de onda menores de 230 nm, y que es debida al enlace peptídico y por consiguiente los valores de absorvancias son esencialmente los mismos para todas las proteínas. Se mide la absorbancia a 215 y 225 nm y la concentración está dada por:

$$\text{Proteínas } \mu\text{g/ml} = 144 (A_{215}^{1 \text{ cm}} - A_{225}^{1 \text{ cm}})$$

Para concentraciones entre 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

La diferencia se utiliza para minimizar errores por compuestos no protéicos (buffer, inorgánicos) (27).

V. PRUEBA DE MÖLISCH (GLUCOSIDOS)

A 1 ml de extracto se agregan 2 gotas de solución de -
naftol en etanol y 1 ml de H_2SO_4 concentrado, dejándolo resba--
lar por las paredes poco a poco, de tal forma que el ácido y la
solución metanólica se estratifiquen. Si existe la formación
de un anillo violeta en la interfase, el resultado es positivo
(28).