

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS



**Facultad de
Ciencias**
Universidad Católica de la Santísima Concepción

**METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES ARVENSES EN CHILE Y SU
EFECTO EN EL CRECIMIENTO VEGETAL**

Por

FELIPE IGNACIO ÁVILA JIMÉNEZ

Memoria entregada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción para optar al título profesional de Químico Ambiental.

Profesor Guía: Dr. Danny Eugenio García M.

Concepción
2017



“Una forma ecológicamente correcta de combatir especies perjudiciales es utilizar sus propias defensas químicas como estrategia de control para sí y otras especies relacionadas”

ÍNDICE

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. Las especies arvenses en Chile	2
1.1. Tipos de maleza en Chile	3
2. Los metabolitos secundarios en especies vegetales	3
2.1. ¿Qué son?	4
2.2. ¿Dónde se encuentran?	5
2.3. ¿Cómo se clasifican?	6
2.4.1. Alcaloides como compuestos alelopáticos	8
Figura N°1: Aspectos biogénéticos para la clasificación de los alcaloides.	10
2.5. ¿Para qué se usan los MS y que efecto tienen?	10
2.6. Métodos integrados de control de malezas (MIC). El uso de metabolitos secundarios	11
2.7. Ensayos para evaluar el de efecto de metabolitos secundarios en el crecimiento de plantas	13
2.7.1 Ensayo citotóxico (bioquímico)	14
2.7.2 Ensayo de germinación y crecimiento (cámara de crecimiento)	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
METODOLOGÍA	17
3. Especies arvenses estudiadas	17
Tabla N°1: Especies estudiadas mediante tamizaje fitoquímico.	18
3.1. Métodos de detección de metabolitos secundario (tamizaje fitoquímico)	19
3.2. Métodos de cuantificación	20
3.3. Análisis estadístico	25
RESULTADOS Y DISCUSION	25
4. Análisis cualitativo	25
4.1. Alcaloides	26
Tabla N°2: Resultado del análisis cualitativo de alcaloides en el extracto clorofórmico	26

Tabla N°3: Resultado del análisis cualitativo de alcaloides en el extracto etanólico...	27
Tabla N°4: Resultado del análisis cualitativo de alcaloides en el extracto acuoso.....	27
Figura N°2. Frecuencia de detección de alcaloides según el tipo de extracto.	29
4.2. Fenoles	29
.....	30
Figura N°3. Frecuencia de aparición de fenoles acorde al tipo de extracto.....	30
4.3. Taninos	31
Figura N°4. Frecuencia de aparición de taninos acorde al tipo de extracto.....	32
4.4. Flavonoides	32
Figura N°5. Frecuencia de aparición de flavonoides acorde al tipo de extracto.....	33
4.5. Carbohidratos	34
Figura N°6. Frecuencia de aparición de carbohidratos acorde al tipo de extracto.	34
4.6. Metabolitos pertenecientes a otras funcionalidades	35
Figura N°7. Frecuencia de aparición de metabolitos secundarios acorde a su funcionalidad.....	35
4.7. Metabolitos no detectados	38
5. Análisis de agrupación en las pruebas cualitativas	40
Figura N°8. Dendogramas que muestran la similitud de los patrones fitoquímicos de las plantas estudiadas, considerando los metabolitos mayoritarios en hojas.....	41
Figura N°9. Dendogramas que muestran la similitud de los patrones fitoquímicos de las plantas estudiadas, considerando los metabolitos mayoritarios en tallos.....	42
Figura N°10. Dendogramas que muestran la similitud de los patrones fitoquímicos de las plantas estudiadas, considerando los metabolitos mayoritarios en corteza.	43
6. Análisis Cuantitativo	44
6.1. Alcaloides totales	44
Figura N°11. Estructura química de la Matrina (herbicida natural utilizado para desarrollar la curva patrón).....	44
Figura N°12: Concentración de alcaloides totales en hojas, tallos y corteza de especies arvenses en Chile.....	45
6.2. Fenoles totales	46
Figura N°13: Concentración de fenoles totales en hoja, tallo y corteza de especie arvenses en Chile.....	47
6.3. Proantocianidinas totales (taninos condensados)	49

Figura N°14: Concentración de proantocianidina (tanino condensado) en hoja, tallo y corteza de especies arvenses en Chile.....	50
7. Análisis cromatográfico del extracto alcaloidal (GC-MS).....	51
Tabla N°5: Resultado del análisis cromatográfico (GC-MS) de extractos alcaloidales acuosos de arvenses Chilenas.	51
Figura N°15. Estructura de alcaloides detectados en arvenses chilenas por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	52
8. Bioensayo de germinación y crecimiento	54
8.1. Prueba de germinación	54
Figura N°16. Efecto de extractos vegetales en la germinación de perejil (<i>C. sativum</i>) a 15°C.....	55
8.2. Prueba de crecimiento	57
Figura N°17. Efecto de extractos vegetales en la altura de perejil (<i>C. sativum</i>) a 15°C.	58
8.3. Prueba de longitud de la raíz	59
Figura N°18. Efecto de extractos vegetales en la longitud de la raíz de perejil (<i>C. sativum</i>) durante la quinta semana posterior a la emergencia de la plántula.	60
CONCLUSIÓN.....	61
BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXOS	77

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el perfil fitoquímico de siete especies arvenses (*Acacia dealbata*, *Acacia melanoxylon*, *Pinus radiata*, *Ulex europaeus*, *Lupinus arboreus*, *Conium maculatum* y *Teline monspessulana*) presentes en la región del Biobío, Chile, para evaluar su actividad reguladora preliminar. Se investigó la presencia de 15 grupos de compuestos, en vista a determinar su influencia en el crecimiento vegetal. Los metabolitos frecuentemente detectados fueron: alcaloides, fenoles, taninos, triterpenos/esteroles y ácidos grasos. Para la cuantificación se seleccionaron los grupos de compuestos que exhibieron mayor frecuencia de aparición y repercusión potencial (alcaloides, fenoles y taninos). Adicionalmente, se realizó un análisis cromatográfico (GC-MS) para detectar la presencia de alcaloides específicos. La Lupanina ($C_{15}H_{24}N_2O$) fue el alcaloide de mayor frecuencia de aparición en las especies estudiadas. Así mismo, se realizó un bioensayo donde se evaluó el efecto de los extractos provenientes de las plantas arvenses sobre la germinación y el crecimiento de una especie de prueba (*Coriandrum sativum*). Los resultados muestran que los extractos crudos de metabolitos de naturaleza polar tienen efectos diversos en la germinación y el crecimiento vegetal; condicionado por el tipo de planta y la concentración del extracto. Sin embargo, los alcaloides detectados en las especies estudiadas; así mismo como los polifenoles, pueden ser compuestos de elevada relevancia para el desarrollo de bioproductos con características herbicidas. Un mayor número de investigaciones se requieren para dilucidar el principal factor asociado con la actividad fitoreguladora de los extractos.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el desarrollo de malas prácticas sobre hierbas afecta el rendimiento de los cultivos, algunas de estas prácticas como el uso de herbicidas sintéticos para su control ha ocasionado daños a la salud humana; Esto ha intensificado la búsqueda de compuestos biodegradables con actividad herbicida (Fajardo *et al.*, 2005).

A sí mismo, sustancias con actividad alelopática son sintetizadas por muchos vegetales como parte de sus mecanismos de defensa. La alelopatía es un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos. El estudio de este efectos en algunas especies, tanto leñosas, arbustivas y herbáceas, en el porcentaje de germinación y daños en el crecimiento, ha permitido detectar la actividad alelopática de algunas plantas. Estos resultados permiten identificar nuevas sustancias con actividad herbicida como estrategia de control en áreas productivas a mediana y gran escala.

El estudio de las interacciones entre las plantas en los ecosistemas ha traído consigo el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos bioactivos. Se ha encontrado que los aleloquímicos o agentes alelopáticos juegan un papel importante en el equilibrio ambiental, pues la presencia de estos compuestos llega a causar alteraciones en el desarrollo de algunas especies de forma significativa. Estos metabolitos afectan algunos procesos como la germinación, la nitrificación o la desnitrificación y; así como otros aspectos que pueden formar parte de los

procesos químicos, biológicos y bioquímicos que se encuentran inmersos en la actividad agrícola (Ives, 2003).

Actualmente, como resultado de algunas investigaciones se pueden encontrar en el mercado productos herbicidas que por su naturaleza son biodegradables o que no dañan al ambiente; en comparación con los pesticidas sintéticos que comúnmente se utilizan en las actividades agrícolas (Suck-Joon *et al.*, 1997).

1. Las especies arvenses en Chile

Las especies exóticas han sido introducidas paulatinamente a Chile desde otras áreas del mundo a partir de los tiempos de la colonia en el siglo XVI, mediante las actividades directas o indirectas del hombre. Estas especies, están actualmente presentes en casi todos nuestros ecosistemas; siendo particularmente abundantes en la zona central del país. Esta zona de Chile, además de concentrar la mayor cantidad de habitantes y alteraciones al ambiente, es donde se concentra la mayor cantidad de especies endémicas; las que constituyen una biodiversidad única. Dicha biodiversidad debe ser preservada por sus numerosos beneficios a la sociedad, y por lo tanto se deben conocer y mitigar los factores que amenazan su sustentabilidad y preservación, como lo son las especies exóticas (arvenses) y/o malezas (Labrada y Parker, 1996).

Las especies exóticas también pueden tener efectos perjudiciales más directos para el ser humano. Algunas de ellas (por ejemplo aramos, pinos y eucaliptos) son altamente inflamables, constituyendo una amenaza en caso de incendio cuando

se encuentran en grandes cantidades alrededores de las ciudades y de la vegetación nativa (Cordero *et al.*, 2002).

1.1. Tipos de maleza en Chile

En Chile hay unas 500 especies de maleza inventariadas. Sin embargo, 100 son sensiblemente importantes para la agricultura. Dentro de ese centenar, existen diez que califican como las más complejas, porque son muy invasivas, resistentes y, si son consumidas, pueden llegar a ser tóxicas para humanos y animales (Pitty y Muñoz, 1991). Algunas de las especies más conocidas y dañinas son: chéptica (*Paspalum paspalodes*); ballicas (*Lolium multiflorum*); falso té (*Bidens aurea*); chufa (*Cyperus esculentum*); correhuela (*Convolvulus arvensis*) y pica-pica (*Mucuna pruriens*).

2. Los metabolitos secundarios en especies vegetales

La búsqueda de plantas con propiedades útiles para el bienestar humano constituye un tópico importante dentro del avance tecnológico. Muchos de los fitoquímicos introducidos al organismo a través de la alimentación, tales como compuestos fenólicos, terpenoides, lactónicos y esteroideos, han sido reportados como modificadores de procesos biológicos que permiten reducir enfermedades crónicas en humanos y animales tales como la diabetes, el cáncer y los procesos inflamatorios, entre otras (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Sin embargo, estos mismos metabolitos pueden afectar el crecimiento de otras especies vegetales que habitan a su alrededor e inclusive ocasionar efectos adversos en animales y humanos.

2.1. ¿Qué son?

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Estas respuestas de defensa a su vez, se combinan con el desarrollo de estructuras contra depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares. Así mismo, y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad de oxidación-reducción (Croteau *et al.*, 2000).

Los MS son compuestos de variado peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica. Estos compuestos participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos; pero también son reserva de estructuras carbonadas para el metabolismo celular. Una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio, la luz

y los nutrientes y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Segler, 2001).

Otra función importante de los MS es la de actuar como agente alelopático, ya que intervienen en los receptores químicos de las plantas. De esta manera, los MS que son secretados, pueden interactuar con otra planta y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato, produciendo un efecto positivo o negativo sobre ella (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

Las condiciones ambientales influyen en la síntesis de los compuestos con actividad alelopática potencial, pero esta potencialidad vuelve a sufrir las consecuencias de la interacción con el ambiente, pudiendo ser modificada por la distintas condiciones ambientales (Kobayashi, 2004). Todos estos compuestos incrementan su concentración cuando la planta está bajo diferentes condiciones meteorológicas.

2.2. ¿Dónde se encuentran?

En principio, los MS fueron considerados productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desechos de las plantas. En general, fueron percibidos como insignificantes por los biólogos, por lo que históricamente recibieron poca atención por parte de los botánicos y muchas de las funciones permanecieron desconocidas.

El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados por su importancia como

drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras y otros materiales utilizados en la industria (Taiz y Zeiger, 2010).

Por otra parte, los metabolitos secundarios no son producidos al azar, ya que han sido moldeados y optimizados durante la evolución (Jarvis, 2000). Estos compuestos intervienen en las interacciones entre la planta y su ambiente, y pueden ser compuestos sumamente eficaces, tanto en sus efectos específicos como generales.

2.3. ¿Cómo se clasifican?

Los MS se puede clasificar en cinco grupos principales:

a) Compuestos nitrogenados y alcaloides: son compuestos cíclicos que poseen nitrógeno en un estado de oxidación determinado y son sintetizados por aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solo o combinados con terpenoides. Este grupo de MS nitrogenados reviste una enorme importancia económica. Muchos de estos compuestos (los alcaloides esteroidales, glucósidos cianogénicos y aminas) son muy tóxicos, en particular para los rumiantes, y provocan pérdidas enormes en la actividad ganadera (Pistelli, 2002; Panter *et al.*, 2007). Los alcaloides se pueden dividir en los siguientes grupos: isoquinolécicos, quinolizidínicos, pirrolizidínicos, tropánicos e indólicos (Facchini, 2001).

b) Compuestos fenólicos y sus derivados: estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilos y se sintetizan a partir de un precursor común, el ácido cinámico, derivado de la

fenilalanina por la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (Rice-Evans *et al.*, 1997).este grupo incluye antocianinas (pigmentos vegetales del rojo al azul), ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos (por lo general presentes en la madera y corteza), taninos, charconas (pigmentos amarillos), estilbenos y cumarinas; entre otros. Tienen usos importantes en la industria farmacológica y nutracéutica como antioxidantes, anti-inflamatorios, pronutricionales y analgésicos (Boros *et al.*, 2010).

c) Terpenos: en términos de diversidad estructural, los terpenoides constituyen la familia más grande de productos naturales, con aproximadamente 30.000 compuestos conocidos (Langenheim, 2003). La mayoría de los terpenos poseen isopreno como unidad básica de su esqueleto carbonado. El número de unidades isoprénicas (5 carbonos en línea) determina su clasificación en hemi-, mono-, di-, sesqui- o politerpenos (Silvestre y Gandini, 2008). Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Eisenreich *et al.*, 2001). Los aceites esenciales (monoterpenos) y las resinas (di- y politerpenos) se encuentran entre los MS más utilizados por el hombre. Los aceites esenciales son compuestos complejos, volátiles y característicamente aromáticos. La mayoría de estos aceites provienen de especies herbáceas y arbustivas nativas. Las familias *Myrtaceae* y *Lamiaceae* son conocidas por la alta concentración de terpenos de su follaje. Existe gran variabilidad en la calidad y cantidad de aceites foliares, lo que tiene implicancias económicas y ecológicas (Keszei *et al.*, 2010).

d) Látex: algunos investigadores no consideran este grupo como MS en sí, sino como un conjunto de ellos. Es una solución acuosa coloidal que incluye terpenoides, isoprenoides, grasas y carbohidratos. Uno de los MS de mayor importancia comercial es el caucho de *Hevea brasiliensis* (*Euphorbiaceae*). El guayule (*Parthenium argentatum*, *Asteraceae*), un arbusto nativo del Desierto de Chihuahua en México y EE.UU., acumula caucho de peso molecular similar al de Hevea (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2002).

e) Ceras: Las ceras son mezclas complejas de cadenas que poseen entre 20 y 60 carbonos (Holloway y Jeffrey, 2004). Son insolubles en agua y solubles en solventes no polares. Aunque existen muchos compuestos cerosos que son metabolitos primarios, otras moléculas pertenecientes a esta familia de compuestos son considerados MS.

2.4.1. Alcaloides como compuestos alelopáticos

El término alcaloide (de álcali), fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819; se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas, este carácter básico es debido a la presencia de nitrógeno amínico en su estructura.

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como: “un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado, derivados generalmente de aminoácidos, más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación” (Macías *et al.*, 1999).

Por comodidad, algunos autores dividen los alcaloides en cuatro clases:

1. Alcaloides verdaderos: cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloide: tienen siempre un nitrógeno heterocíclico, son de carácter básico y existen en la naturaleza normalmente en estado de sal, biológicamente son formados a partir de aminoácidos.
2. Protoalcaloides: son aminas simples con nitrógeno extra cíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos.
3. Pseudoalcaloides: presentan todas las características de la definición de alcaloide pero no son derivados de aminoácidos.
4. Alcaloides imperfectos: son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

En este sentido la Figura 1 describe aspectos biogénéticos para la clasificación de alcaloides.

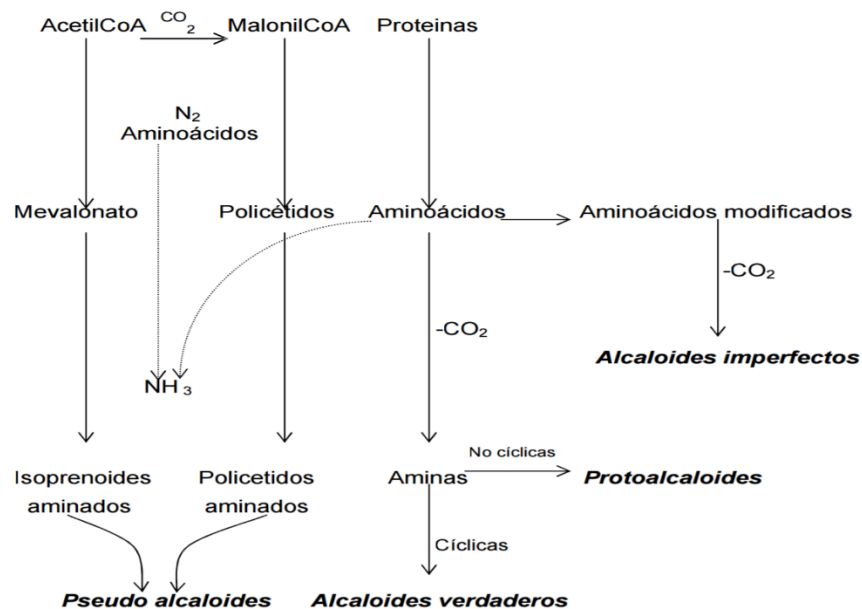


Figura N°1: Aspectos biogenéticos para la clasificación de los alcaloides.

Fuente: Arango (2002).

Muchos alcaloides presentan actividad alelopática. Algunos como la cocaína, cafeína, cinconina, fisostigmina, quinina, cinconidina y estriquina son reconocidos inhibidores de la germinación. La cebada exuda por sus raíces la gramina que inhibe el crecimiento de *Stellaria media*, mientras que la cafeína mata ciertas hierbas sin afectar algunas especies cultivadas como, por ejemplo, el poroto (Ives, 2003).

Los alcaloides pueden servir de reguladores del crecimiento, se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente durante la germinación de algunas plantas como la cebada, cuando se encuentran en suelos deficientes de potasio (Gizasa y Souto, 2001).

2.5. ¿Para qué se usan los MS y que efecto tienen?

En las últimas décadas se han logrado significativos avances para obtener sustancias químicas o biológicas que sean menos tóxicas para el ambiente y el hombre y, al mismo tiempo, más selectivas respecto a los cultivos donde se usan. Dentro del control biológico se ha planteado la utilización de compuestos alelopáticos en la formulación de herbicidas (Chiapusio *et al.*, 2004).

El término alelopatía se refiere a los efectos detrimentales de una especie de planta superior, o donante, sobre la germinación, el crecimiento y el desarrollo de otra especie de planta receptora. Sin embargo, algunos investigadores incluyen

efectos estimulantes bajo condiciones alelopáticas, asemejándolos al caso de algunos herbicidas en bajas concentraciones, que activan el crecimiento por efectos hormonales, aún cuando continúan siendo clasificados como herbicidas (Chiapusio *et al.*, 2004).

Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta (Harborne, 1993). Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa (Stafford, 1997). Los conjugados de fenilpropanoides con aminas se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez y reducir su digestibilidad por insectos y vertebrados herbívoros (Poulton, 1990). Así mismo, algunos alcaloides son neurotóxicos a insectos y vertebrados herbívoros. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por las plagas (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003)

2.6. Métodos integrados de control de malezas (MIC). El uso de metabolitos secundarios

El manejo integrado es una tecnología que utiliza todos los métodos disponibles y compatibles con el ambiente, para mantener las poblaciones de malezas en niveles por debajo de umbrales de daño económico. El manejo integrado de las malezas está basado en el conocimiento de las características biológicas y

ecológicas de las mismas, para entender la forma en que su presencia puede ser modulada por las prácticas culturales (Labrada y Parker, 1996).

En base a este conocimiento, el agricultor debe primeramente construir una estrategia general de manejo de las malezas dentro de su secuencia de cultivos comerciales y después elegir el mejor método de control directo de las malezas durante los ciclos de cultivo. Una vez que el monitoreo, la identificación y los umbrales de acción indican que se requiere el control de plagas, y los métodos preventivos ya no son efectivos o no están disponibles.

Primero se eligen los controles de plaga que sean eficaces, menos riesgosos, incluyendo los fitoquímicos; así como otros químicos muy específicos tales como las feromonas para ocasionar trastornos de apareamiento de plagas, o control mecánico tales como utilizar trampas o desmalezar. Si posteriormente, el monitoreo, las identificaciones y los umbrales de acción indican que los controles menos riesgosos no están funcionando, luego se aplicarían métodos de control adicionales, tales como el rociado específico con químicos sintéticos. En este sentido, la pulverización en general con pesticidas no específicos es un último recurso (Pérez, 2004).

Enfatizando en controles que estén hecho a bases de estrategias naturales se toman en consideración: a) Control químico. Se refiere a realizar aplicaciones con fitoinsecticidas para lo cual es fundamental utilizar productos específicos, en las dosis y momentos apropiados. Como ejemplo de esto; podemos citar aquel que, basado en el comportamiento alimenticio de la plaga a controlar, se utiliza una mezcla de insecticida y atrayente alimenticio que se denomina insecticida-cebo, el

que es altamente selectivo. b) Control Biológico. Este método consiste en la utilización de los enemigos naturales de las plagas para mantenerlas por debajo del umbral de daño económico. Se presenta como alternativa al uso exclusivo de productos agroquímicos. Vale la pena señalar que una modalidad derivada del control químico lo constituye el uso directo de extractos vegetales acuosos o suspensiones como herbicidas o insecticidas naturales en dosis y repeticiones definidas según el nivel de daño y la efectividad del extracto.

2.7. Ensayos para evaluar el de efecto de metabolitos secundarios en el crecimiento de plantas

Una manera de examinar las propiedades alelopáticas de una especie es mediante bioensayos en los que se cuantifica la germinación o la emergencia de plántulas y se mide la longitud de la radícula o el hipocotíleo (Lovett y Ryuntyu, 1992). Una ventaja de los compuestos aleloquímicos en el desarrollo de pesticidas naturales es que son fácilmente biodegradables y muchos de ellos son seguros y limpios desde el punto de vista ambiental (Rizvi *et al.*, 1992). Fajardo *et al.* (2005) sostienen que, debido a la situación existente en la producción agrícola, se han encontrado nuevas vías para desarrollar una agricultura sostenible basada en recursos naturales renovables. Una de las soluciones a esta situación ha sido la alelopatía.

Estos autores realizaron un ensayo donde evaluaron el efecto de extractos acuosos de girasol (*Helianthus annuum*) al 50% v/v. Se encontraron diferencias significativas en la germinación de las malezas en comparación con el testigo, al

mostrar un mayor efecto inhibitorio en la germinación y en el retardo del crecimiento

2.7.1 Ensayo citotóxico (bioquímico)

La definición de citotoxicidad tiende a variar dependiendo de la naturaleza del estudio; si las células mueren o simplemente tienen su metabolismo alterado. Estos ensayos son empleados porque son baratos, fácilmente cuantificables y reproducibles. Muchos experimentos *in vitro*, tienen el propósito de determinar la potencial citotoxicidad de los compuestos estudiados, porque ellos van a ser usados como fármacos, cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos o porque van a ser usados como agentes anti cáncer (Freshney, 2000).

Según Freshney (2000), los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en: (a) ensayos de viabilidad y (b) ensayos de supervivencia; los primeros se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas. Mediante estos ensayos se puede evaluar citotoxicidad de un tratamiento en términos de concentraciones letales (LC). El segundo ensayo mide la letalidad de los extractos después del contacto con las células.

En este sentido, la concentración letal 50 (LC₅₀) es la concentración de la sustancia de tratamiento que causa la muerte del 50% de las células presentes, evaluadas inmediatamente después del tratamiento (Cordero *et al.*, 2002).

2.7.2 Ensayo de germinación y crecimiento (cámara de crecimiento)

Las cámaras de germinación y crecimiento son dispositivos que permiten un cultivo con éxito en condiciones de temperatura y humedad óptimas. Consisten en una unidad hermética armada por paneles térmicos con revestimiento sanitario, con un mecanismo capaz de controlar la intensidad de luz, la temperatura y la humedad por períodos programables (Seppanen y Coleman, 2003).

Las semillas de especies modelos son germinadas en la oscuridad con temperatura constante (15-18°C) durante 7-14 días. Las plántulas normales que tienen una longitud total de 4 cm o más, son consideradas plántulas de alto vigor (Woelfel y Farack, 2005).

El crecimiento se estima frecuentemente midiendo la longitud de la raíz y la plúmula de la plántula, después de 7 días en la oscuridad a 20°C, el ensayo continua durante 1 mes reportando el crecimiento semanal (Seppanen y Coleman, 2003).

Dichos experimentos pueden ser realizados en capsulas de Petri o bandejas de crecimiento utilizando un soporte sólido (arena o humus) para así inducir la germinación (Tejeda y Rodríguez, 2008). En sentido general, los compuestos a ensayar son suministrados a los modelos biológicos en forma de extractos dosificados, los cuales son aplicados en una dosis únicas o con una frecuencia conocida, para evaluar el efecto a mediano y largo plazo del extracto (Segler, 2001).

HIPÓTESIS

Grupos de metabolitos provenientes de especies arvenses en Chile tienen un efecto significativo en la germinación y el crecimiento vegetal de semillas de perejil (*Coriandrum sativum*).

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de grupos de metabolitos provenientes de especies arvenses de alta distribución en Chile en la germinación y el crecimiento de una especie vegetal de prueba (*Coriandrum sativum*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar los metabolitos mayoritarios en especies arvenses mediante el uso del tamizaje fitoquímico.

- Cuantificar mediante técnicas analíticas de amplia accesibilidad los niveles de metabolitos secundarios de mayor interés con potencial alelopático.
- Evaluar el efecto de extractos de especies arvenses en la germinación y el crecimiento de una especie vegetal indicadora.

METODOLOGÍA





El experimento inició con la recolección de las especies arvenses previamente seleccionadas en distintas zonas de la región del Biobío, Chile. Se obtuvieron 7 especies vegetales de la estación invernal del año 2016, las cuales se podaron en 3 secciones (hojas, tallos, corteza) y se introdujeron a una estufa (Memmet U 54, Alemania) a 40°C por 2 días para dejarlas completamente secas. Posteriormente, se procedió a llevar las muestras al Laboratorio de Materiales Termoplásticos de la UDT (Unidad de Desarrollo Tecnológico), donde se utilizó un molino modelo MF 10 basic (IKA WERKE), con el objetivo de obtener un pulverizado homogéneo de cada parte de la planta.




3. Especies arvenses estudiadas

Las especies analizadas fueron: *Acacia dealbata* (joven 1-3 años y adulta 5-10 años), *Acacia melanoxylon* (joven 1-3 años y adulta 5-10 años), *Pinus radiata* (joven 1-3 años y adulto 5-10 años); así como la biomasa madura (1 años y medio) de *Conium maculatum*, *Ulex europeus*, *Lupinus arboreus* y *Teline*

monspessulana. La Tabla N°1 muestra las características de las especies estudiadas.

Tabla N°1: Especies estudiadas mediante tamizaje fitoquímico.

Nombre científico	Nombre común	Imagen asociada	Región (hábitat)
<i>A. dealbata</i>	Acacia		VI; VII; VIII; IX
<i>A. melanoxylon</i>	Aromo		VI; VII; VIII; IX
<i>P. radiata</i>	Pino		VII; VIII
<i>C. maculatum</i>	Helecho		RM; VI; VII; VIII; IX

<i>U. europeus</i>	Espinillo		V; RM; VI; VII; VIII; IX; X
<i>L. arboreus</i>	Leguminosa Lupino		IV; V; RM; VI; VII; VIII; IX; X
<i>T. monspessulana</i>	Retamilla		V; RM; VI; VII; VIII; IX; X

*RM: Region Metropolitana.

3.1. Métodos de detección de metabolitos secundario (tamizaje fitoquímico)

Se utilizó el método descrito por García (2003). Mediante el estudio fitoquímico de extractos de distinta polaridad (acuoso, alcohólico y clorofórmico), se evalúa la presencia de grupos de metabolitos mediante pruebas cualitativas. Como criterio de resultados positivos se utilizó la formación de precipitados y cambios de color en soluciones introducidas en tubos de ensayos o utilizando placas de porcelana; dependiendo del caso. Se reportó el índice de presencia o ausencia en todos los casos (Savón *et al.*, 2007).

Los metabolitos investigados fueron: aceites volátiles (ensayo organoléptico), ácidos grasos (Sudan III), alcaloides (Dragendorff), aminoácidos (Ninhidrina), carbohidratos (Fehling), cardenólidos (Kedde), carotenos (Carr-Price), cianógenos (papel de picrato), compuestos amargos (ensayo organoléptico), cumarinas

(Baljet), fenoles (FeCl_3 , 1%), fitoquinonas (Borntrager), flavonoides (Shinoda), mucílagos (prueba de viscosidad), proantocianidinas (Roseheim), saponinas (prueba de espuma), tanino (gelatina, 10%), triterpenos y esteroides (Lieberman-Burchard).

Se toma una muestra pulverizada (0,5 gramos) y se coloca en un tubo Falcon, se le añade 5mL de cloroformo (Sigma Aldrich) y se introduce a un baño de ultrasonido por 15 minutos a 30°C. Posteriormente, la muestra se coloca en el agitador mecánico por 24 horas a 20°C. Luego se procede a filtrar el extracto con papel filtro (Whatman N°1) y en el sobrenadante se realizan los ensayos de detección usando gotas de reactivos específicos según el grupo funcional a detectar. La formación de un precipitado, en conjunto con un cambio en la tonalidad del extracto, indica la presencia del metabolito investigado.

El residuo de la filtración inicial se seca en estufa por 24 h a 30°C y se repite la extracción pero con etanol (Winkler). De igual forma, después de realizada la segunda extracción y la filtración correspondiente, se extrae finalmente la muestra con agua destilada en igualdad de condiciones experimentales. El residuo final, libre de metabolitos extraíbles, se descarta.

3.2. Métodos de cuantificación

Todos los análisis se realizaron por triplicado a partir de tres muestras correspondientes a cada tratamiento. Se reportaron los valores promedios con su respectiva desviación estándar.

Pruebas de gravimetría:

Técnica analítica clásica que se basa en la precipitación de un compuesto de composición química conocida tal que su peso permita calcular mediante relaciones, generalmente estequiométricas, la cantidad original de analito en una muestra (Skoog, 2015). Esta técnica se utilizó para la cuantificación de alcaloides.

Se siguieron las indicaciones realizadas por Niemeyer (2014). Se introdujo 200mg de muestra y 5mL de HCl (1%) en un tubo Falcon de 50mL de capacidad, luego se deja 24 horas en agitación constante para que ocurra la extracción cuantitativa de los alcaloides. Fue necesario el uso de filtradores donde se encontraron algunas partículas en suspensión en la solución. Se procede a retirar 2mL del sobrenadante a un nuevo tubo Falcon (previamente tarado) que contiene 2mL del reactivo de Dragendorff, este tubo (tubo + reactivo) se deja en reposo por 24 horas a 5°C para que la reacción tenga lugar. Pasada las 24 horas se tendrá un precipitado en caso de resultado positivo. La disolución que contiene el pellet se introduce en una centrífuga (2000 rpm, 5 min.), con el objetivo de separar todo el precipitado del sobrenadante. Posteriormente se hacen tres lavados con 10mL de agua destilada (5°C) evitando la disolución del pellet. Para asegurar que el producto final no contenga humedad, el tubo que contiene el pellet se introduce a una estufa a 50°C por 48 horas, para obtener la masa final seca (complejo alcaloide – reactivo Dragendorff) mediante la siguiente ecuación:

$$P_{D-ALC(g)} = P_{final(g)} - P_{tubo(g)}$$

Dónde: P_{D-ALC} : peso Dragendorff + peso alcaloide; P_{final} : peso final (tubo + pellet);

P_{tubo} : peso inicial.

Mediante la diferencia de pesadas se obtendrá la concentración de cada muestra comparada con una curva del patrón realizada con Matrina ((7aS, 13aR, 13bR, 13cS) – dodecahidro - 1H, 5H, 10H – dipirido [2,1 - f:3',2',1' - ij] [1,6] naphthiridin – 10 - uno) (rango de concentración: 0,01 - 0,5mg/mL).

Pruebas colorimétricas:

Es la técnica más usada para determinar la concentración de MS (Hernández y González, 2002).

La cuantificación de fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por García (2003). La determinación de proantocianidinas se llevó a cabo mediante la metodología reportada por Porter y col. (1998), validada por Makkar y Becker (1999).

Para cuantificar los fenoles totales y las proantocianidinas se necesita primero extraer los metabolitos en un solvente apropiado (etanol:agua, 70:30), añadir 200mg de muestra más 5mL de la solución anterior, extraer por 30 minutos en baño ultrasónico y dejar en agitación por 24 horas a temperatura ambiente (20°C). Para fenoles totales, luego se toman 0,5mL de extracto muestra y se le agregan 2,5mL del reactivo de Folin (10% v/v), se deja en reposo por 8 minutos y se agregan 2mL de Na₂CO₃ (75g/L). La muestra se dejan a 45°C durante 15 minutos; mientras que para proantocianidinas se desarrolla color con el reactivo HCl/n-butanol/Fe³⁺ mediante calentamiento (60°C) durante 15 minutos.

Finalmente, se procede a leer en una longitud de onda específica en un espectrofotómetro (λ fenoles: 765nm; λ proantocianidinas: 550nm) y se calcula las

concentraciones mediante la ecuación de la recta $y = mx + b$ (y = absorbancia, x = concentración (mg/L)).

Estos resultados se comparan con la curva patrón desarrollada con fenol y tanino de pino (ver Anexo 1), respectivamente.

Pruebas de cromatografía:

Se utilizó la cromatografía gaseosa acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS). La técnica constituye un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas.

Las condiciones en las que se desarrolló el ensayo fueron las siguientes: gas de carrier: helio 100Kpa, inyección splitless 1:20, temperatura del inyector: 250°C, temperatura del detector: 300°C, temperatura del horno: 150°C, 1 minuto en la isothermal, entre 150-300°C a 10°C/min, luego 20 en la isothermal. La Esparteína ((7*S*, 7*aR*, 14*S*, 14*aS*) – Dodecahidro - 7,14 – metano – dipirido [1,2 - α ;1',2'- ϵ] [1,5] diazocina) se usó como un estándar externo.

El GC-MS consistió en un equipo Shimadzu modelo QP-50-50A (equipado con un HPS MS 30m x 0,25mm de columna) y una fase estacionaria de 0,25 μ m. Detalles de alcaloides identificados fueron reportados por Meissner y Wink (1992) y Carey y Wink (1994). Dichas publicaciones se utilizaron como antecedentes para identificar el perfil fitoquímico y tratar de detectar alcaloides específicos en las muestras.

Prueba de germinación y crecimiento vegetal:

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias, UCSC.

Se inocularon 3 semillas de perejil (*Coriandrum sativum*, Verdifresh) en bandejas de germinación de poliestireno (40 x 20 cm) con 50 pocillos (4 x 3 cm) cada uno; los cuales se rellenaron con humus comercial (humus lombriol, Anasac) con 80% de humedad. Se midió durante 45 días la germinación y el crecimiento de las plántulas; las cuales fueron sometidas a un régimen de luz-oscuridad de 12 horas a 20°C y riego manual (frecuencia semanal) con 10mL de soluciones acuosas (1,0; 5,0 y 10%, v/v) que contenían los extractos de cada planta.

La extracción inicial de los principios activos polares, para el ensayo de germinación y crecimiento, se desarrolló utilizando 5g de hojas adultas como material vegetal en 100mL de H₂O ligeramente acidificada con 1mL de HCl (1%). La extracción se efectuó a 30°C durante 72h bajo agitación constante. Los extractos experimentales diluidos se prepararon en relación volumen/volumen. Las soluciones controles se prepararon a partir de una solución acuosa de HCl 1% (v/v).

El conteo de la germinación se realizó de manera visual; mientras que la altura de la planta se midió con una regla graduada desde la superficie del sustrato hasta la hoja apical de la plántula. La longitud de la raíz se midió al final del experimento con el uso de una regla graduada. La plántula fue removida cuidadosamente del sustrato y se midió desde la punta de la raíz principal hasta el inicio del tallo.

Cada pocillo se consideró una unidad experimental y se utilizaron 10 pocillos por tratamiento.

3.3. Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó un diseño completamente aleatorizado, para lo cual se empleó la opción GLM (General Lineal Model) correspondiente al paquete estadístico SPSS versión 10.0. Fue usada la dócima de comparación múltiple de SNK (Student-Newman-Keuls) y las medias fueron comparadas según $P < 0.05$.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos cualitativo (clasificación automática), con el objetivo de establecer similitud en los patrones fitoquímicos de las especies estudiadas, se llevaron a una escala numérica (1-ausencia y 2, 3, 4-presencia). El análisis de conglomerados se realizó mediante el método de Ward, utilizando la distancia euclidiana como criterio de diferencia entre los casos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron una serie de experimentos de carácter cualitativo, de cuantificación, pruebas de cromatografía (CG-MS) y un ensayo biológico en la Facultad de Ciencias de la UCSC.

4. Análisis cualitativo

Los grupos de metabolitos detectados de las distintas especies en estudio fueron los siguientes: alcaloides, taninos, fenoles, saponinas, flavonoides, triterpenos/esteroles, carbohidratos, aceites volátiles, ácidos grasos, antocianinas, quinonas, cardenolidos, aminoácidos y compuestos amargos. Los compuestos no detectados en ninguna de las especies estudiadas fueron las cumarinas, los carotenos, los mucílagos y los cianógenos.

4.1. Alcaloides

Los alcaloides fueron detectados mediante la utilización del reactivo de Dragendorff, el cual, presenta una coloración naranja y al combinarse con los extractos de prueba (cloroformo, etanol o agua) en un medio acidificado (gotas de HCl al 1%), este deberá cambiar su tonalidad y/o producirse un precipitado.

A continuación se presenta una serie de tablas que describen los resultados del análisis fitoquímico cualitativo en términos de detección de alcaloides para cada tipo de extracto.

Tabla N°2: Resultado del análisis cualitativo de alcaloides en el extracto clorofórmico

Especie	Hojas	Tallo	Corteza
Conium	-	-	N
Lupinus	+++	++	+++
Teline	++	+	N
Pino (adulto)	-	-	-

Pino (joven)	-	-	-
Aromo (adulto)	-	-	-
Aromo (joven)	-	-	-
Acacio (adulto)	-	-	-
Acacio (joven)	-	-	-
Espinillo	-	+	N

(+++) Abundante presencia; (++) Mediana presencia; (+) Poca presencia; (-) Total ausencia; (N) No se efectuó ensayo.

Tabla N°3: Resultado del análisis cualitativo de alcaloides en el extracto etanólico.

Especies	Hoja	Tallo	Corteza
Conium	-	+	N
Lupinus	+	+	+
Teline	++	++	N
Pino (adulto)	+	-	+
Pino (joven)	-	-	+
Aromo (adulto)	+	+	+
Aromo (joven)	+	+	+
Acacio (adulto)	+	+	+
Acacio (joven)	+	+	+
Espinillo	+	+	N

(+++) Abundante presencia; (++) Mediana presencia; (+) Poca presencia; (-) Total ausencia; (N) No se efectuó ensayo.

Tabla N°4: Resultado del análisis cualitativo de alcaloides en el extracto acuoso.

Especies	Hoja	Tallo	Corteza
Conium	+	-	N
Lupinus	+++	+++	+
Teline	+++	+++	N
Pino (adulto)	-	-	-

Pino (joven)	-	-	-
Aromo (adulto)	+++	+	+
Aromo (joven)	+	+	+
Acacio (adulto)	++	++	+++
Acacio (joven)	++	+	+
Espinillo	+++	+++	N

(+++) Abundante presencia; (++) Mediana presencia; (+) Poca presencia; (-) Total ausencia; (N) No se efectuó ensayo.

La presencia de alcaloides y compuestos aminados en el tejido vegetal de arvenses que crecen en diversas condiciones de suelo y clima ha sido reportada por Ho-Zoo y Won Chu (2001).

Los alcaloides en las especies estudiadas tiende a encontrarse más frecuentemente en el extracto etanólico, seguido por el acuoso. Los alcaloides de baja polaridad, solubles en cloroformo, se detectaron en pocas muestras. Sin embargo, fueron abundantes en la biomasa de *Lupinus* y *Retamilla*.

Los alcaloides tienen una mayor afinidad a detectarse en extractos medianamente polares, mientras que en el cloroformo la aparición de precipitado fue casi nula; sólo una pequeña fracción de muestras presentó un cambio respecto a la tonalidad inicial (Figura N°2). Estos resultados infieren que la mayoría de las especies estudiadas exhiben alcaloides de mediana a alta polaridad, típico de especies que se encuentran en etapa de crecimiento (García, 2003). Vale la pena señalar que además del átomo de nitrógeno presente en los alcaloides, estos compuestos también pueden contener átomos de carbono en diferentes estados de oxidación los cuales le confieren polaridad a dichas moléculas (Harborne, 1993).

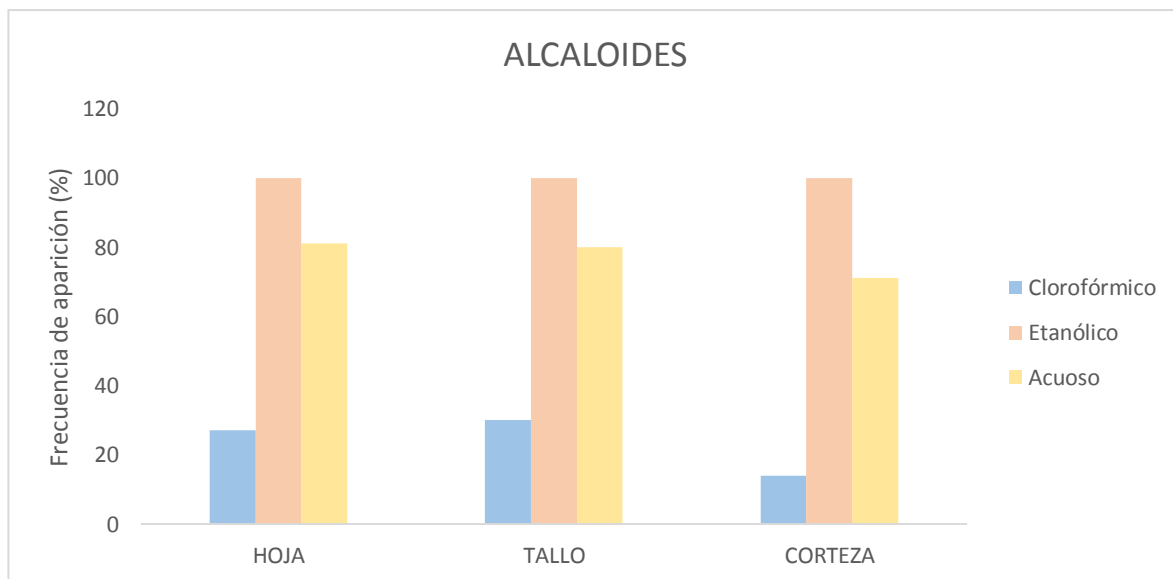


Figura N°2. Frecuencia de detección de alcaloides según el tipo de extracto.

Los alcaloides también se han encontrado en árboles de uso forrajero, de forma general en plantas dicotiledóneas (Ramos *et al.*, 1998) y especialmente en leguminosas forrajeras del género *Erythrina* (Sotelo *et al.*, 1996). La elevada presencia de alcaloides de las arvenses estudiadas sugiere que quizás estos compuestos jueguen un papel ecofisiológico importante en el éxito de sobrevivencia de dichas especies en los ecosistemas de Chile; considerando que muchos alcaloides de arbustivas y herbáceas se han reportado como compuestos con fuerte actividad alelopática y repelente de otras especies vegetales (Carey y Wink, 1994; Sotelo *et al.*, 1996; García, 2003).

4.2. Fenoles

El reactivo FeCl_3 (1%) produce una coloración negra en los extractos de muestras con presencia de fenoles. La mayoría de los ensayos realizados fueron positivos, aún más en los extractos acuosos, alcanzando niveles superiores al 80% de

frecuencia de aparición (Figura N°3). Combinando los resultados de ambos extractos (acuoso y etanólico) se constató un 100% de ensayos positivos en la corteza, lo que sugiere que los fenoles pueden tener una función de defensa contra especies de herbívoros e insectos depredadores en dichas especies leñosas. Adicionalmente, la coloración negra resultante de los ensayos positivos, es una de las características de los extractos que contienen una amplia diversidad de estructuras hidroxiladas (Sung-Suk *et al.*, 2000).

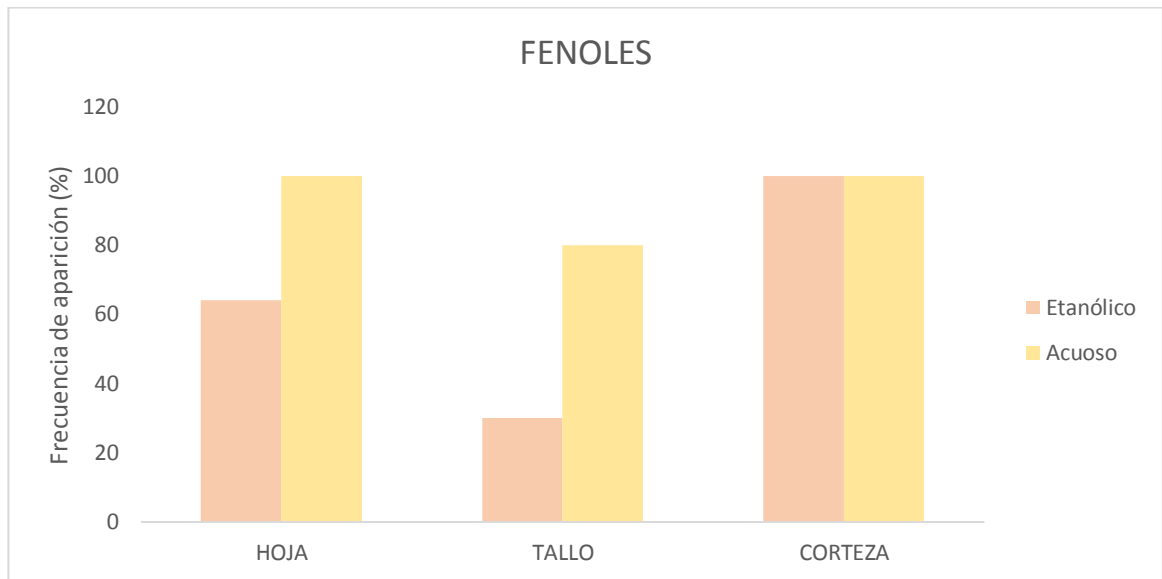


Figura N°3. Frecuencia de aparición de fenoles acorde al tipo de extracto.

Los tejidos vegetales son ricos en una amplia variedad de polifenoles (Rice-Evans *et al.*, 1997), según esta afirmación, la corteza contiene gran diversidad de este grupo de metabolitos secundarios, lo cual en sentido general se traduce en un fuerte carácter antioxidante, antinutricional y repelente; dependiendo de los tipos de fenoles que se puedan encontrar en dicha parte de la planta.

En este sentido, considerando la solubilidad de cada fracción, los resultados sugieren que los fenoles presentes en las hojas y los tallos de las especies estudiadas son de bajo peso molecular; ya que es conocido la mayor solubilidad de fenoles de mediana y elevado peso molecular en solventes tales como etanol y propanol.

Sin embargo, los fenoles presentes en las cortezas estudiadas pudieron ser de tipo oligómero/polímero de flavonoides (taninos condensados), los cuales exhiben mayor afinidad por etanol, en comparación con el agua (García, 2003). No obstante, ensayos adicionales tales como análisis por cromatografía de exclusión molecular y resonancia magnética nuclear deben ser realizados, con el objetivo de dilucidar la naturaleza de estos compuestos.

4.3. Taninos

Este grupo de metabolitos puede presentar varios tipos de funcionalidades en su estructura, lo cual lo hace una macromolécula con un peso molecular considerable (Makkar y Becker, 1999; García, 2003). El análisis consiste en una precipitación con proteínas (gelatina 10%) y la formación de turbidez en la muestra, en caso de resultados positivos (Makkar y Becker, 1999).

Los taninos fueron detectados en mayor abundancia en el extracto acuoso para hojas y tallos, esto se pudo constatar mediante la rápida turbidez generada y un instantáneo cambio de color, el cual; no fue tan notable en el extracto etanólico (Figura N°4). Sin embargo, más del 50% de las muestras analizadas exhibieron resultados positivos.

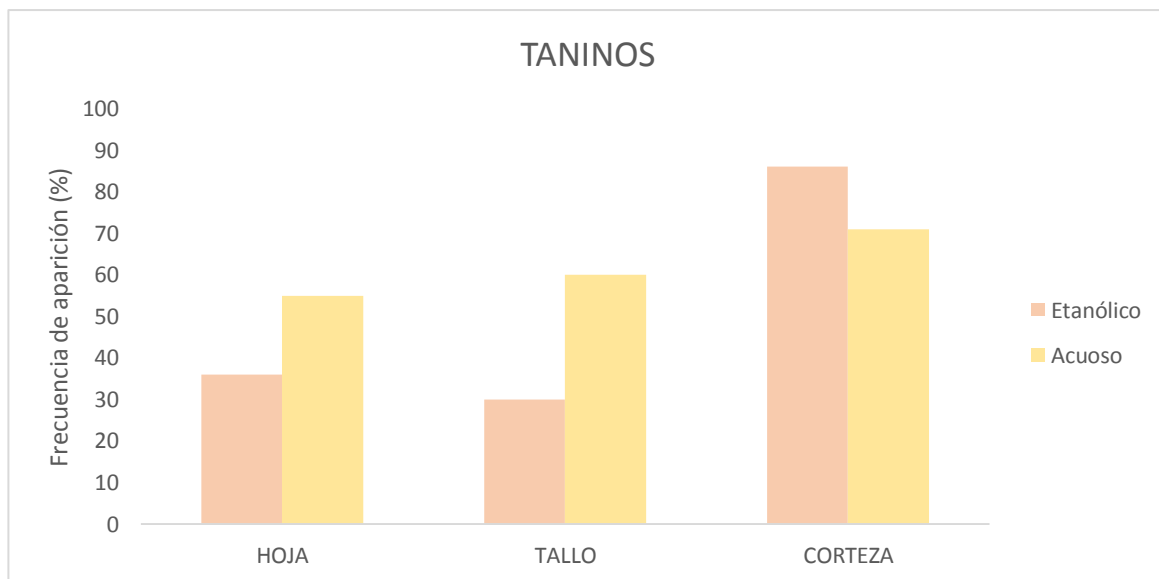


Figura N°4. Frecuencia de aparición de taninos acorde al tipo de extracto.

Por otra parte, es bien conocido la función repelente y alelopática que tienen los taninos que precipitan proteínas en los ecosistemas (Boros *et al.*, 2010); lo cual enfatiza que este grupo de compuestos debe ser estudiado a profundidad para identificar una posible utilización de la biomasa tánica, considerando que muchas de las especies estudiadas no son identificadas convencionalmente como plantas con elevado contenido de taninos en Chile.

Con respecto a la solubilidad, los resultados confirman las tendencias observadas en el caso del análisis de los fenoles; por lo que probablemente existe una fracción de polifenoles de menor peso molecular en las hojas y los tallos, mientras que en la corteza aparentemente se concentra una mayor fracción de taninos de medio o elevado peso molecular.

4.4. Flavonoides

Los ensayos oscilaron desde coloraciones rosadas tenues hasta tonos rojos intensos. Así mismo, algunas muestras formaron una tonalidad amarilla muy clara.

Los flavonoides contienen en su estructura grupos fenólicos en los anillos A y B, por lo que encontrar altos niveles de flavonoides en la corteza sugiere inequívocamente la presencia de flavonoides libres y taninos condensados (poliflavonoides) en esta parte de la planta (Figura N°5).

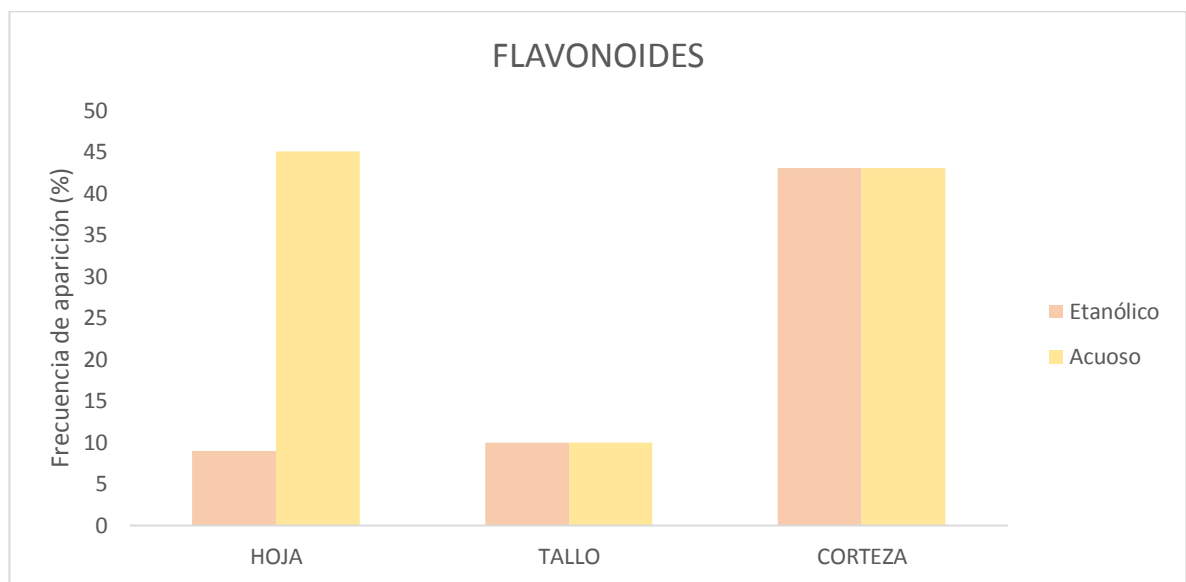


Figura N°5. Frecuencia de aparición de flavonoides acorde al tipo de extracto.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental y le herbivoría (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Según lo reportado en numerosas investigaciones, los flavonoides se encuentran en la corteza para dar protección integral a las plantas leñosas; independientemente de su clasificación taxonómica, hábitat y condiciones

edafoclimáticas (Stafford, 1997; Croteau *et al.*, 2000; Segler, 2001; Martínez-Flores *et al.*, 2002).

4.5. Carbohidratos

Las azúcares presentaron una alta presencia en hojas y corteza (Figura N°6). La diferencia más clara se observó al comparar los resultados obtenidos en los extractos etanólicos y acuoso para los tallos; donde se nota una afinidad de los carbohidratos por el medio acuoso. Estos resultados ponen de manifiesto que los sacáridos presentes en dicha biomasa son de bajo peso molecular y no polisacáridos tipo almidón (García, 2003), los cuales presentan mayor afinidad por otro tipo de solventes de menor polaridad que el agua (Holloway y Jeffree, 2004).

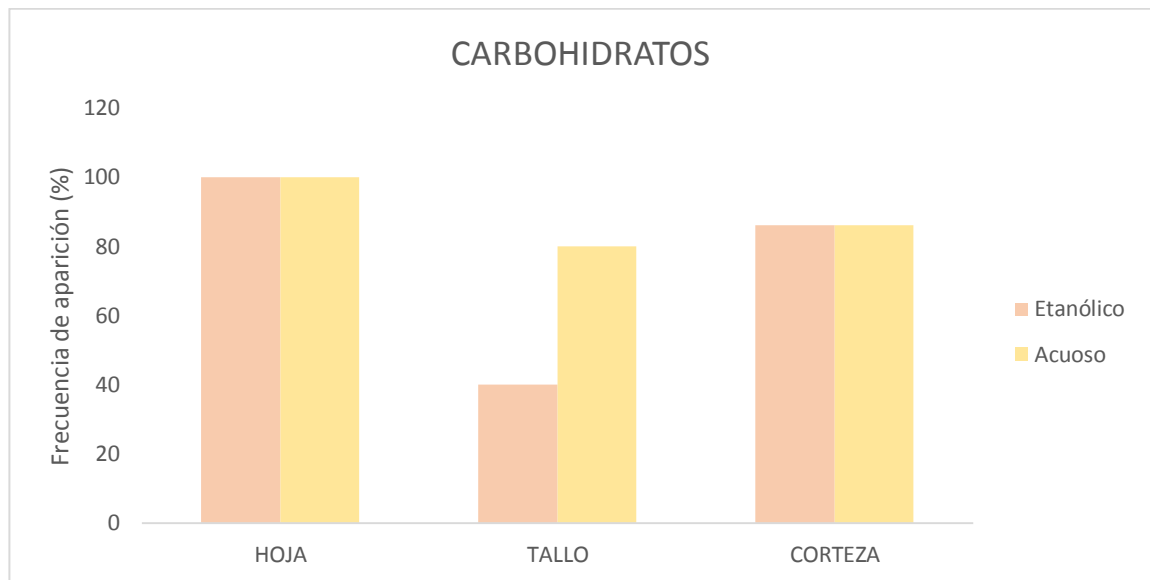


Figura N°6. Frecuencia de aparición de carbohidratos acorde al tipo de extracto.

Las cortezas en conjunto con las hojas exhiben la mayor frecuencia de aparición de azúcares debido a que los procesos metabólicos de órganos aéreos, así como la pared celular, necesitan de estos carbohidratos para su funcionamiento efectivo

y sostén estructural, respectivamente. Adicionalmente, la biomasa fotosintetizadora contiene la mayor cantidad de azúcares en las plantas vasculares (Pistelli, 2002). Este resultado es esperado, considerando que las azúcares de bajo peso molecular son el principal producto de la biosíntesis en las plantas superiores (Panter *et al.*, 2007).

4.6. Metabolitos pertenecientes a otras funcionalidades

Los siguientes grupos de metabolitos sólo se pueden encontrar en un tipo de extracto, debido a las características de polaridad de cada uno de ellos (Figura N°7).

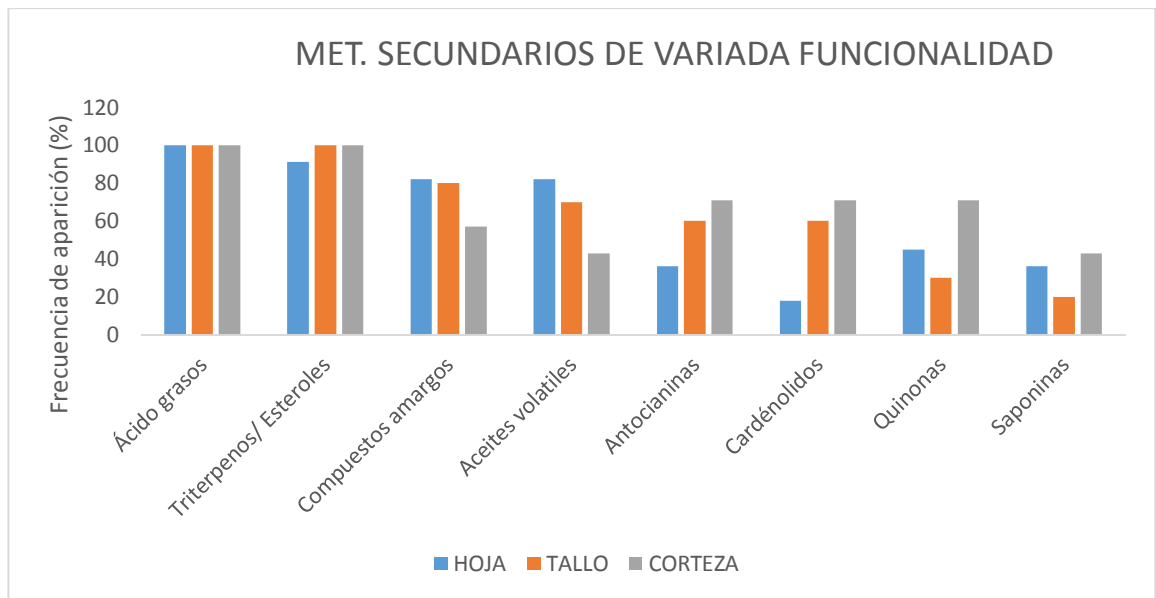


Figura N°7. Frecuencia de aparición de metabolitos secundarios acorde a su funcionalidad.

Cada uno de los grupos de metabolitos se presenta en diferente frecuencia, dependiendo de la función que desempeñan en la especie y el estatus metabólico de la planta en el momento del muestreo.

Los ácidos grasos se detectaron en un 100% en las muestras, lo cual indica que estos compuestos son comunes para todas las especies estudiadas y no producen diferenciación en el perfil fitoquímico de las arvenses. Este resultado es esperado, considerando que la mayoría de los ácidos grasos son metabolitos primarios en las plantas superiores (García, 2003; Langenheim, 2003; Holloway y Jeffrey, 2004).

Los triterpenos/esteroles se detectan mediante el reactivo de Liberman-Buchard; la coloración azul o amarilla indica si es uno o el otro grupo de compuestos, respectivamente. La mayoría de las muestras presentan un color verde-azul, por lo que se sugiere presencia combinada de esteroides y terpenos. La elevada frecuencia de aparición de esteroides es bien conocida, ya que estos compuestos se encuentran toda la biomasa que se encuentra en constante crecimiento (Ives, 2003). La mayoría de los esteroides vegetales son hormonas fitoregulatoras que participan en numerosos procesos metabólicos (Jarvis, 2000; Ives, 2003). En tal sentido, esta fracción poco polar debe ser estudiada con mayor profundidad para establecer posible bioactividad asociada a la presencia de estos grupos de compuestos.

Los compuestos amargos se detectan en mayor abundancia que los aceites volátiles en las malezas; ya que éstas necesitan de forma más efectiva un agente defensivo en sus tejidos que tenga algún olor o sabor específico. Las especies leguminosas *L. arboreus* y *T. monspessulana* tienen un sabor muy amargo; mientras que el helecho (*C. maculatum*) exhibió un aroma más desagradable que

el resto de las especies; a estos resultados se arribó mediante un ensayo organoléptico.

Los aceites volátiles estuvieron presentes en una mediana frecuencia; estos se detectaron mediante el olfato, al secar los tubos de ensayo que contenían las muestras en cloroformo; el cual fue previamente evaporado. En sentido general, estos compuestos tienen un olor penetrante que puede influir en la aceptabilidad o repelencia hacia especies de animales que habitan en el mismo ecosistema (Jarvis, 2000).

Las antocianinas se analizan mediante gotas de H_2SO_4 y calentamiento en baño María por 10 minutos. Las cortezas presentaron mayor cantidad de estos compuestos (biomasa de acacia y aroma, tanto joven como adulto). Debido a su condición de polifenol se realizaron posteriormente ensayos de cuantificación, con vista a profundizar en la caracterización de la fracción de fenoles.

Por su parte, los cardenólidos se analizan sobre papel de filtro, donde se agrega la muestra más el reactivo de Kedde (el papel se decolora a rosado); mientras que las quinonas se detectaron mediante un ensayo de óxido-reducción. La importancia de la baja frecuencia de aparición en las especies arvenses es positiva ya que estos compuestos son considerados factores antinutricionales para animales y humanos (Herl *et al.*, 2005). En este sentido, la poca presencia tanto de cardenólidos, quinonas y saponinas avizora un uso potencial de la biomasa como fuente de compuestos químicos beneficiosos tanto para animales y humanos; sin embargo, se debe conocer con antelación los niveles en los que se encuentran los compuestos mayoritarios con el fin de sugerir su uso.

Por otra parte, es de esperar que las quinonas sean abundantes en la corteza, ya que conforman un gran número de estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas que se encuentran asociadas a compuestos polifenólicos en una gran variedad de plantas (Van Gorkom *et al.*, 2000).

Otro punto a destacar son los resultados obtenidos en las pruebas de detección de las saponinas. Las saponinas se analizan mediante agitación en tubo de ensayo para medir la altura de la espuma por 30 minutos. Sólo el aroma generó espuma persistente (altura: 1,5 cm); lo cual se estima como un bajo contenido. Así mismo, en las especies arvenses se observó un bajo índice; lo cual nos sugiere que estas especies no usan sapotoxinas como medio de defensa (Macías *et al.*, 1999).

4.7. Metabolitos no detectados

Cuatro grupos de metabolitos secundarios no fueron detectados en ningún caso.

Considerando la alta toxicidad de la cumarinas es una ventaja su ausencia en las especies arvenses con el fin de su uso en la alimentación. Sin embargo, esto puede ser catalogado como una desventaja debido a que el presente estudio se enfoca en encontrar metabolitos con actividad biológica alelopática (muchas cumarinas son repelentes). Adicionalmente, la importancia de las cumarinas se evidencian en el campo farmacológico, en el que destaca cada vez más el núcleo cumarínico en la terapia anti-cáncer (Riveiro *et al.*, 2008; Belluti *et al.*, 2010); así como es el desarrollo de numerosas formulaciones utilizadas en la agricultura.

En otro orden, el papel de picrato utilizado para identificar cianógenos no mostró decoloración en su tonalidad amarilla luego de esperar 15 minutos a baño María.

Los cianógenos conforman una parte importante de compuestos involucrados en el mecanismo de defensa contra depredadores. Estas plantas contienen altas cantidades de glicósidos cianogénicos que son los causantes de la intoxicación por liberación de ácido cianhídrico (HCN) (Larcher, 2003).

Conociendo la capacidad tóxica de los cianógenos, ocurre algo similar que la reflexión realizada para el caso de las cumarinas. Para el fin del presente estudio es una desventaja no haber identificado este grupo de compuestos por su carácter alelopático y repelente de insectos y animales. Sin embargo, también constituye una ventaja que las especies no presenten este metabolito por su alta toxicidad en humanos.

En este sentido, parecería evidente la propuesta de dos estrategias de aprovechamiento de la biomasa encaminadas a: (1) el desarrollo de extractos potenciales con actividad herbicida e insecticida y (2) la formulación de extractos de plantas no tóxicas para su uso como medicina o como aditivo nutricional.

Por otra parte, los carotenos fueron analizados en una placa de porcelana donde se agregaban gotas del reactivo de Carr-Price, el cual crea una turbidez en las muestras. La principal función biológica de los carotenoides es la de servir como pigmentos accesorios en la recolección de la luz durante el proceso fotosintético, y como sustancias fotoprotectoras; inhibiendo la propagación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, por tanto impidiendo la acción nociva de éstos a nivel celular (Graham y Rosser, 2000). Las implicancias asociadas a la ausencia de carotenos en las especies estudiadas no son significativas para los objetivos de la presente investigación.

Los mucílagos se localizan como material de reserva hidrocarbonada y de agua en plantas o como elementos estructurales en vegetales inferiores (algas), proporcionándoles elasticidad y suavidad. Estos compuestos se encuentran como una sustancia viscosa. A simple vista ninguna de las muestras estudiadas presentó dicha característica.

Según lo explicado para mucílagos y carotenos, estos dos grupos de metabolitos no tienen una alta repercusión en el marco de este estudio.

5. Análisis de agrupación en las pruebas cualitativas

Los resultados fitoquímicos se procesaron mediante análisis de clasificación automática (cluster), el cual define cuales de las especies estudiadas presentan un perfil similar en términos de grupos de metabolitos (Figura N°8).

En general, los dendogramas muestran la formación de dos grandes agrupaciones. Las hojas del Conium y Pino (mantillo) son las biomásas menos parecidas químicamente; mientras que tanto la biomasa joven como adulta de Pino, Acacia y Aromo exhiben una composición fitoquímica similar entre sí.

El dendograma del análisis efectuado con los datos obtenidos de las hojas denota claramente como las especies arbustivas y herbáceas se agrupan en un cluster en particular, mientras que los árboles se sitúan en otro conglomerado. Sin embargo, el Acacio y el Aromo también aparecen situados en el grupo de los arbustos (ambas en estado adulto); lo cual refleja un cambio en la composición de metabolitos mientras éstas se encuentran en la etapa de crecimiento.

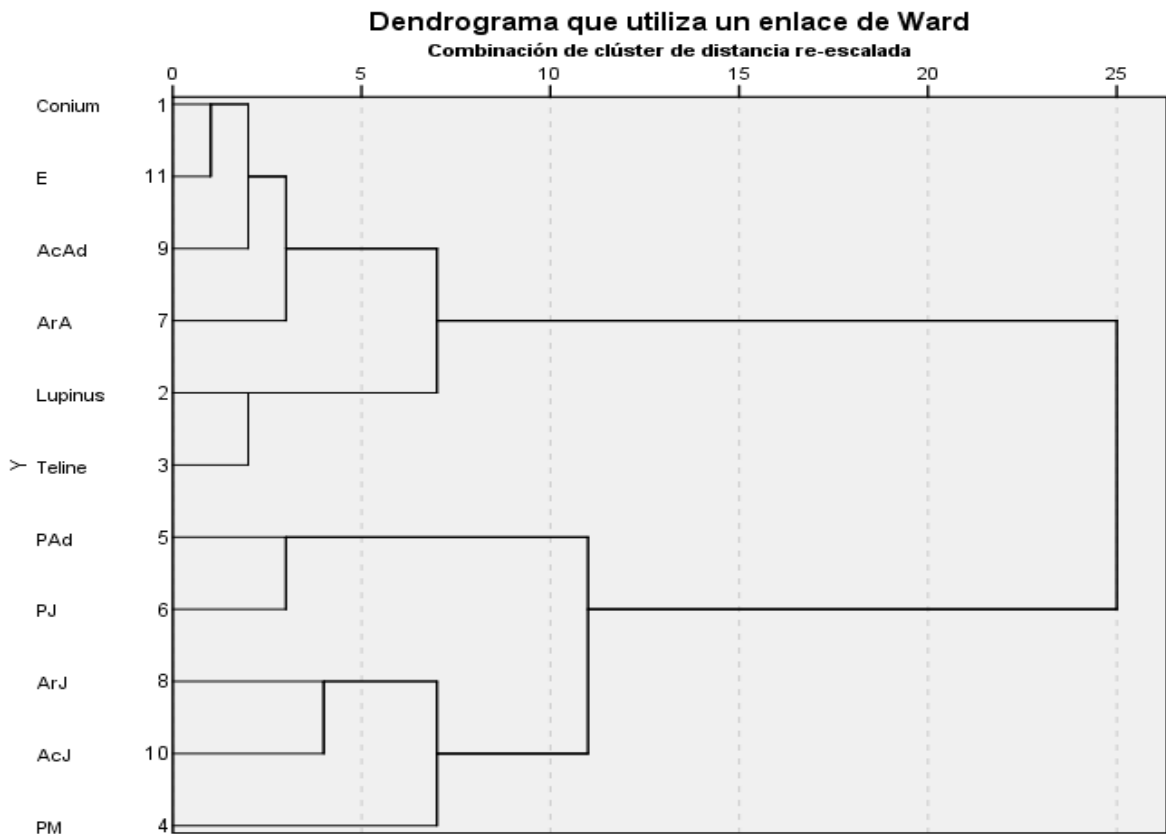


Figura N°8. Dendrogramas que muestran la similitud de los patrones fitoquímicos de las plantas estudiadas, considerando los metabolitos mayoritarios en hojas.

(E: espinillo; AcAd: Acacia adulto; ArA: Aromo adulto; PAd: Pino adulto; PJ: Pino joven; ArJ: Aromo joven; AcJ: Acacia adulto; PM: Pino mantillo).

Los resultados de los análisis desarrollados con los resultados obtenidos en los tallos muestran una mejor separación de patrones fitoquímicos entre los árboles y las hierbas; ya que existen notables diferencias de metabolitos entre ellos. El aromo adulto y el Conium son los menos parecidos desde el punto de vista fitoquímico.

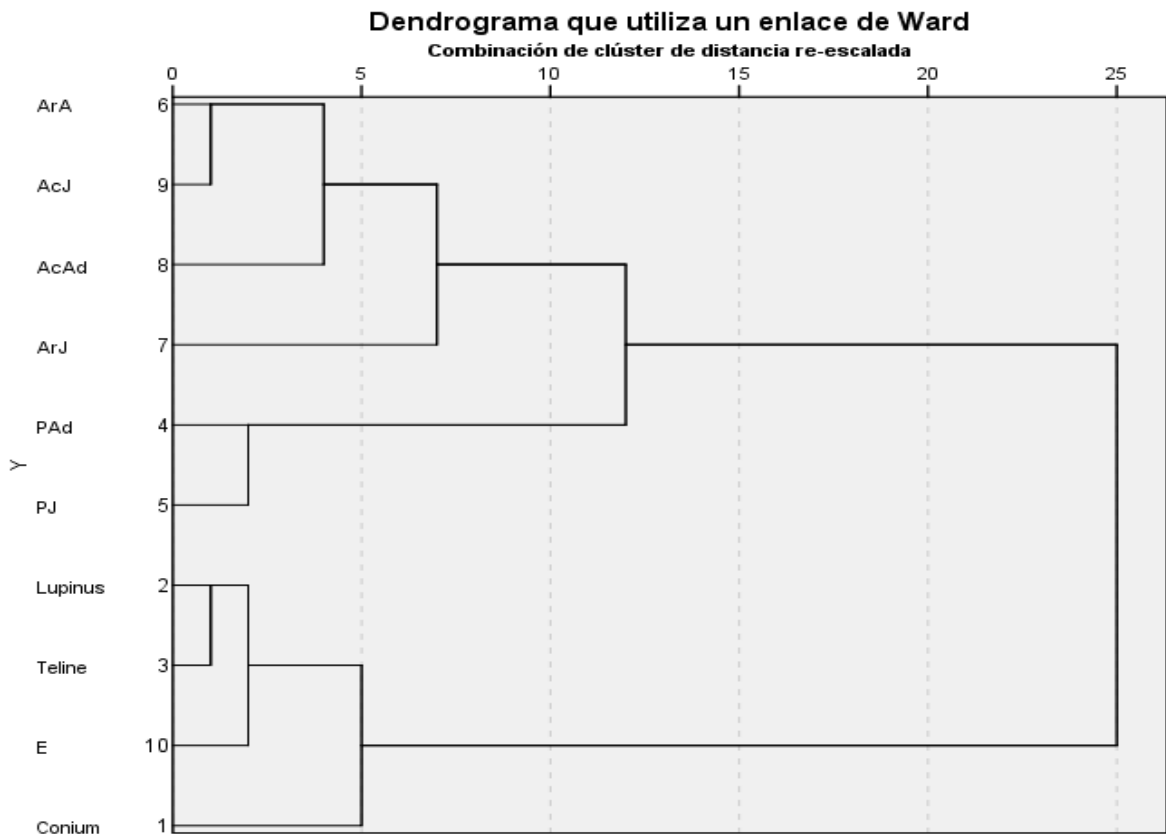


Figura N°9. Dendrogramas que muestran la similitud de los patrones fitoquímicos de las plantas estudiadas, considerando los metabolitos mayoritarios en tallos.

(ArA: Aromo adulto; AcJ: Acacia adulto; AcAd: Acacia adulto; ArJ: Aromo joven; PAd: Pino adulto; PJ: Pino joven; E: Espinillo).

Los resultados del análisis efectuado en las cortezas describe que el pino joven y el pino adulto se encuentran separados en cada extremo del dendrograma (son las dos muestras más desiguales fitoquímicamente); mientras que las muestras de aromo y acacia están presentes en la misma rama (tanto jóvenes como adultos). Este último resultado describe que las últimas especies no muestran diferencias sustanciales de metabolitos a medida que crecen. Sin embargo, la notable diferencia en la composición cualitativa de metabolitos para el Pino sugiere

cambios sustanciales en la composición de la corteza durante el crecimiento. Este resultado es coherente con los reportes que describen que la corteza proveniente de árboles adultos de Pino (mayor a 14 años) contiene una fracción importante de extractivos (Chiapusio *et al.*, 2004).

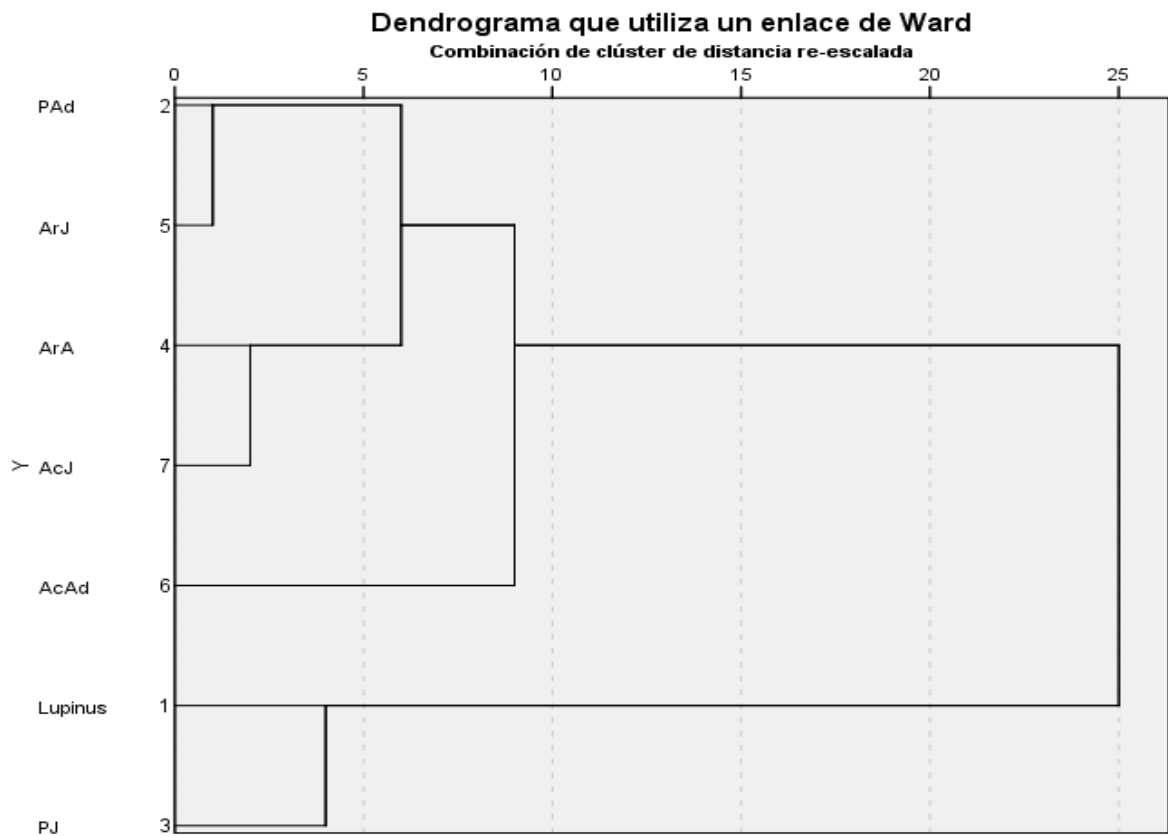


Figura N°10. Dendrogramas que muestran la similitud de los patrones fitoquímicos de las plantas estudiadas, considerando los metabolitos mayoritarios en corteza.

(PAd: Pino adulto; ArJ: Aromo joven; ArA: Aromo adulto; AcJ: Acacia joven; AcAd: Acacia adulto; PJ: Pino joven).

6. Análisis Cuantitativo

El interés final de este estudio hace centrar el enfoque en el efecto potencial que se pueda encontrar en los extractos de las plantas estudiadas, es por esto que se cuantifican los niveles de los alcaloides, fenoles y proantocianidinas (taninos); como compuestos de elevada abundancia y representatividad en la biomasa.

6.1. Alcaloides totales

Una gran cantidad de alcaloides de carácter farmacológico han sido encontrados en múltiples plantas, su cuantificación genera importantes descubrimientos sobre la estructura molecular y su comportamiento alelopático (Gizasa y Souto, 2001).

Para su cuantificación mediante gravimetría se requiere el uso de una curva de calibración a partir de un alcaloide patrón; la Matrina, un herbicida natural de uso comercial (figura 6).

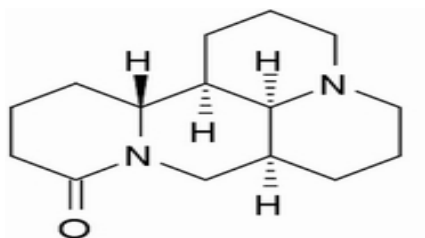
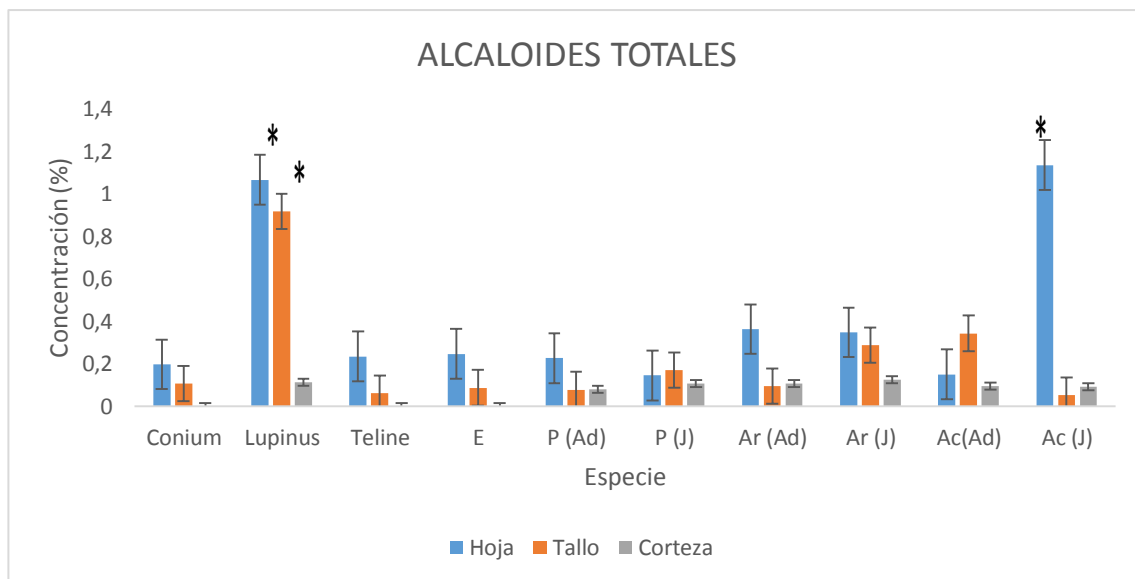


Figura N°11. Estructura química de la Matrina (herbicida natural utilizado para desarrollar la curva patrón).

La figura N°12 muestra los niveles de alcaloides de las muestras estudiadas.



* Diferencias significativas a $P < 0,05$.

(E: Espinillo; P(Ad): Pino adulto; P(J): Pino joven; Ar(Ad): Aromo adulto; Ar(J): Aromo joven; Ac(Ad): Acacia adulto; Ac(J): Acacia joven).

Figura N°12: Concentración de alcaloides totales en hojas, tallos y corteza de especies arvenses en Chile.

En hojas, la especie Acacia (joven) y Lupinus exhiben los valores máximos de alcaloides, seguido por el Aromo. En los tallos, la tendencia se dirige a Lupinus, el aromo joven y la acacia adulta. Por otra parte, según los resultados obtenidos en la corteza, los valores pueden ser catalogados como muy bajos. En sentido general, las especies leñosas no mostraron diferencias considerables con respecto al contenido de alcaloides de hojas y tallos.

Vale la pena destacar que la mayor fracción de alcaloides se observó en las especies leguminosas, lo cual enfatiza la importancia de estos compuestos en dicha familia botánica (Sotelo *et al.*, 1996; García, 2003).

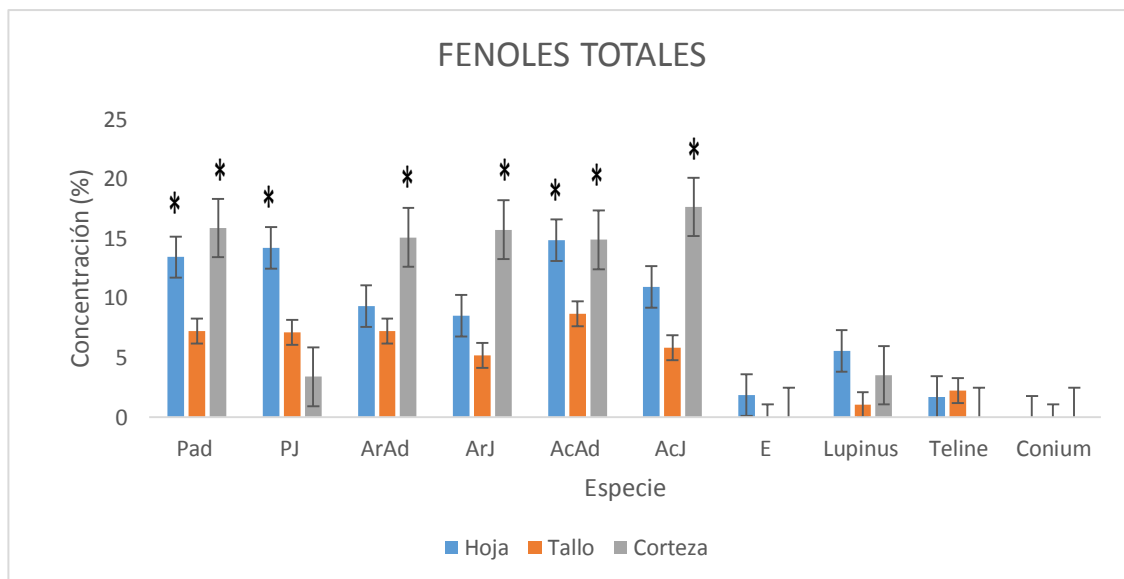
Otra particularidad notable que debe señalarse consiste en que los mayores niveles de alcaloides se encontraron en las hojas; mientras que los valores en los tallos y en la corteza fueron bajos. Estos resultados exhortan a la realización de estudios más exhaustivos para conocer la naturaleza de la fracción alcaloidal de estas plantas; aún cuando es conocido que la parte aérea y los frutos constituyen en general la principal fuente de alcaloides (Sotelo *et al.*, 1996).

Un aspecto que llama la atención es la elevada concentración de alcaloides en las hojas jóvenes de Acacia. Este resultado no ha sido previamente reportado en la literatura científica y propone el desarrollo de ensayos complementarios para analizar la fracción alcaloidal de dicha planta.

6.2. Fenoles totales

Los niveles de fenoles fueron elevados particularmente en la corteza; por lo que se deduce que la mayoría de los metabolitos se presentan como parte de defensa química de las especies leñosas (pino, aromo y acacia), tanto en la biomasa adulta como joven.

Las especies Espinillo, Lupinus, Teline y Conium no presentan valores altos de fenoles. De hecho, tres de las especies estudiadas tienen muy baja concentración (Figura N°13). Los fenoles como es bien conocido forman parte importante de los sistemas bioquímicos de protección; al parecer estas malezas carecen de polifenoles y se especializan en desarrollar otro tipos de metabolitos secundarios, tales como alcaloides y esteroides, como estrategia evolutiva.



* Diferencias significativas a $P < 0,05$.

(Pad: Pino adulto; PJ: Pino joven; ArAd: Aromo adulto; ArJ: Aromo joven; AcAd: Acacia adulto; AcJ: Acacia joven; E: Espinillo).

Figura N°13: Concentración de fenoles totales en hoja, tallo y corteza de especie arvenses en Chile.

Molgaard *et al.*, (2011) estudio el efecto antimicrobiano de extractos de plantas nativas de Chile donde se estudiaron 40 especies de plantas chilenas utilizadas para el tratamiento de heridas e infecciones, asociadas a la medicina natural del pueblo Huilliche. Su efecto antimicrobiano fue evaluado contra los hongos *Penicillium expansum*, *Candida albicans* y las bacterias *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pneumoniae*. Los resultados obtenidos indicaron que 13 de las especies de plantas evaluadas presentaron actividad antimicrobiana, entre ellas destacan: *Acaena argentea* (Cadillo), *Aristotelia chilensis* (Quélón), *Blechnum chilense* (Costilla de vaca),

Francoa appendiculata (Palqui), *Gevuina avellana* (Avellana) y *Laureliopsis philippiana* (Laurel).

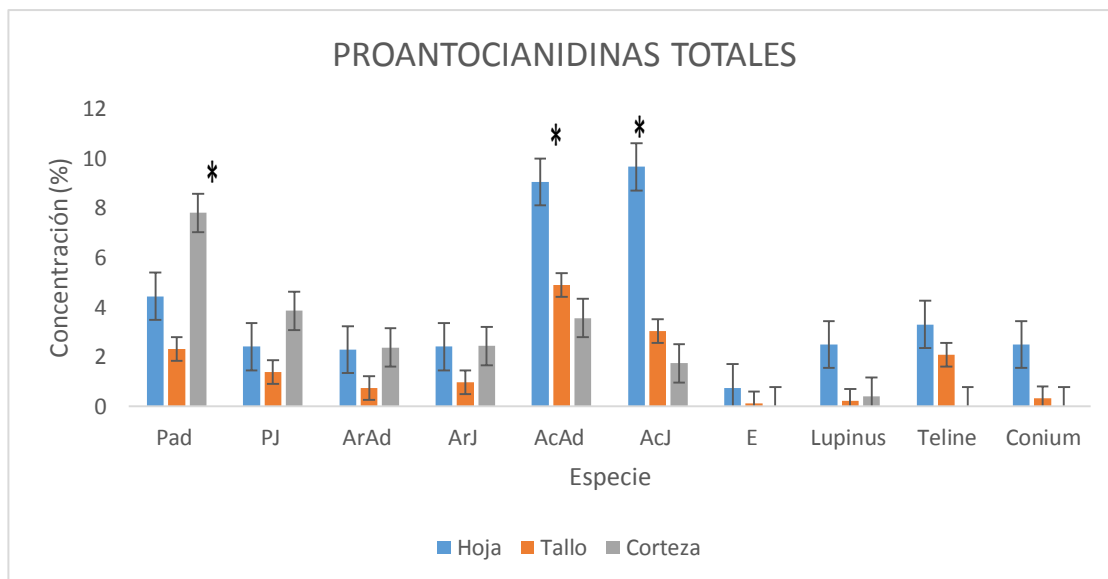
Por su parte, Ocares (2012) seleccionó 13 especies de plantas nativas que crecen entre la VII y IX región de Chile, con el objetivo de evaluar su capacidad antagonista frente a cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*; donde concluyó que los tres extractos que presentaron mayor efecto antimicrobiano en la prueba de inhibición en placa fueron los extractos metanólicos de las especies de Lingue (*Persea lingue*), Ñirre (*Nothofagus antártica*) y Picha (*Myrceugenia planipes*).

Además, se han encontrado compuesto fenólicos en semillas de chía (*Salvia hispanica L.*) (Tosco, 2004), en especies de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunt) (ruiz *et al.*, 2005), en la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) (Olvera-García, 2003). En términos cuantitativos, contenidos de fenoles totales inferiores al 5% son considerados moderados para especies vegetales. Sin embargo, plantas con contenido superiores son catalogados como de elevada fracción fenólica (García, 2003). En sentido general, todas las biomásas provenientes de las especies leñosas exhibieron valores superiores al 5%, lo cual enfoca el interés en efectuar un estudio más profundo posteriormente.

6.3. Proantocianidinas totales (taninos condensados)

El máximo valor de proantocianidinas se observó en la hoja joven de acacia, seguido por la hoja adulta. El tercer valor más alto lo tuvo la corteza de Pino adulto. Las especies arbustivas no presentan valores de proantocianidinas considerables. La biomasa de Acacio presenta los resultados más sobresalientes con respecto a la cuantificación de proantocianidinas (Figura N°14).

Las proantocianidinas son sintetizadas por las plantas principalmente en respuesta a un estrés o agresión externa como pueden ser periodos prolongados de sequía, alta radiación ultravioleta o como defensa contra un herbívoro o infección por agentes patógenos. Por lo tanto, la presencia de estos compuestos es muy variada dependiendo de múltiples factores tanto intrínsecos de la planta (especie, procedencia, variedad o partes vegetales) o extrínsecos como la intensidad lumínica, la temperatura, la maduración y la zona de cultivo (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2012). Según lo citado, las especies en las que se observa bajo contenido de proantocianidinas no debería encontrarse bajo estrés inducido o en su defecto no constan con este grupo de metabolito como estrategia de defensa.



* Diferencias significativas a $P < 0,05$.

(Pad: Pino adulto; PJ: Pino joven; ArAd: Aromo adulto; ArJ: Aromo joven; AcAd: Acacia adulto; AcJ: Acacia joven; E: Espinillo).

Figura N°14: Concentración de proantocianidina (tanino condensado) en hoja, tallo y corteza de especies arvenses en Chile.

Vale la pena destacar que la mayor fracción polifenólica se detectó en la corteza de las especies leñosas. Sin embargo, las especies de Acacia exhibieron concentraciones de polifenoles en la biomasa comparable, y en algunos casos superiores, a las de Pino; especie de conífera catalogada como una de las de mayor contenido de polifenoles en Chile. Estos resultados describen la factibilidad de estudiar y aprovechar los taninos condensados presentes en *A. dealbata* y *A. melanoxylon* como alternativas al uso tradicional de tanino condensado de corteza de Pino radiata en Chile.

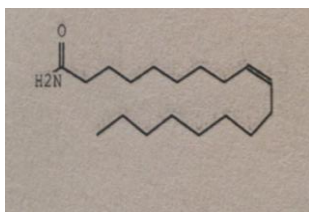
7. Análisis cromatográfico del extracto alcaloidal (GC-MS)

Los resultados muestran un alcaloide mayoritario entre las especies estudiadas, la Lupanina, un compuesto comúnmente encontrado en otras malezas y especies arbóreas y arbustivas, fue detectado en la mayoría de los casos (Figura 7). La tabla N°5 muestra las particularidades del análisis.

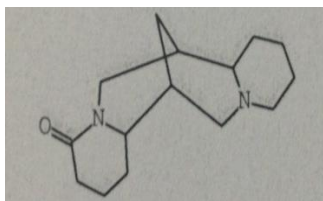
Tabla N°5: Resultado del análisis cromatográfico (GC-MS) de extractos alcaloidales acuosos de arvenses Chilenas.

Especies	Tiempo ret. (min)	Área	Altura	A/H	% total	Compuesto Mayoritario
Espinillo (tallo)	11,750	1.514.655	473,7	3.20	100	Lupanina
Teline (hoja)	10,167	4.648.008	1.089,0	4.27	100	N-(2-Acetilciclopentilideno) ciclohexilamina
Lupinus (hoja)	11,817	109.873.873	32.146,1	3.42	99,68	Lupanina
Lupinus (corteza)	11,767	14.125.410	5.622,7	2.51	100	Lupanina
Lupinus (tallo)	11,775	51.276.586	19.435,0	2.64	98,3	Sophocarpina
Aromo (Ad hoja)	15,983	341062	17.969,0	1.90	100	9-Octadecenamida (Z)
Acacio (J hoja)	11,750	2.104.096	666,1	3.16	100	Lupanina

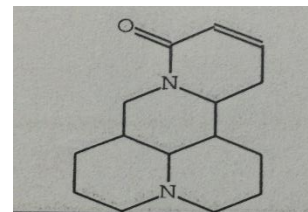
Ad: Adulto; J: Joven.



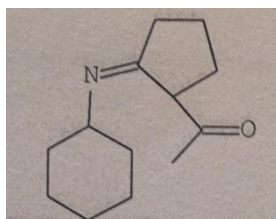
9-octadecanamida



Lupanina



Sofocarpina



N-(2-Acetylciclopentilideno) ciclohexilamina

Figura N°15. Estructura de alcaloides detectados en arvenses chilenas por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La Lupanina se encuentra mayoritariamente en plantas del género *Lupinus*, representa un importante compuesto químico de defensa contra microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos), y contra otras especies de plantas que causan competencia, además de poseer actividad antifúngica (Knecht *et al.*, 2006).

Según investigaciones de Zamora-Natera *et al.* (2005), se determinó la composición y concentración de alcaloides en semillas de *Lupinus exaltus* Zucc, donde hallaron la Lupanina en tallos, hojas, frutos y flores; concluyendo que este alcaloide se encontraba en mayor abundancia en los frutos, por lo que, al considerar los frutos como órganos de alto valor nutricional existe un riesgo de intoxicación al utilizar *L. exaltus* como forraje en las etapas de desarrollo de vainas

y fructificación debido al alto contenido de alcaloides totales y mayor abundancia de Lupanina en estas estructuras reproductivas.

Mediante dicho estudio se logró comprobar que la Lupanina es más activa y su acción farmacológica es inmediata en comparación con la Esparteína, debido a que la primera se difunde más rápidamente a través de las membranas biológicas, y la duración de la actividad es más corta que la Esparteína. Esto demuestra que dichos alcaloides puro, o en forma de sales (clorhidratos y sulfatos), administrados en dosis altas actúan como tóxicos, pero cuando se administran en dosis moderadas actúan como medicamento (Sotelo *et al.*, 1996; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Knecht *et al.*, 2006).

Por su parte, se han realizado estudios que revelan el efecto somnífero del alcaloide 9-octadecanamida en 7 especies de plantas medicinales peruanas y su capacidad antioxidante; mediante la evaluación de veintinueve extractos de las siguientes especies vegetales: *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Calophyllum brasiliense* (lagarto caspi), *Myrciaria dubia* (camu camu), *Minthostachys mollis* (muña), *Alchornea castaneifolia* (hiporuro), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Lepidium peruvianum* y *Lepidium meyenii* (maca), por el método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Zhao *et al.*, 2005; Castañeda *et al.*, 2008; Cravatt *et al.*, 2009).

A la luz de estos antecedentes los resultados son alentadores, considerando el objetivo final de la presente investigación. En este sentido, extractos polares, o en su defecto extractos acuosos de alcaloides de las especies arvenses estudiadas pudieran ser nocivos para el crecimiento de plantas indeseables en condición de

cultivo controlado o en situación comercial. Sin embargo, los bioensayos de germinación y crecimiento, o en su defecto los ensayos de citotoxicidad son la vía más adecuada para aclarar el potencial de los alcaloides y de compuestos fenólicos sobre la fitoregulación (Foo *et al.*, 1997; Ghasempour *et al.*, 1998; Jarvis, 2000; García, 2003).

8. Bioensayo de germinación y crecimiento

Las pruebas para la evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento de plantas modelos resulta de gran utilidad en vista a visualizar potenciales usos en áreas relacionadas con la agricultura y la conservación de los recursos naturales. De esta manera, se pueden identificar preliminarmente extractos o componentes con efecto alelopático, potencialmente utilizables para el control de malezas.

8.1. Prueba de germinación

En este sentido, los extractos acuosos de metabolitos secundarios polares provenientes de las especies en estudio (hojas adultas utilizadas para el bioensayo) mostraron un efecto inhibitor de la germinación del perejil, independientemente de la concentración del extracto (Figura N°16).

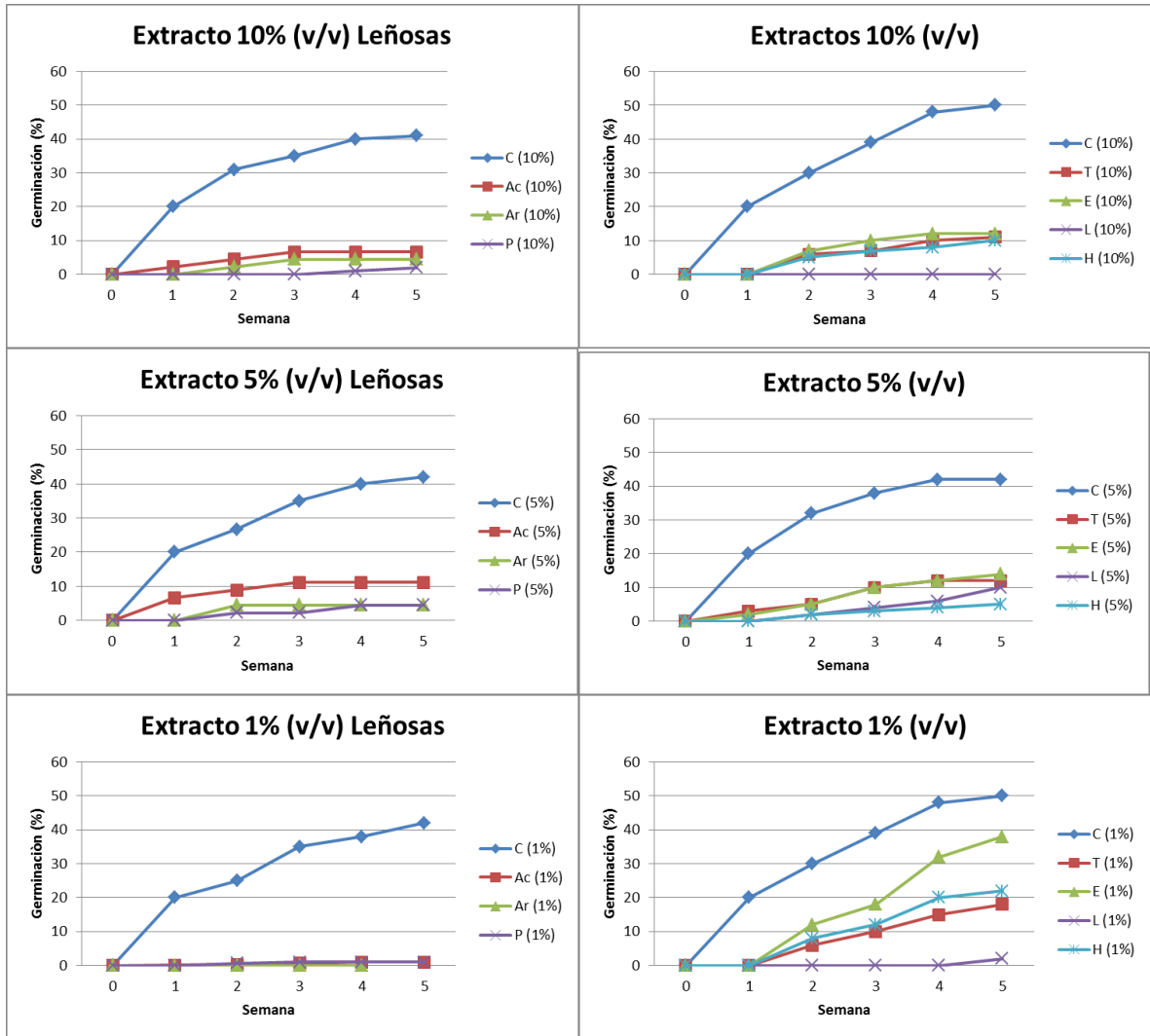


Figura N°16. Efecto de extractos vegetales en la germinación de perejil (*C. sativum*) a 15°C.

C: control, Ac: acacio, Ar: aroma, P: pino, T: teline (retamilla), E: espinillo, L: lupino, H: helecho.

Sin embargo, los porcentajes de germinación fueron bajos también en el control. Estos resultados se relacionan directamente con el tipo de ensayo desarrollado (bandejas de germinación con sustrato orgánico), el cual se llevó a cabo a temperatura ambiente durante el periodo invernal del 2016.

El efecto inhibitorio fue más marcado en los extractos de mayor concentración para el caso de especies herbáceas y arbustivas y lo inverso en el caso de las leñosas. Esto resultados pudieran estar relacionados con el tipo de metabolito o grupo de compuestos que ejercen el efecto inhibidor (Facchini, 2001; Ives, 2003; Chiapusio *et al.*, 2004; De Cortes *et al.*, 2005; Fernandez-Orozco *et al.*, 2006; Fukiko *et al.*, 2015). Vale la pena destacar que entre los extractos de especies leñosas, los de pino afectaron notablemente la germinación; mientras las disoluciones de las herbáceas y arbustivas los extractos de *L. arboreus* (Lupino) ocasionaron la mayor inhibición.

En este sentido, es bien conocida la acción inhibitoria de alcaloides y polifenoles en la germinación y el crecimiento de numerosas plantas y la toxicidad en animales (Stoms, 1982; Kinghorn y Balandrin, 1984; Petterson *et al.*, 1987; Strack *et al.*, 1991; Muzquiz *et al.*, 1994; Lopez-Amoros *et al.* 2006; Fernández-Orozco *et al.*, 2006; Troszyńska *et al.*, 2006; Ghiassi-Tarzi *et al.*, 2012). Sin embargo, este tipo de efecto no se ha documentado en la literatura considerando la mayoría de las especies evaluadas en el marco de esta investigación.

En especial, diferentes especies del género *Lupinus* han sido catalogadas como alelopáticas debido a su elevada concentración de alcaloides mayoritariamente en los frutos y la biomasa aérea (Wink y Hartmann, 1981; Wink y Witte, 1984; Wink y Witte, 1985; Wink y Twardowski, 1992; Wink, 1994; Wink *et al.*, 1995; Wink, 1998; Hirai *et al.*, 2000; De Cortes *et al.*, 2005). En dichas especies se han detectado la presencia de alcaloides en un rango variable (*L. angustifolius*, 1.51 %), (*L. albus*, 2.36 %), (*L. campestris*, 2.45 %), (*L. angustifolius*; lupanine: 0.55 %, angustifoline:

0.45 % y 13-hydroxylupanine: 0.38 %). Sin embargo, *L. arbóreus*, leguminosa estudiada en esta investigación y de elevada distribución en Biobío, no se conocen este tipo de efecto.

De igual forma, el poder alelopático de diferentes especies de pinos (*Pinus sp.*) ha sido evaluado en numerosas condiciones experimentales. Especies tales como *Pinus densiflora* y *Pinus halepensis* muestran un fuerte poder alelopático frente a otra especies vegetales. En sentido general, este efecto se ha atribuido al lixiviado de compuestos con estructuras no muy bien definidas en algunos casos (Fernández *et al.*, 2013; Fukiko *et al.*, 2015).

Considerando que el pino mostró sobresalientes niveles de polifenoles totales, y el Lupino una significativa proporción de alcaloides, los resultados aparentemente pudieran ser atribuibles a estas dos fracciones mayoritarias de metabolitos; partiendo de la base que en los extractos polares utilizados en el bioensayo se detectó la presencia de ambas agrupaciones simultáneamente. No obstante se requieren realizar ensayos con extractos purificados, para dilucidar los compuestos que particularmente afectan la germinación en cada caso.

8.2. Prueba de crecimiento

Por otra parte, la altura de la plántula describe de igual manera un efecto supresor de los extractos en función del tipo y la concentración (Figura N°17). Sin embargo, los extractos provenientes de plantas leñosas ocasionan un efecto inhibitor menos marcado que los extractos de plantas herbáceas. Inclusive a la más baja concentración (1%), no se observan variaciones notables en la altura respecto al

control. Asimismo, vale la pena hacer notar el efecto activador del crecimiento asociado al extracto de Acacio al 5%, el cual condicionó alturas superiores a la alcanzada en las plántulas control. Este resultado es coincidente con algunos reportes que describen que la acción fitoregulatora de determinados compuestos se encuentra asociada fundamentalmente al tipo de metabolito en particular; así como la concentración (Wink y Witte, 1985).

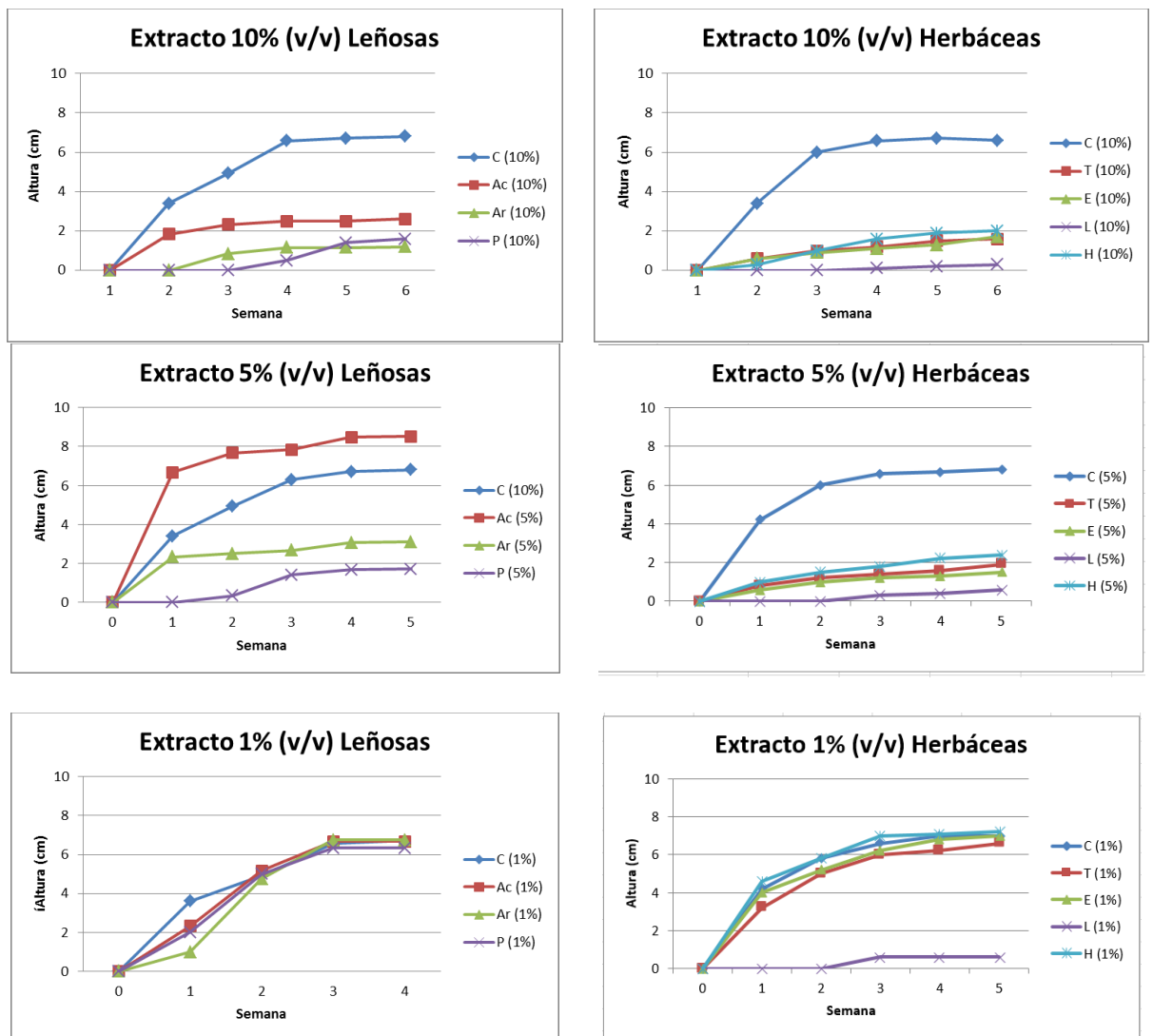


Figura N°17. Efecto de extractos vegetales en la altura de perejil (*C. sativum*) a 15°C.

C: control, Ac: acacio, Ar: aromo, P: pino, T: teline (retamilla), E: espinillo, L: lupino, H: helecho.

8.3. Prueba de longitud de la raíz

De igual manera, la medición de la longitud de la raíz evidenció un efecto selectivo de los extractos en función de su procedencia y concentración (Figura N°18).

Concentraciones extremas de los extractos provenientes de leñosas ocasionaron una elongación significativa de la raíz, mientras que la concentración intermedia (5%) del extracto de Acacio y de Pino tuvo un efecto inhibitor del crecimiento de la raíz.

Por su parte, en todos los casos los extractos de las plantas herbáceas y arbustivas inhibieron el desarrollo de la raíz de perejil. El efecto inhibitorio del extracto de Lupino fue el más significativo, independientemente de la concentración.

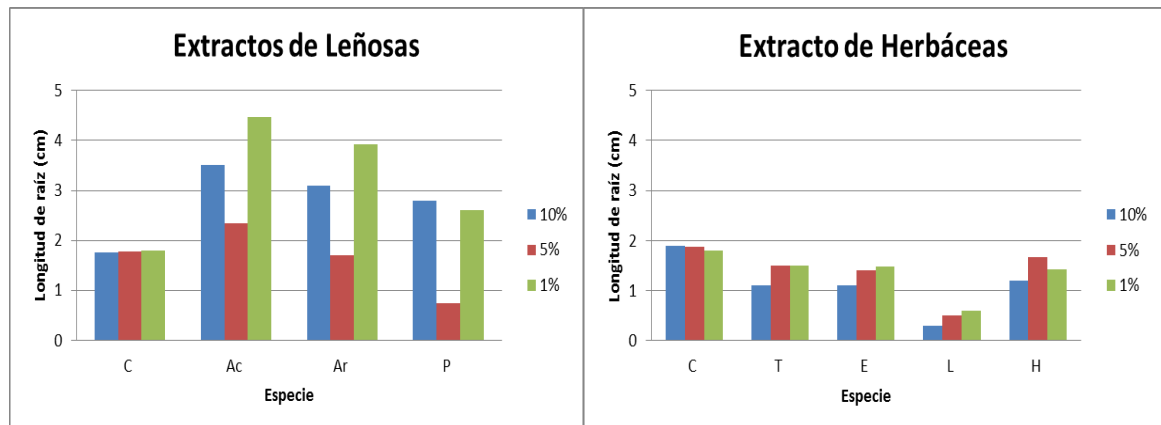


Figura N°18. Efecto de extractos vegetales en la longitud de la raíz de perejil (*C. sativum*) durante la quinta semana posterior a la emergencia de la plántula.

C: control, Ac: acacio, Ar: aroma, P: pino, T: teline (retamilla), E: espinillo, L: lupino, H: helecho.

En sentido general, los extractos provenientes de las hojas de las especies leñosas estudiadas, ricos en polifenoles y bajos en alcaloides, tienen un efecto detrimental en la germinación, moderado y selectivo en la altura de la planta y activador del crecimiento de la raíz. Sin embargo, los extractos de las especies herbáceas y arbustivas, compuestos por una fracción baja en polifenoles pero significativa de alcaloides, inhibieron la germinación, la altura de la plántula y la longitud de la raíz de manera definitiva.

Los resultados avizoran la posibilidad de purificar los extractos mediante métodos cromatográficos; así como dilucidar la estructura de los compuestos presentes, con el objetivo de ganar conocimiento sobre el efecto fitoregulador de dichos extractos.

CONCLUSIÓN

- Mediante el tamizaje fitoquímico se detectaron con mayor presencia en las especies arvenses estudiadas los alcaloides, los fenoles y los taninos. Los alcaloides se detectaron en un 100% de las muestras en medio etanólico, mientras que para fenoles y taninos prevaleció el medio más polar (acuoso). La poca presencia o poco potencial fitotóxico del resto de los grupos de metabolitos no justifica una cuantificación de dichos metabolitos en el marco de este trabajo.
- El análisis de clasificación automática permitió identificar especies con perfil fitoquímico similar entre sí. En sentido general, la biomasa de arbóreas presentaron una composición de metabolitos secundarios diferente a la biomasa de las arbustivas y herbáceas. Los diferentes hábitats y la morfología de la planta pueden ser los factores diferenciales.
- Los alcaloides muestran una mayor concentración en las hojas de *Lupinus* (arbustiva) y *Acacio* (arbórea), lo que puede indicar una estrategia de defensa general de dichas plantas contra otras especies vegetales y de animales.

- Los fenoles se encontraron en concentraciones muy altas en la corteza; por lo que se deduce que la mayoría de estos compuestos se presentan como parte del sistema de defensa en pino, aromo y acacia; tanto en la biomasa adulta como joven. Las especies arbóreas presentaron mayor concentración de fracción polifenólica en comparación a las arbustivas.
- En las especies de acacias (*A. dealbata* y *A. melanoxylon*) existe mayor presencia de proantocianidinas (taninos condensados) durante su crecimiento. El mayor cambio se observa cuando se compara la corteza joven con la madura.
- La cromatografía gaseosa (GC-MS) indicó que el alcaloide más frecuente fue la Lupanina. Sin embargo, no fue posible detectar metabolitos de este tipo en extractos provenientes de especies con elevada concentración de alcaloides mediante dicha técnica cromatográfica. Estos resultados se asocian principalmente a la ineffectividad de la extracción con HCl como estrategia general para la obtención de extractos crudos de alcaloides o a la inespecificidad de las condiciones analíticas durante la cromatografía. Estudios de optimización son requeridos con el objetivo de conocer los mejores procedimientos de extracción y análisis en cada caso.
- La corteza de los árboles y las hojas de las especies arbustivas y herbáceas constituyen la biomasa más atractiva para el desarrollo de estrategias de valorización que involucren el aprovechamiento de metabolitos secundarios mayoritarios.

- Los extractos acuosos de las especies estudiadas influyen de forma diferenciada en la germinación y el crecimiento de *C. sativum*. El extracto de Pino y el de las especies herbáceas afecta notablemente la germinación y el crecimiento. Sin embargo, el efecto es dependiente de la concentración del extracto. Un mayor número de ensayos deben ser efectuados con el uso de extractos de mayor pureza, para así dilucidar el efecto específico de cada grupo funcional mayoritario en especies de prueba.

BIBLIOGRAFIA

- Arango, J. (2002). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Recuperado desde: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides 2001.pdf>. 88 p.
- Belluti, F.; Fontana, G.; Bo, L.; Carenini, N.; Giommarelli, C.; Zunino, F. (2010). Design, synthesis and anticancer activities of stilbene - coumarin hybrid compounds: identification of novel proapoptotic agents. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3543-3550.
- Boros, B; Jakabová, S; Dornyei, Á; Horvath, G.; Pluhar, Z. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *J. Chromatogr.* 22, 88-97.
- Carey, D.B.; Wink, M. (1994). Elevation variation of quinolizidine alkaloid contents in a Lupanine (*Lupinus argenteus*) of the Rocky Mountains. *Journal of Chemical Ecology.* 20(4), 849-857.

- Castañeda, C.; Ramos, E.; Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de 7 plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*. Vol 8, N°1, pp. 56-60.
- Chiapusio, G.; Gallet, C.; Dobremez, J.F.; Pellisier, F. (2004). Compuestos alelopáticos ¿herbicidas del futuro? pp. 153-171.
- Cordero, D.; Allen, W.; Montijn, R.; Van Duynen, L. (2002) “Turismo sostenible en Costa Rica”. El caso de Quepos-Manuel Antonio. Cuadernos de Ciencias Sociales (San José: FLACSO-Costa Rica) N° 123.
- Cravatt, B.; Lerner, R.; Boger, D. (2009). Structure determination of an endogenous sleep-inducing lipid, *cis*-9-octadecenamide (oleamide): a synthetic approach to the chemical analysis of trace quantities of a natural product. *J. Am. Chem. Soc.* 118 (3), 580-590.
- Croteau, R.; Kutcahn, T.M.; Lewis, N.G. (2000). Natural products in biochemistry and molecular biology of plants (Buchanan, B., Grissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318.
- De Cortes, M.C.; Altares, P.; Mercedes, M.; Pedrosa, C.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Goyoaga, C.; Muzquiz, M.; Jiménez-Martínez, C.; Dávila-Ortiz, G. (2005). Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chemistry* 90, 347–355.
- Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 6, 78-84.

- Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 29-66.
- Fajardo, C.E.; Puentes, M.; Torres, S.; Fierro, A.; Espinosa, R. (2005). Efecto alelopático de extracto acuoso de girasol (*Helianthus annuus L.*) en la germinación y desarrollo de malezas en diferentes épocas del año. pp. 610-616.
- Fernández, C.; Santonja, M.; Gros, R.; Monnier, Y.; Chomel, M.; Baldy, V.; Bousquet-Mélou, A. (2013) Allelochemicals of *Pinus halepensis* as drivers of biodiversity in mediterranean open mosaic habitats during the colonization stage of secondary succession. *J Chem Ecol* 39:298–311
- Fernandez-Orozco, R.; Piskula, M.K.; Zielinski, H.; Kozłowska, H.; Frias, J.; Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius L.* var. zapaton. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 495–502.
- Foo, L.Y.; Lu, Y.; McNabb, W.C.; Waghorn, G.; Ulyatt, M.J. (1997). Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry*. 45, 1689-1696.
- Freshney, R.I. (2000). *Culture of animal cell: A manual of basic technique* (4th Ed.) Oxford University Press.
- Fukiko, K.; Masashi, S.; Hisashi, K. (2015). Allelopathy of pine litter: Delivery of allelopathic substances into forest floor. *Journal of Plant Biology* 58, 61–67.

- Garcia, D.E. (2003). Efecto de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” EEPF “Indio Hatuey”. 100 p.
- Ghasempour, H.R.; Anderson, E.M.; Gianello, R.D.; Gaff, D.F. (1998). Growth inhibitor effects on protoplasmic drug tolerance and protein synthesis in leaf cells of the resurrection grass *Sporobolus stapfianus*. In: Plant growth regulation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 179-183.
- Ghiassi-Tarzi, D.; Babak, E.; Maryam, I.; Gharachorloo, T.; Marzieh, C.; Baharinia, T.; Seyed, D.; Alireza, A.; Mortazavi, F.; (2012). The Effect of Germination on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Chickpea. Iran J Pharm Res. 2012 Autumn; 11(4), 1137–1143.
- Gizasa, M.J.; Souto, C. (2001). Allelopathy: Field observations and methodology. (S. S: Narval y P. Tauro Eds), Jodhpur: Scientific Publishers. pp. 213-231.
- Graham, R.D.; Rosser, J.M. (2000). Carotenoids in staple foods: their potential to improve human nutrition. Food Nutr. Bull. 21, 405-409.
- Harborne J.B., (1993). Phytochemistry. Academic Press, London, pp. 89-131.
- Hernández, L.; González, C. (2002) Introducción al Análisis Instrumental. Editorial: Ariel Ciencia. pp. 158-165.

- Herl, B.K.; Doe, W.W.; Jones, D.S. (2005). Use of military training doctrine to predict patterns of maneuver disturbance on the landscape. I. Theory and methodology. *Journal of Terramechanics* 42, 353–371.
- Hirai, M. Y.; Suzuki, H.; Yamazaki, M.; Saito, K. (2000). Biochemical and partial molecular characteristics of bitter and sweet forms of *Lupinus angustifolius*, an experimental model for study of molecular regulation of quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 48(10), 1458–1461.
- Holloway, P.J.; Jeffree, C.E. (2004). Secondary products. Epicuticular waxes. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. pp. 1190-1204.
- Ho-Zoo, L.; Won-Chu, L. (2001). Utilization of mulberry leaf as Animal Feed: feasibility in Korea. (Eds. Jian, L.; Yuyin, C.; Sánchez, M. and Xingmeng, L.). *Mulberry for Animal Feeding in China*, Hangzhou, China. 75 pp.
- Ives, J. (2003) Identificación de posibles interacciones alelopáticas de diferentes especies vegetales sobre el cultivo del arroz (*Oryza sativa*). [Tesis de Diploma]. UNAH. pp. 76-90.
- Jarvis, B. (2000). The role of nature products in evolution. *Recent Advances in Phytochemistry*. Elsevier Science, p.p. 1-24.
- Jasso de Rodríguez, D; Angulo-Sánchez, J.K.; Díaz, H.; Rodríguez-García, R. (2002). Rubber yield and guayule populations attributes in naturally reestablished wild stands in México. *Ind. Crops Prod.* 15, 213-220.

- Keszei, C.L.; Brubaker, R.C.; Kollner, T.; Degenhardt, J.; Foley, W.J. (2010). Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian *Myrtaceae*. *Phytochemistry*. 71, 844- 852.
- Kinghorn, A. D.; Balandrin, M. F. (1984). Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae: Structural types, analysis chemotaxonomy and biological activities. In S. W. Pelletier (Ed.), *Alkaloids: Chemical and biological perspectives* (Vol. 2, pp. 105–148). New York: Wiley.
- Knecht, K.; Nguyen, H.; Auken, A.; Kinder, D. (2008). “Effects of extracts of Lupine seed on blood glucose levels in glucose resistant mice” *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 89-104.
- Kobayashi, K. (2004) Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol. Management*. 4, 1-7.
- Labrada, R.; Parker, C. (1996). El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En: *Manejo de malezas para países en desarrollo. Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal*, vol. 120, p. 3-9.
- Langenheim, J.H. (2003). *Plant Resins: Chemistry, Ecology and Ethnobotany*. Timber Press, Portland, OR. pp. 586.
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Austria; pp. 27-32.
- Lopez-Amoros, M.L.; Hernandez, T.; Estrella, I. (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *J. Food Comp. Anal.* 19, 277–83.

- Lovett, J.V.; Ryuntyu, M.Y. (1992). Allelopathy: broadening the context. In: S.J.H. Rizvi and V. Rizvi (Eds.), *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. Chapman & Hall, London, pp. 11-20.
- Macías, F.A.; Molinillo, J.M.G.; Galindo, J.C.G., Valera, R.M.; Torres, A.; Simonet, A.M. (1999). *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. (H. G. Cutler y S. J. Cutler Eds), CRC Press, London, pp 15-31.
- Martínez-Flores, S.; González-Gallegos, J.; Culebras, J.M.; Tuñón, M. J. (2002). Los Flavonoides: Propiedades y acción antioxidante. Departamento de Fisiología, Universidad de León* y *Hospital de León. España. pp. 130-139.
- Makkar, H.P.S.; Becker, K., (1999). Plant toxins and detoxification methods to improve feed quality of tropical seeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 12(3), 467-480.
- Makkar, H.P.S.; Siddhuraju, P.; Becker, K. (2007) *Methods in molecular biology: plant secondary metabolites*. Vol. 393 Humana Press Inc, Totowa, NJ pp. 93–100.
- Meissner, C.; Wink, M. (1992). GC-MS-Analyse von alkaloiden nordamerikanischer Lupinen. In *lupinen 1991- forschung, anbau und verwertung*, ed Wink M. Heidelberg: Universitat Heidelberg. pp. 333-345.
- Muzquiz, M.; Cuadrado, C.; Ayet, G.; De la Cuadra, C.; Burbano, C.; Osagie, A. (1994). Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49

genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(7), 1447–1450.

- Molgaard, P.; Gitz, J.; Asar, B.; Liberna, I.; Bakkestrom, L.; Ploug, C.; Jorgensen, L.; Lauritzen, J.; Guzman, A.; Adsersen, A.; Toft, H. (2011). Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. Journal of Ethnopharmacology 138, 219– 227.
- Niemeyer, H. (2014). Quantitative screening for alkaloids of native vascular plant species from Chile: biogeographical considerations. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. 13 pp. 1, 109-116.
- Ocares, M.A. (2012). Acción antimicrobiana de extractos crudos de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Chile. Valdivia.
- Olvera-García, V. (2003). “Efecto y mecanismo de acción del extracto acuoso de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) sobre la proliferación de células HeLa.” Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Programa de Postgrado en Alimentos del Centro de la República. México. p.p. 56-71.
- Panter, K.E; Gardner, D.; Lee, S.; Pfister J.; Ralphs, M.H. (2007). Important poisonous plants of the United States. en: Ramesh C. Gupta (ed). Veterinary Toxicology. Capítulo 66. Elsevier Science Publishers- Amsterdam. The Netherlands. p.p. 825-866.

- Pérez, N. (2004). Manejo Ecológico de Plagas. --La Habana: CEDAR (Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural, Universidad Agraria de La Habana, ISBN 959-246-083-3, 296 p.
- Petterson, D.S.; Ellis, Z.L.; Harris, D.J.; Spadex, Z.E. (1987). Acute toxicity of the major alkaloids of cultivated *Lupinus angustifolius* seed to rats. *Journal of Applied Toxicology*, 7(1), 51– 53.
- Pistelli, L. (2002). Secondary Metabolites of Genus *Astragalus*: Structure and Biological Activity. en: Rahman, AU (ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier Science Publishers Amsterdam, The Netherlands. Vol. 27. pp. 443-545
- Pitty, A.; Muñoz, L. (1991). Guía práctica para el manejo de malezas. El Zamorano. Escuela Agrícola Panamericana. Tegucigalpa. 223 p.
- Porter, G.; Ofosu-Amaah, W.; Philips, M.; Clémencion, R. (1998). Study of GEF's Overall Performance, Global Environment Facility, 170p.
- Poulton, J.E. (1990). Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94, 401-405.
- Ramos, G.; Frutos, P.; Giráldez, F.J.; Mantecón, A.R. (1998). Plants secondary compounds in herbivores nutrition. *Estación Agrícola Experimental*. CSIC. Apdo 788. 24080 León. España. p.p. 234-242.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends-plant SCL*; 2(4), 152-9.
- Riveiro, M.E.; Moglioni, A.; Vazquez, R.; Gomez, N.; Facorro, G.; Piehl, L.; De Celis, E.R.; Shayo, C.; Davio, C. (2008) Structural insights into

hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 2665-2675.

- Rizvi S.J.; Haque, V.K.; Singh S. and Rizvi V. (1992). A discipline called allelopathy. En: Rizvi, S.J. y V. Rizvi (eds.). *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. Chapman, Londres. pp. 1-10.
- Ruiz, M.L.; Mendoza, S.O.; Zavala, J. (2005). Determinación de compuesto fenólicos de tres poblaciones de orégano (*Lippia graveolens Kunt*). Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Licenciatura en Biología. Facultad de Química / Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República / Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 4(2), 66-77.
- Savón, L.; Scull, I.; Martínez, M. (2007). Harina de follaje integrales de tres leguminosas tropicales para la alimentación avícola. Composición química, propiedades físicas y tamizaje fitoquímico. *Rev. Cubana Científica Agrícola*; 41, 359-64.
- Segler, D.S. (2001). *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer. Nueva York. 2 (3), 119-145.
- Seppanen, M.M.; Coleman, G.D. (2003). Characterization of genotypic variation in stress gene expression and photosynthetic parameters in potato. *Plant, Cell and Environment* 26, 401-410.
- Sepúlveda-Jiménez, G.; Porta-Ducoing, H.; Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21, 355-363.

- Skoog, D.A. (2015) Fundamentos de Química Analítica (9a. ed), México, D.F. Cengage Learning. 64-71.
- Silvestre, A.; Gandini, A. (2008). Terpenes: Major Sources, Properties and Applications. en: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Mohamed, NB & A Gandini (eds.). Elsevier Ltd pp. 17- 38.
- Sotelo, A.; Soto, M.; Lucas, B. (1996). Comparative studies of the alkaloids composition of two Mexican Erythrina species and nutritive value of the detoxified seeds. J. Agric. Food Chem., 41, 2340-2343.
- Stafford H. (1997). Roles of flavonoides in symbiotic and defense functions in legumes roots. The Botanical Review. 63 (1), 27-39.
- Stoms, D.J. (1982). Effect of polyphenols on shoot and root growth and on seed germination. Biologia Plantarum, 24:1.
- Strack, D.; Becher, A.; Brall, S.; Witte, L. (1991). Quinolizidine alkaloids and the enzymatic synthesis of their cinnamic and hydroxycinnamic acid esters in *Lupinus angustifolius* and *L. luteus*. Phytochemistry, 30(5), 1493–1498.
- Suck-Joon, P.; Sang-Gil, L.; Sang-Cheol D., Boum-Young, L.; Young-Joon, A. (1997). Larvicidal and antifeeding activities of oriental medicinal plant extracts against four species of forest insect pest. *Appl. Entomol. Zool.* 32 (4), 601-608.
- Sung-Suk, L.; Hak-Ju, L.; Don-Ha, C. (2000). Studies of biological activity of wood extractives (III) on the phenolic compounds isolated from heartwood of *M. bombycis*. J. Korean Wood Sci. and Tech. 28(2), 42-48.

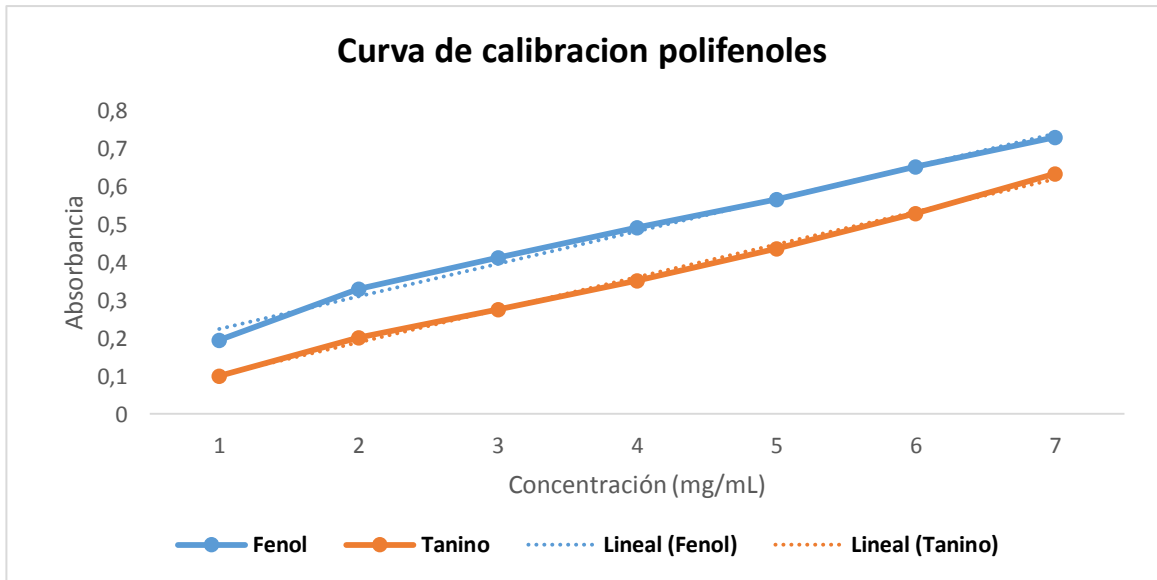
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2010). Plant physiology. 5th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. p.p. 101-109.
- Tejeda, O.; Rodríguez, M.T. (2008). Inhibidores de germinación y crecimiento de malezas y hortalizas, en residuos de amaranto (*Amaranthus sp.*). Mexico, Agrociencia 23-30.
- Tosco, G. (2004). Los beneficios de la chía en humanos y animales. Nutrientes de la semilla de chía y su relación con los requerimientos humanos diarios. Actualidades Ornitológicas No. 119. 22-30.
- Troszyńska, A.; Wołeszo, A.; Narolewsk, O. (2006). Effect of germination time on the content of phenolic compounds and sensory quality of mung bean (*Vigna radiata* L.) sprouts Pol. J. Food Nutr. Sci. 15/56 (4), 453–459.
- Vallverdú-Queralt, A.; Oms-Oliu, G.; Odriozola-Serrano, I.; Lamuela-Raventós, R. M.; Martín-Belloso, O.; Elez-Martínez, P. (2012). Metabolite profiling of phenolic and carotenoid contents in tomatoes after moderate-intensity pulsed electric field treatments. Food Chemistry, 136(1), 199-205.
- Van Gorkom, B.A.; Karrenbeld, A.; Van Der Sluis, T. (2000). Influence of a Highly Purified Senna Extract on Colonic Epithelium. Digestion 61(2), 113-20.
- Wink, M. (1994). Biological activities and potential application of lupin alkaloids. In J. M. Neves-Martins & M. L. Beirão da Costa (Eds.), Advances in lupin research (pp. 161–178). Lisboa: Instituto Superior de Agronomia (ISA press).

- Wink, M. (1998). A short history of alkaloids. In M. F. Roberts & M. Wink (Eds.), *Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal applications* (pp. 11–44). New York: Plenum Press.
- Wink, M.; Hartmann, T. (1981). Sites of enzymatic synthesis of quinolizidine alkaloids and their accumulation in *Lupinus polyphyllus*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 102, 337–344.
- Wink, M.; Twardowski, T. (1992). Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. In S. J. H. Rizvi & V. Rizvi (Eds.), *Allelopathy. Basic and Applied Aspects* (pp. 129–150). London: Chapman and Hall.
- Wink, M.; Witte, L. (1984). Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta*, 161, 519–524.
- Wink, M.; Witte, L. (1985). Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures. *Zeitschrift fur Naturforschung c*, 40, 767–775.
- Wink, M.; Meibner, C.; Witte, L. (1995). Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38(1), 139–153.
- Woelfel, S.; Farack, F. (2005). Defoliation of potato plants. Possible influence on potato starch. *Kartoffelbau* 56, 237-240.
- Zamora-Natera, J.F.; Bernal-Alcocer, A.; Ruiz-López, M. (2005). Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (*Fabaceae*) y la Evaluación Antifúngica del Extracto Alcaloideo y Lupanina contra

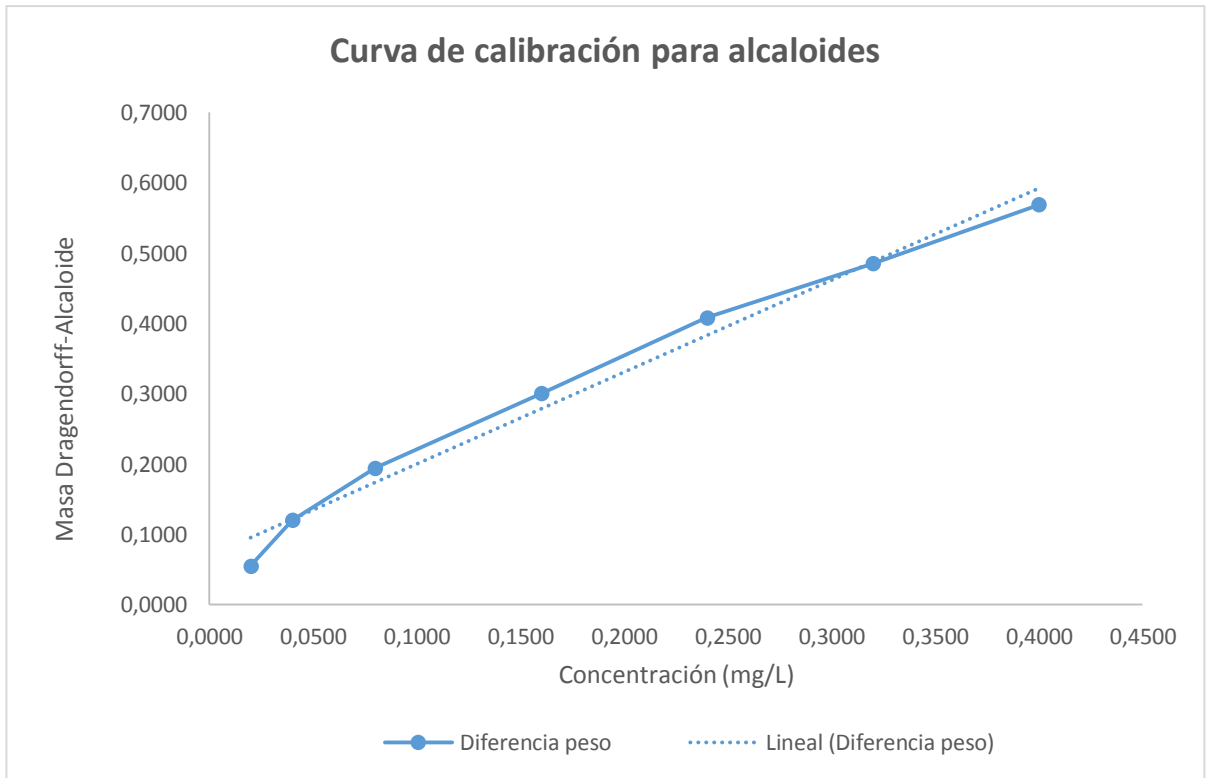
Fitopatógenos. Universidad de Guadalajara, CUCBA, Departamento de Botánica y Zoología, km 15.5 Carr. Guadalajara-Nogales, Predio las agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México CP 45110. p.p. 45-50.

- Zhao, J.; Muhammad, I.; Dunbar, D.; Mustafa, J. Khan, A. (2005). New alkalamides from Maca (*Lepidium meyenii*). J. Agric. Food Chem., 53. 690-693.

ANEXOS



Anexo 1. Curva de calibración a partir de dos polifenoles (Fenol y tanino soluble de *P. radiata*).

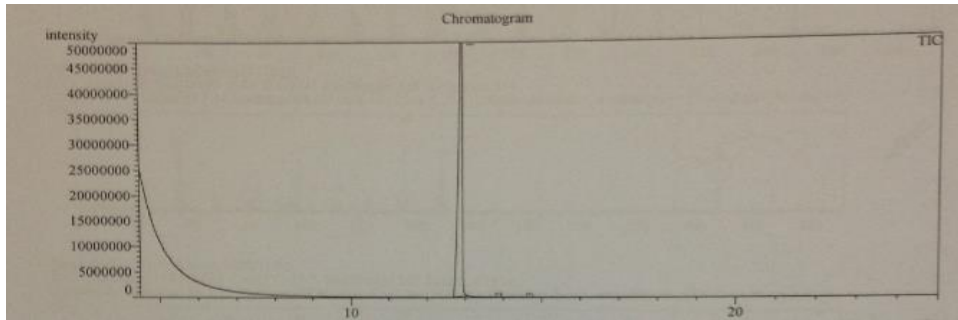


Anexo 2. Curva de patrón estándar a partir de un herbicida natural (Matrina).

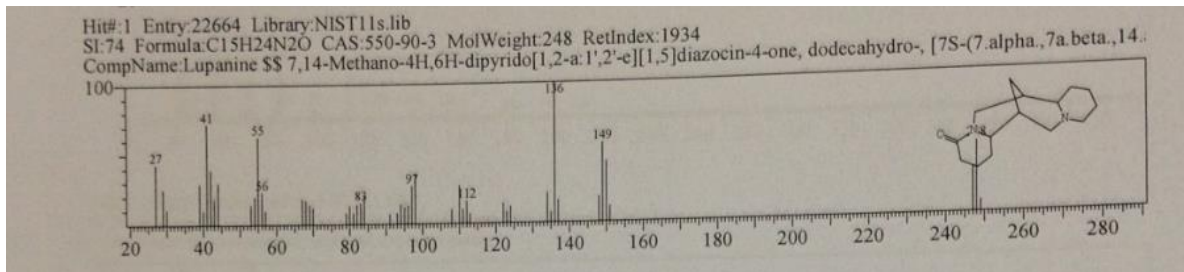
Anexo 3. Fotos de los picos cromatográficos (tanto del patrón (a), como una muestra representativa (b)) que muestra un alcaloide mayoritario.

Matrina:

Cromatograma (a)

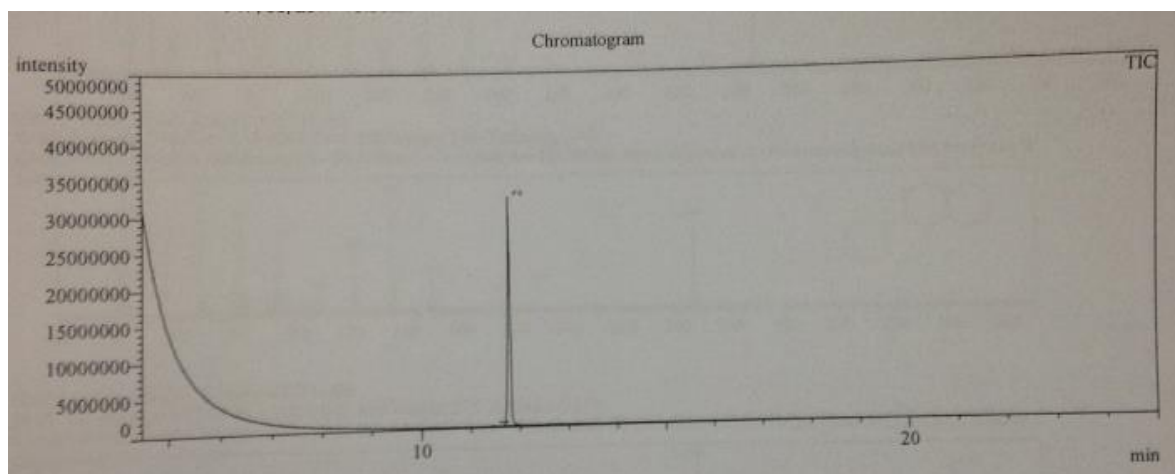


Fraccionamiento de masas (a)



Lupinus (Hoja):

Cromatograma (b)



Fraccionamiento de masas (b)

