UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DR. FRANCISCO GIRAL GONZALEZ
DONACION
1998

ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO DE ALGUNAS PLANTAS DE SELVA ALTA PERENIFOLIA Y "ACAHUAL"

DEPTO. DE EXAMENES PROF. FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JOSE GUADALUPE BENITO RAMIREZ CARREÑO

MEXICO, D. F. 1981

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

Presidente: Q.F.B. Ma. Luisa García Padilla

Vocal: Dra. Ofelia Espejo de Ochoa

Secretario: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

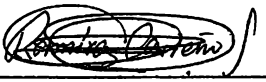
1er. Suplente: M. en C. Ma. Teresa Reguero Reza

2do. Suplente: Profa. Cristina Díaz Padilla

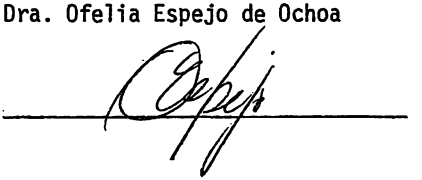
Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales, División de Estudios de Posgrado Facultad de Química, U.N.A.M.

Nombre y firma del sustentante: José Guadalupe Benito Ramírez Carreño



Nombre y firma del asesor del tema: Dra. Ofelia Espejo de Ochoa



Estudio realizado con el apoyo economico del proyecto PCECNAL 800557 "Crecimiento y regeneración de especies primarias" del CONACYT.

A mis Padres

Con profundo cariño y agradecimiento

ya que debido a su esfuerzo y ejemplo

logré llegar a este término.

A mis hermanos

A mis amigos

y maestros

A Graciela

Agradezco a:

La Dra. Ofelia Espejo por su valiosa dirección y consejos en la realización de esta tesis.

La Dra. Silvia del Amo por su ayuda en los aspectos biológicos de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos y al CONACYT por su apoyo económico brindado en la elaboración de esta tesis.

I N D I C E

		PAGINA
1.	INTRODUCCION.	1
2.	GENERALIDADES.	5
3.	PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.	18
	3.1 Descripción de la zona de colecta.	18
	3.2 Material de estudio.	18
	3.3 Desarrollo experimental y resultados.	21
	3.3.1 Pruebas químicas preliminares en el sitio de recolección.	23
	3.3.2 Cuantificación de compuestos fenólicos.	26
	3.3.3 Extracción y examen preliminar de la fracción acuosa (A_1) y clorofórmica (C_1) del extracto etanólico.	31
	3.3.4 Extracción y examen de la composición de aceites esenciales.	34
4.	DISCUSION DE RESULTADOS.	66
	4.1 Sobre el material de estudio.	66
	4.2 Pruebas químicas preliminares.	66
	4.3 Compuestos fenólicos.	67

PAGINA

4.4 Aceites esenciales. 70

5. ASPECTOS SOBRESALIENTES DE LOS RESULTADOS. 75

6. BIBLIOGRAFIA. 77

1. INTRODUCCION.

México se caracteriza por ser un país que cuenta con una gran diversidad vegetal que comprende casi todos los ecosistemas que se han descrito sobre la tierra, desde la vegetación netamente tropical de las zonas bajas y calientes hasta los páramos de alta montaña, desde los desiertos hasta las densas y frondosas selvas (1).

Las zonas tropicales del país han sido objeto de una sobreexplotación, lo que ha traído como consecuencia una disminución drástica de la superficie con vegetación original, muy especialmente de selva alta perenifolia. Las causas de la desforestación de estas zonas han sido, en orden de antiguedad, más no de importancia:

1º. El sistema de agricultura nómada que practican los campesinos de la zona.

2º. La explotación maderera.

3º. Los programas de colonización y apertura de nuevas zonas a la agricultura y ganadería.

Las que han ejercido una acción más drástica sobre estas zonas han sido éstas dos últimas.

Ante este problema se hace imprescindible conocer con cierta precisión, la capacidad de regeneración de estos ecosistemas, con su biota correspondiente y los mecanismos involucrados en tales procesos (2).

Para entender este proceso, se ha considerado clave el estudio sobre plántulas y estados juveniles de plantas de selva, debido a que estos constituyen el potencial de regeneración de las mismas (3).

Estas plántulas y estados juveniles se encuentran en estado de "supresión de crecimiento" (3) y durante el período en que permanecen en este estado, están expuestas a fuertes presiones de selección, que ejercen distintos factores ambientales. Uno de estos es el ataque de microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades e incluso la muerte de la plántula o estado juvenil, constituvendo este uno de los factores causantes de la alta mortandad en estos estadíos. (idem).

Levin (35) en 1976, señala la importancia que tienen los mecanismos de defensa químicos que han desarrollado las plantas contra el ataque de microorganismos patógenos, insectos y herví boros indicando varios de estos mecanismos, uno de los cuales es la acumulación de metabolitos secundarios. La resistencia química al ataque de patógenos se ha clasificado en dos tipos: la constitutiva y la inducida, aunque la línea de separación entre estas dos clases no es fácil de delimitar.

Los compuestos fenólicos y terpénicos son los que hasta ahora se han encontrado más comunmente como responsables de ambos tipos de resistencia, llegándose a esclarecer en ocasiones su estructura química (4-14).

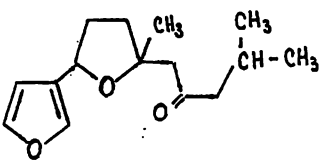
Así por ejemplo, de acuerdo con Kargopolova (citado por Cruickshank y Perrin) (13) las variedades de trigo altamente resistentes a P. triticina contenían una mayor cantidad de compuestos fenólicos calculados como ácido protocatéquico (veáse cuadro 2 en la pag. 13) que las variedades susceptibles.

Cobb y colaboradores (14) sugieren que algunos monoterpenos producidos por Pinus ponderosa (mirceno, felandreno, limoneno, β-pineno y careno) juegan un papel muy importante en la resistencia a la infección por Fomes annonus y Ceratocystis sp especialmente en combinación con compuestos fenólicos.

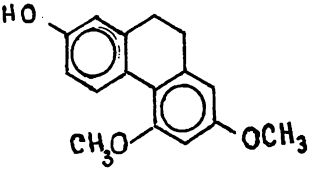
Con respecto a la producción de compuestos producidos en la planta después de la infección y que están relacionados con la resistencia, Cruickshank y Perrin (13) establecen que puede haber tanto cambios cualitativos como cuantitativos. Dentro de estos últimos mencionan que hay un aumento en la concentración de sustancias fenólicas alrededor de lesiones resultantes de la infección en hojas de Paulownia tomentosa y Gloeosporium kawakamii.

En este contexto nació la "Teoría de las fitoalexinas" propuesta por Muller y Borger (13) en la cual, un compuestos denominado "fitoalexina" inhibe el desarrollo del patógeno y se forma sólo cuando este entra en contacto con la célula del huésped de tal manera que no se encuentra en tejidos no infectados. Se han identificado cinco fitoalexinas de naturaleza fenólica que son la faseolina (estructura IV), la 3-metil-6-metoxi-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarina (V), la trifolirizina (VII), la pisatina

(VIII) y el orcinol (II) y una de naturaleza terpenoide que es la ipomeamarona (I).



I. ipomeamarona



II. orcinol

Se ha observado en múltiples ocasiones que existen diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la composición química de plantas con respecto al grado de infección y solo algunas veces se ha logrado aislar e identificar al compuesto o compuestos responsables de la resistencia a cierta enfermedad (6-12).

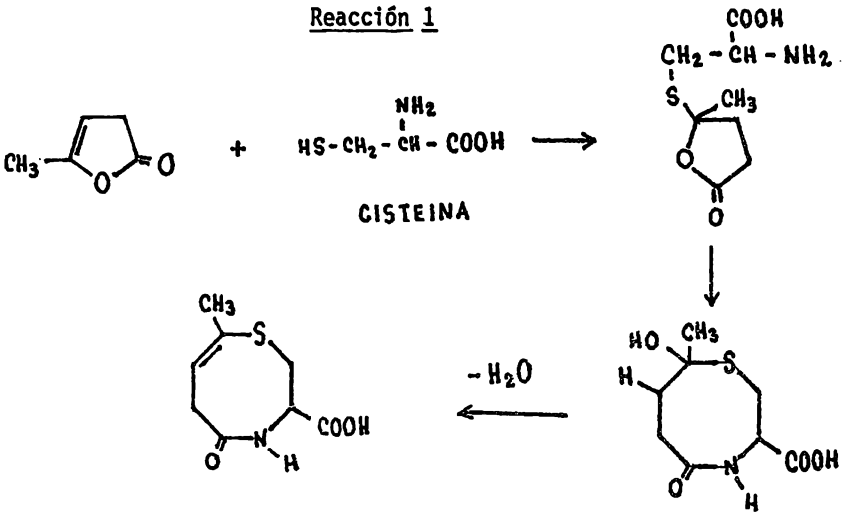
El objetivo del presente trabajo fué analizar poblaciones de algunas especies representativas de la selva alta perenifolia que presentan diferentes grados de infección para tratar de detectar algunas diferencias químicas cualitativas y cuantitativas en ellas, utilizando para ello sus extractos etanólicos y de arrastre por vapor (aceites esenciales).

2. GENERALIDADES.

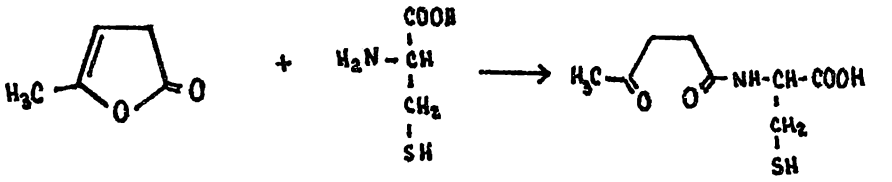
La capacidad de los microorganismos fitopatógenos para penetrar a las células del huésped depende de la efectividad de las enzimas pectolíticas producidas por ellos. Por consiguiente, el conocimiento de los efectos de sustancias producidas por las plantas sobre estas enzimas es importante para entender el fenómeno de la resistencia de las plantas a las enfermedades, lo cual tiene una importancia ecológica significativa (13, 29 y 30).

Cavallito y Haskell (31) indican que las lactonas insaturadas pueden inhibir la actividad enzimática por formación de una unión covalente con los grupos SH- (reacción 1) y posiblemente con grupos amino de las enzimas (reaccion 2). Sugieren que este es un mecanismo básico de acción de todas las lactonas insaturadas incluyendo a algunas cumarinas.

Reacción 1



Reacción 2



Algunos compuestos fenólicos, principalmente los taninos, presentan la propiedad de combinarse con proteínas, reduciendo así la actividad de las enzimas pectolíticas presentes en los patógenos. Bataille (28) indica que pueden unirse en tres diferentes formas:

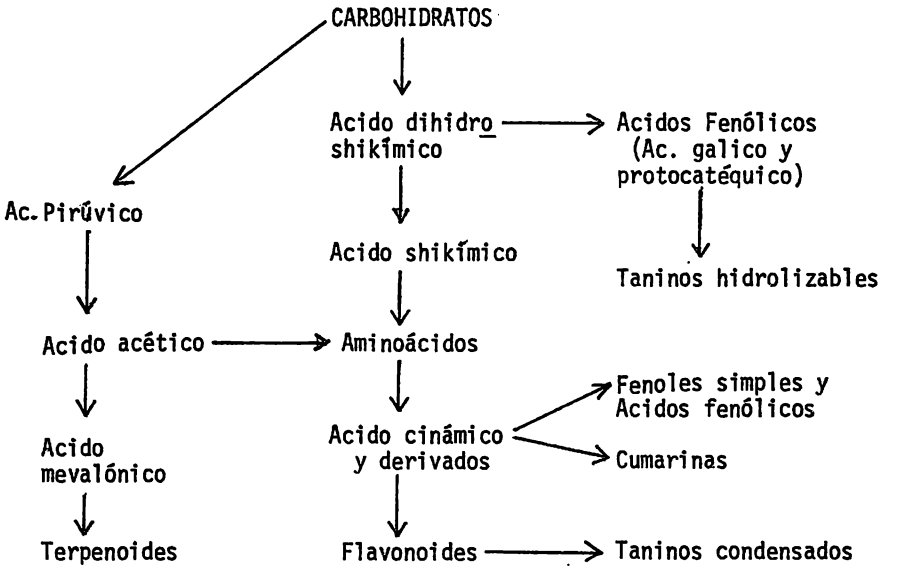
a) por puentes de hidrógeno entre el radical hidroxilo del compuesto fenólico y los grupos amino, carboxilo o hidroxilo de los aminoácidos.

b) Por formación de enlaces iónicos entre el grupo aniónico del compuesto fenólico y el catiónico de amino-

ácidos (p. ej. lisina).

c) Por formación de enlaces covalentes entre grupos reactivos de las proteínas y los compuestos fenólicos.

Los caminos biosintéticos probables para la producción de algunas sustancias químicas involucradas en la resistencia a enfermedades en plantas por microorganismos patógenos (13) se muestran en el siguiente esquema:



Por consiguiente, podemos clasificar estos compuestos en dos grupos: fenólicos y terpenoides.

Los terpenoides comprenden un amplio grupo de sustancias de plantas superiores, que tienen como origen biosintético a la molécula de isopreno, basándose su clasificación en el número de unidades de esta molécula que posean. Tenemos así hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos que poseen 1,2,3,4,6 y 8 unidades de isopreno respectivamente.

Los monoterpenos y sesquiterpenos se encuentran en los aceites esenciales, debido a que son los más volátiles (15).

Los aceites esenciales, también llamados aceites volátiles, aceites etéreos o esencias, son mezclas de un número variable de sustancias volátiles que se encuentran en diversas partes de las plantas superiores y que les proporcionan su olor característico.

Dependiendo de la familia de la planta, los aceites esenciales pueden aparecer en estructuras secretoras especializadas tales como pelos glandulares, células modificadas del parénquima, conductos secretores llamados vitas o en las cavidades lisígenas o esquizógenas. Se pueden formar directamente del protoplasma por descomposición de la capa risinógena de la pared celular o por hidrólisis de algunos glucósidos. Así mismo se presentan en una o varias partes de la planta; pétalos, hojas, corteza, tallo, frutos, etc. (17).

En general, los aceites esenciales tienen elevados índices de refracción, son ópticamente activos, poseen olores característicos, son incoloros o ligeramente amarillos, se obscurecen con la luz, se oxidan en presencia del aire, son líquidos a temperatura ambiente, pero pueden formar sólidos por enfriamiento llamados estearoterpenos, son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua, pueden sufrir polimerización e isomerización fácilmente.

Los aceites esenciales pueden extraerse de las plantas por varios métodos; principalmente por expresión, extracción con disolventes orgánicos y por destilación con vapor de agua.

Su composición es compleja y varía grandemente dependiendo de algunos factores tales como el clima, época de colecta, riqueza del suelo, edad, efectos diurnos, habitat, factores genéticos, etc. (18). También se han observado variaciones con respecto al grado de infección (21).

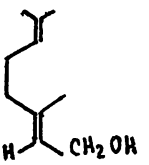
El rendimiento del aceite esencial obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento del peso vegetal hasta 1-3% (19) y su separación para un anâlisis posterior se puede llevar a cabo por destilación fraccionada, reacciones químicas, cromatografía en placa fina o gas-líquido y cristalización a bajas temperaturas.

Los constituyentes químicos de los aceites esenciales

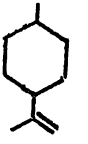
se pueden dividir en mono y sesquiterpenos, derivados del benceno, compuestos de cadena no ramificada y varios. De éstos, los monoterpenos son los que se encuentran más frecuentemente (20) y junto con los sesquiterpenos pueden ser acíclicos (geraniol), monocíclicos (limoneno) o bicíclicos (α-pineno). A su vez, estos pueden ser hidrocarburos saturados o poseer otros grupos funcionales como alcoholes (geraniol), aldehídos (citroenal y vainillina), cetonas (mentona), fenoles (eugenol), eteres fenólicos (safrol), óxidos (1,8-cineol) y esteres (acetato de geraniol) (17, 15). Ejemplos de las estructuras de estas sustancias se ven en el cuadro 1.

CUADRO No. 1

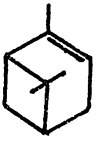
Estructuras terpénicas más comunes



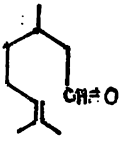
GERANIOL



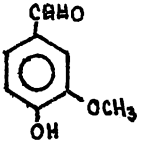
LIMONENO



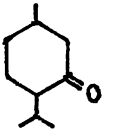
α-PINENO



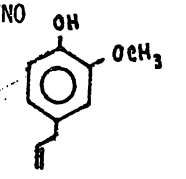
CITROENAL



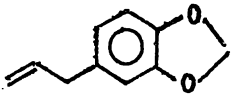
VAINILLINA



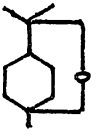
MENTONA



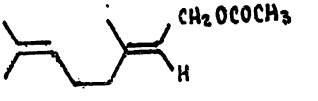
EUGENOL



SAFROL



1,8-CINEOL



ACETATO DE GERANIOL

Se han atribuído a los aceites esenciales algunas funciones biológicas, entre las cuales podemos citar las de reguladores del crecimiento y la transpiración, atracción de insectos y animales polinizantes (18), protección contra la depredación de insectos, microorganismos y animales (14). Asimismo se les ha atribuído una función importante en alelopatía (21), en la que mencionan al cineol, limoneno, alcanfor, canfeno α y β-pineno entre otros. Algunos de estos terpenoides, han sido también involucrados en la resistencia a la infección (14).

De estas propiedades biológicas, así como físicas y químicas se han derivado algunos usos de los aceites esenciales, como anestésicos, agentes bactericidas y fungicidas, estimulantes respiratorios y productos de perfumería entre otros (22).

Con respecto a los compuestos fenólicos, estos constituyen también un amplio grupo de sustancias presentes en plantas superiores. Se caracterizan por poseer en común un anillo aromático enlazando uno o más sustituyentes hidroxilo, presentando a su vez una serie de propiedades físicas comunes; en general son solubles en disolventes polares, siendo sus glucósidos solubles en agua. En algunas ocasiones las agliconas correspondientes son insolubles; son aromáticos (absorben fuertemente en el U.V.) y con pocas excepciones son sólidos (15).

Presentan ciertas propiedades químicas en común: forman sales con metales, son ácidos débiles (pK_a fenol: 9.98), forman

complejos con proteínas por puentes de hidrógeno, sufren oxidación enzimática por las fenolasas presentes en plantas, por lo que esta propiedad se debe tomar en cuenta para procedimientos de extracción cuando se requiera que estas sustancias permanezcan inalterables, pueden también oxidarse por medio de agentes como el ferricianuro de potasio produciéndose el complejo de azul de Prusia. Esta propiedad ha sido muy usada para su detección cualitativa y cuantitativa (32).

Un criterio adecuado para clasificar a los compuestos fenólicos se basa en su complejidad estructural. Así, tenemos fenoles simples con 6 átomos de Carbono (C_6) y ácidos fenólicos (C_6-C_1) ácidos cinámicos y compuestos relacionados (C_6-C_3); cumarinas, isocumarinas y cromonas (C_6-C_3); pigmentos flavonoides (C_{15} y C_{30}); pigmentos quinónicos (C_6, C_{10} y C_{14}); benzofenonas, xantonas y estilbenos (C_6-C_1-C_6 y C_6-C_2-C_6) y compuestos fenólicos complejos (taninos y ligninas).

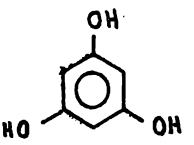
Los fenoles simples y los ácidos fenólicos tienen un origen biosintético diverso; algunos se originan del ácido dihidroshikímico como los ácidos gálico y protocatéquico y otros, como el floroglucinol, se forman a partir de ácido acético (21). Estas sustancias aparecen en las plantas en forma libre o combinadas como éteres, ésteres o glucósidos, o bien formando parte de compuestos fenólicos más complejos.

Dentro de este grupo, se han encontrado algunas sutancias

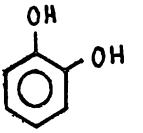
involucradas en la resistencia de las plantas a la enfermedad. Por ejemplo el catecol, la hidroquinona, el floroglucinol, el ácido gálico y el ácido protocatéquico (24). Además, se ha reportado que la actividad fungicida de estos compuestos los protege del ataque de hongos (10, 13, 25). (Cuadro No. 2).

CUADRO No. 2

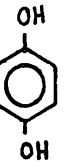
Estructuras fenólicas más comunes



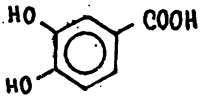
FLOROGLUCINOL



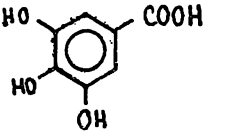
CATECOL



HIDROQUINONA



ACIDO PROTOCATEQUICO

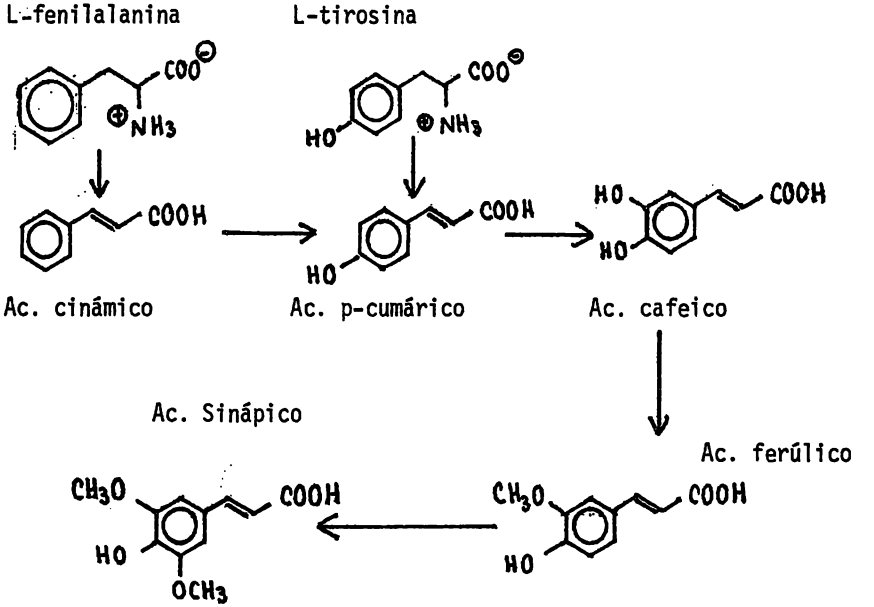


ACIDO GALICO

Los ácidos cinámicos son fenilpropanoides que se derivan de fenilalanina y tirosina a través del camino biosintético del ácido shikímico (Cuadro No. 3)

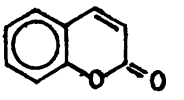
CUADRO No. 3

Acidos Cinámicos



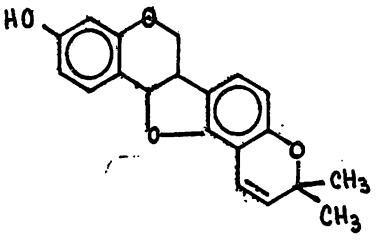
Algunos de estos compuestos como el ácido cinámico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico han sido relacionados con efectos alopáticos y con la resistencia a enfermedades debido a que presentan propiedades fungicidas y fungistáticas (21).

Las cumarinas y compuestos relacionados son lactonas de ácidos hidroxicinámicos, cuya estructura general es la siguiente (III)

III 

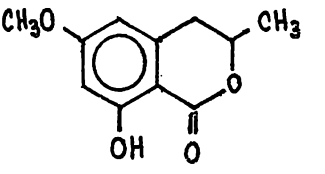
Estas aparecen ampliamente distribuídas en plantas superio

res y pueden aparecer en todas las partes de la planta. La mayoría de ellas presentan sustituyentes hidroxilo o alcoxilo en C_7 (26). Han sido identificadas dos fitoalexinas en esta naturaleza: la faseolina (7-hidroxi-3,4'-dimetilcromenocromanocumarina) (IV) y 3-metil-6-metoxi-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarina (V).



IV

Faseolina

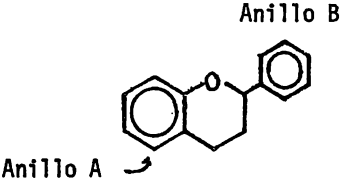


V

3-metil-6-metoxi-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarina.

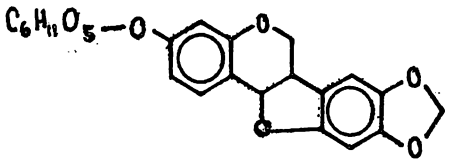
Los compuestos flavonoides presentan una estructura básica (VI) en la cual el anillo bencénico A proviene del ácido acético y el B del ácido shikímico.

VI. Estructura básica de flavonoides



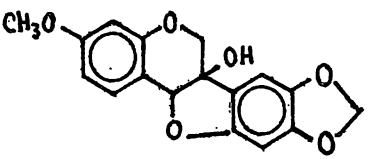
Su clasificación se basa en diferencias estructurales. Así

se presentan los siguientes grupos: antocianidinas, leucoantocianidinas, flavonoles, flavonas e isoflavonas, glicoflavonas, biflavonilos, flavanonas, isoflavonas, chalconas y auronas (15). Algunas funciones atribuídas a estas sustancias son las de atracción de pájaros e insectos para la polinización, inhibición del crecimiento de otras plantas y una actividad antibiótica (27). Solo algunos de estos compuestos han sido relacionados con la alelopatía y con la resistencia a la enfermedad (21), entre ellos podemos citar a las antocianidinas delfinidina, pelargonidina y petunidina; a la formononetina (isoflavona) y a los isoflavonoides trifolirizina (VII) y pisatina (VIII). Estas últimas se han descrito como fitoalexinas (13).



VII

Trifolirizina

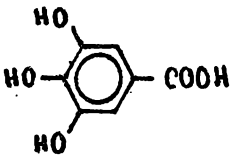


VIII

Pisatina

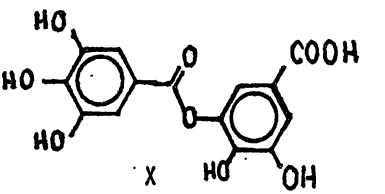
Finalmente, los taninos constituyen un grupo de compuestos poliméricos de fenoles simples y ácidos fenólicos. Su localización se limita a las vacuolas celulares. Por otro lado, su clasificación se basa en la propiedad de sufrir hidrólisis, dando lugar a dos grupos principales; taninos hidrolizables y taninos condensados o no hidrolizables. Los primeros son mez-

clas complejas de ácidos fenólicos, siendo el ácido gálico (IX), el principal y da lugar a ácido digálico (X).



IX

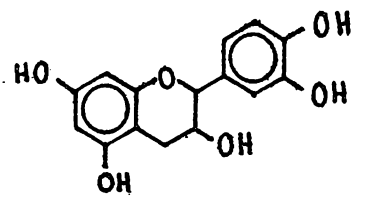
Acido gálico



X

Acido digálico

Por otro lado, los taninos condensados contienen nucleos polifenólicos unidos entre si por enlaces C-C o C-O-C, principalmente del grupo de las catequinas (p. ej. L-epicatequina) (XI).



XI. L-epicatequina

De acuerdo con Rice (21), Cook y Taubenhaus encontraron que estas sustancias inhibían el crecimiento de hongos fitopatógenos y sugieren que los taninos son importantes en la resistencia de algunas plantas a enfermedades producidas por hongos. También se ha demostrado que hay relación entre los taninos y la resistencia a la enfermedad (13).

3. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.

3.1 Descripción de la zona de colecta.

El trabajo de campo se realizó en la estación de Biología tropical "Los Tuxtlas", de la Universidad Nacional Autónoma de México localizada al Sureste del estado de Veracruz, entre los 95°8' y 95°48' de longitud y los 18°20' y 18°40' de latitud norte y enclavada en la sierra de los Tuxtlas, pequeña cadena volcánica que se encuentra prácticamente en el litoral del golfo de México, (figura 1).

Conforme a los datos de la estación meteorológica de Coyame, Ver. el clima imperante en esta región es cálido húmedo con lluvias de verano y principios de otoño, la temperatura media anual es de 24.1°C y la precipitación pluvial total anual de 1953.3 mm.

La vegetación de la selva alta perenifolia de la estación, está formada, en el estrato más alto, por Bernoullia flammea, Cerba pentantera y Zanthoxilum rellermanii; en el estrato medio por Bursera simaruba, Guarea bijuga, Dentropana arboreus entre otros y en el estrato bajo por Annona muricata, Nectandra ambigens, Trichilia breviflora como dominantes entre otras.

3.2 Materiales de Estudio.

Para el desarrollo de este trabajo se escogieron tres especies en su estado juvenil.

Omphalea oleifera. Hemsley. Familia Euphorbiaceae.

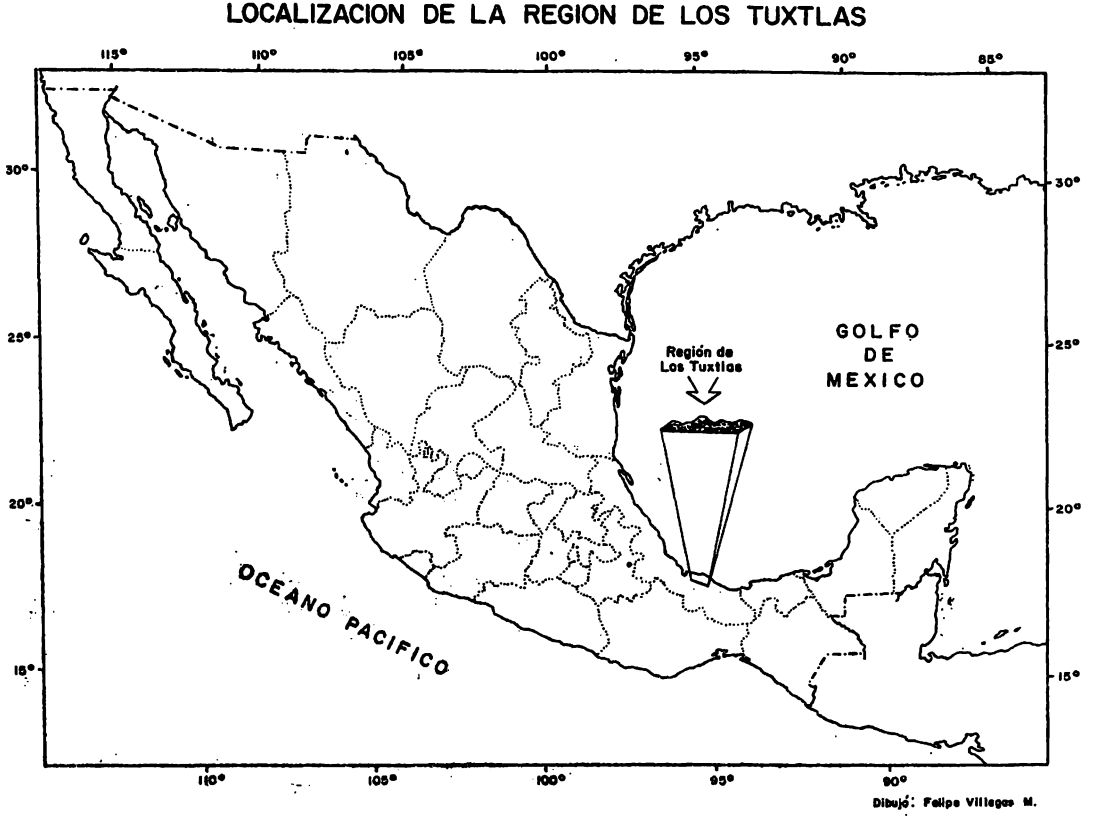


Fig. 1.- Localización de la Sierra de "Los Tuxtlas" al SE de la República Mexicana.

Nectandra ambigens. (Blake) C.K. allen. Familia Lauraceae

Licaria alata. Miranda. Familia Lauraceae. ? ?

Los criterios que se usaron para trabajar las tres especies antes mencionadas fueron los siguientes:

a) Las tres especies se caracterizan por tener poblaciones dominantes de plántulas y estados juveniles.

b) O. oleifera se escogió porque en observaciones previas se vió que las poblaciones de estados juveniles permanecían muy poco dañadas. El hecho de pertenecer a la familia de las Euforbiáceas, rica en metabolitos secundarios hizo pensar que esta especie podría desarrollar algún mecanismo de defensa químico eficiente contra patógenos.

c) Las otras dos especies de la familia de las Lauraceas fueron escogidas porque la familia se caracteriza por ser rica en aceites esenciales, metabolitos secundarios conocidos por su acción antimicrobiana.

Las poblaciones de estados juveniles fueron clasificadas en dos grupos (según el grado de infección detectable) en poblaciones más dañadas y menos dañadas.

Es importante señalar aquí que en las dos especies de Lauráceas utilizadas, N. ambigens y L. alata fué relativamente sencillo hacer esta separación, pero en O. oleifera la separación fué difícil de establecer, ya que en términos generales las poblaciones siempre se mostraban muy poco infectadas.

El estudio se llevó a cabo en dos temporadas:

Primera colecta: Primavera (marzo de 1980)

Segunda colecta: Verano (julio de 1980)

Las muestras se procesaron lo más rápidamente posible para evitar transformaciones metabólicas producidas por la propia planta o por microorganismos.

3.3 Desarrollo Experimental y resultados.

Los disolventes empleados fueron de grado comercial que se purificaron por destilación fraccionada. El metanol, etanol y hexano se destilaron en $CaCl_2$ anhidro, mientras que el cloroformo y acetato de etilo en pentóxido de fósforo.

Los reactivos utilizados como grado reactivo (R.A.) fueron cloruro férrico, ferricianuro de potasio, ácido tánico y los empleados en la detección de alcaloides.

Para la cromatografía en capa fina se empleo silica gel GF_{254} tipo 60 de la Casa Merck en soporte de vidrio y placas flexibles de celulosa microcristalina "Baker-flex" de la Casa J.T. Baker.

Se usó un cromatógrafo de gases "Varian" modelo 3700 y una columna FFAP 10% en chromosorb WHP. El espectrofotómetro usa-

do fué "Varian" modelo 634.

Especificaciones adicionales se encuentran en la metodología.

El trabajo se realizó en tres etapas:

1a. Trabajo de campo, en el cual se hicieron las colectas, pruebas químicas preliminares y la primera extracción etanólica.

2da. Trabajo de laboratorio, en el cual se efectuó la extracción y algunas determinaciones de:

Aceites esenciales (Cualitativo y cuantitativo)

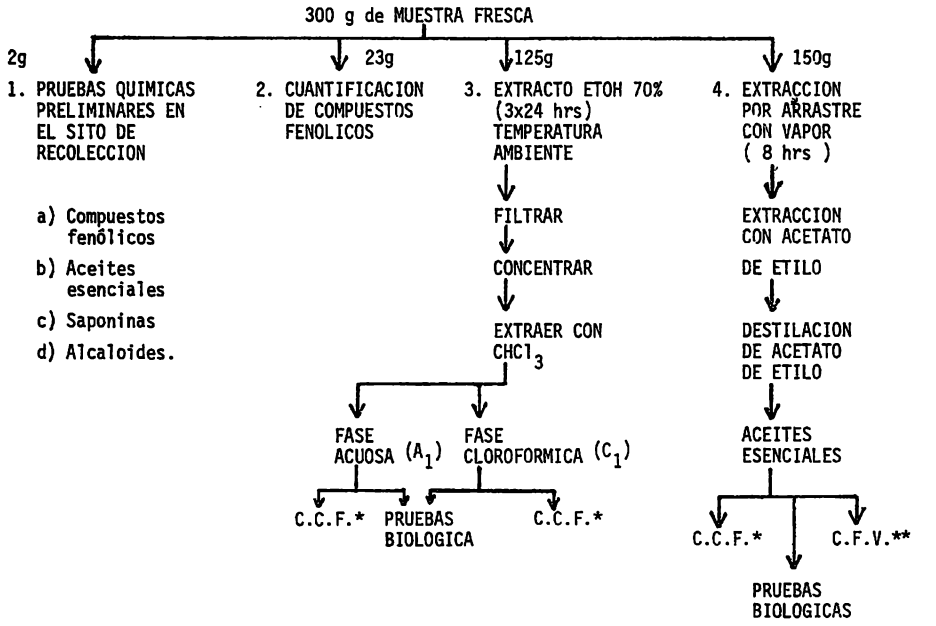
Compuestos fenólicos (Cuantitativo)

y el análisis preliminar del

Extracto etanólico

3ra. El trabajo químico se complementó con un estudio de pruebas biológicas que se lleva a cabo en forma paralela por un grupo de trabajo del Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recuros Bióticos.

Se colectaron 300 g de material fresco que se procesaron de acuerdo al siguiente esquema:



3.3.1 Pruebas Químcas preliminares en el sitio de recolección.

Se tomaron dos gramos de planta fresca que se procesaron en la propia estación de la siguiente manera: La mitad se trituró en un mortero y se extrajo con metanol. Se filtró y el filtrado se dividió en dos alícuotas a las cuales se les reali-

* C.C.F. - Cromatografía en capa fina.

** C.F.V. - Cromatografía en fase de vapor.

zaron las pruebas siguientes:

Prueba de fenoles.- A una de las alícuotas se le agregó una gota de cloruro férrico, se mezcló y se le añadió una gota de ferricianuro de potasio, se mezcló y se observó si había coloración azul lo que indica presencia de compuestos fenólicos.

Prueba de alcaloides.- Otra alícuota se aciduló con H_2SO_4 0.1 N y se dividió en cuatro porciones, a cada una se le añade una gota de reactivo de Mayer, Dragendorff, Wagner y ácido fosfotúngstico respectivamente, dando precipitados amarillo, anaranjado, amarillo y café también respectivamente en caso de haber alcaloides.

Prueba de saponinas.- La otra mitad del material fresco se colocó en un tubo de ensayo agregando 2 ml de agua destilada, la mezcla se agitó vigorosamente y se observó si había formación de espuma permanente lo que es indicio de la presencia de saponinas.

Prueba de aceites esenciales.- Estos se detectaron por su olor característico.

Los resultados de esta parte experimental se muestran en la tabla 1.

TABLA No. 1 PRUEBAS QUIMICAS PRELIMINARES

EN EL SITIO DE RECOLECCION

	ALCALOIDES				COMPUESTOS FENOLICOS	ACEITES ESENCIALES	SAPONINAS
	M.	D.	W.	F.			
O. oleifera (menos dañadas)	-	+	-	+	+++	±	-
O. oleifera (más dañadas)	-	+	-	++	+++	±	-
N. ambigens (menos dañadas)	-	+	-	+	++	+	-
N. ambigens (más dañadas)	-	+	-	++	++	+	-
L. alata (menos dañadas)	-	+	-	+	++	++	-
L. alata (más dañadas)	-	++	-	+	++	++	-

M = Mayer
D = Dragendorff
W = Wagner
F = Ac. fosfotúngstico

3.3.2 Cuantificación de Compuestos Fenólicos.

3.3.2.1 Determinación de humedad.

El porciento de humedad en la muestra se determinó secando a 60°C hasta peso constante en una estufa a vacío (20 mm Hg). Las muestras utilizadas fueron de 2.5 g y la determinación se hizo por triplicado.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

3.3.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos.

Se siguió el método de Price y Butler (32), con algunas modificaciones que indicamos a continuación:

Se colocan 6g de hojas frescas en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 60 ml de agua destilada y se agita vigorosamente durante dos minutos. Se filtra y se toma una alícuota de 5 ml aforando a 50 ml con agua. Una alícuota de 1 ml del filtrado se afora a 5 ml con agua. Se añade 0.3 ml de cloruro férrico y se mezcla. Inmediatamente después se adiciona 0.3 ml de ferricianuro de potasio y se mezcla. Se deja reposar exactamente 10 minutos y se lee la absorbancia a 720 nm. Este análisis se realizó por triplicado para eliminar en lo posible el error experimental.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

3.4.2.3 Curva patrón de ácido tánico.

Se utiliza un blanco con agua destilada y se realiza una curva patrón con ácido tánico R.A. a concentraciones de 1 a 6 μg/ml.

Los resultados se muestran en la tabla 2.

Los cálculos efectuados fueron los siguientes:

% peso seco = 100 - % de humedad.

Concentración (μg/ml) = se extrapola de la curva

Concentración (μg/g de material fresco) = μg/ml X 100

$$\text{Concentración } (\mu g/g \text{ de material seco}) = \mu g/\text{ g fresco} \times \frac{100}{\% \text{ peso seco}}$$

TABLA No. 2 CURVA PATRON DE ACIDO TANICO

CONCENTRACION $\frac{mg}{ml}$	ABSORBANCIA
0	0.000
1	0.297
2	0.580
3	0.910
4	1.126
5	1.570
6	1.830

FIGURA No. 2

CURVA PATRON DE ACIDO TANICO

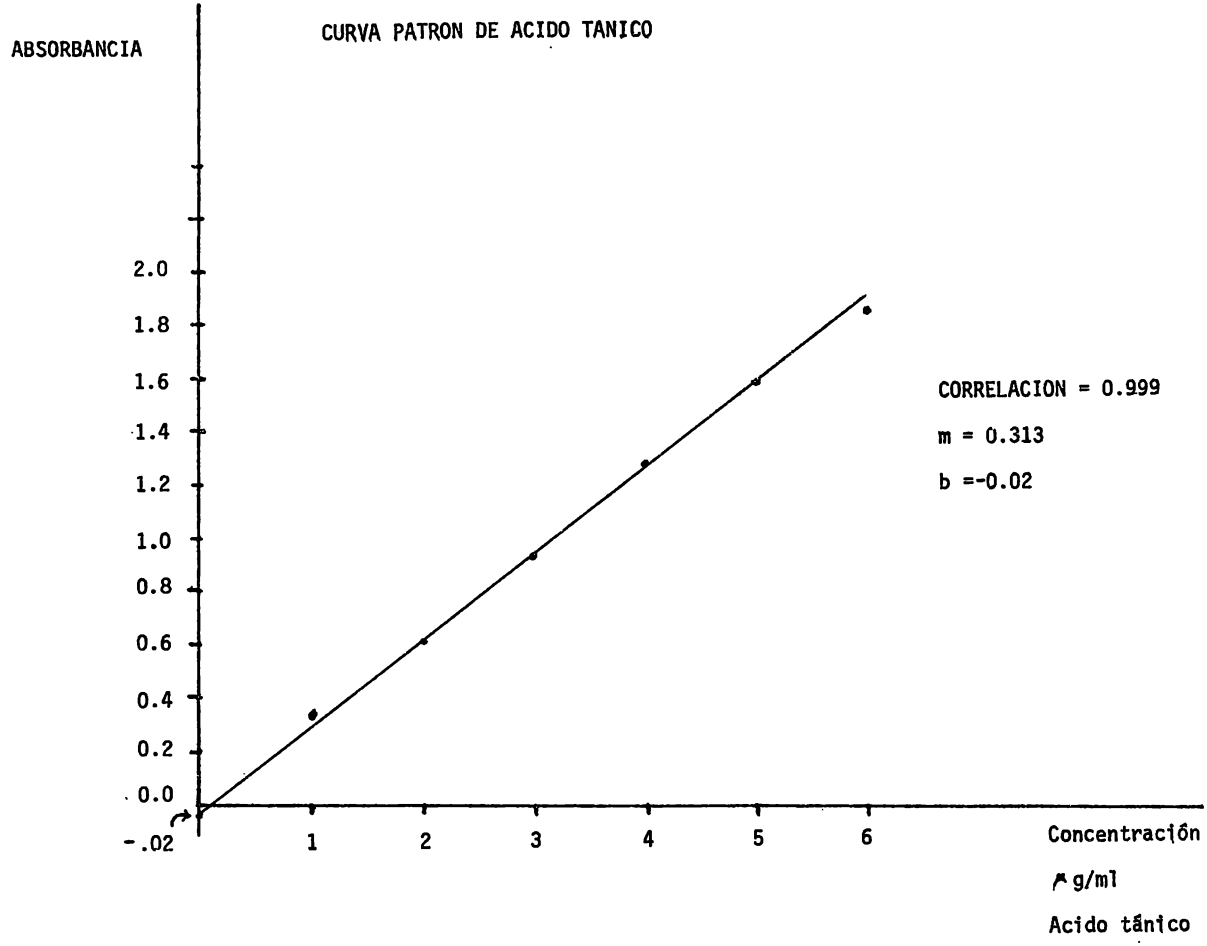


TABLA No. 3 DIFERENCIAS CUANTITATIVAS DE COMPUESTOS FENOLICOS (CALCULADOS COMO ACIDO TANICO) DE ESTADOS JUVENILES CON RESPECTO AL GRADO DE INFECCION.

MUESTRA	Absorbancia promedio	S*	Concent. µg/ml (como ác. tánico)	% humedad	% peso seco	Concent. µg/g fresco	Concent. mg/g seco	% peso seco
Omphalea oleifera menos dañadas	0.195	0.042	0.7	82	18.0	70	0.388	0.038
O. oleifera más dañadas	0.464	0.112	1.56	82	18.0	156	0.866	0.086
Nectandra ambigens menos dañadas	0.301	0.027	1.00	49.8	50.2	100	0.199	0.0199
N. ambigens más dañadas	0.518	0.031	1.75	49.8	50.8	175	0.344	0.034
Licaria alata menos dañadas	0.189	0.032	0.68	68.6	31.4	68	0.216	0.0216
L. alata más dañadas	0.179	0.030	0.65	68.6	31.4	65	0.207	0.0207

* S = desviación estándar.

3.3.3 Extracción y examen preliminar de la fracción acuosa (A_1) y clorofórmica (C_1) del extractos etanólicos.

Ciento veinticinco gramos de material fresco se extraen con etanol al 70% a temperatura ambiente durante 24 horas tres veces consecutivas. Se filtra y se concentra a rotavapor a una temperatura menor de 60°C. Se extrae tres veces con porciones de 100 ml de cloroformo de tal manera que se obtienen dos fracciones: una soluble en cloroformo (fracción clorofórmica "C_1") y otra insoluble (fracción acuosa "A_1").

La fracción clorofórmica (C_1) se concentra a ratovapor hasta la eliminación total del disolvente y obtención de un polvo café que se cromatografía en capa fina utilizando silica gel GF_{254} como adsorbente y cloroformo-metanol (9:1) como eluyente. Las placas se revelan usando luz UV onda larga y anisaldehído-ácido sulfúrico(Tabla 4). Con este extracto seco se realizaron posteriormente pruebas biológicas* de actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias fitopatógenas aislados de la misma especie en estudio y de otras especies, utilizando para ello el método de germinación de esporas en portaobjetos, propuesto

* Las pruebas biológicas se llevaron a cabo por otro grupo de trabajo perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.

por Sharvelle en 1969 (36), el cual consiste en colocar en un portaobjetos una gota de suspensión conocida de esporas del hongo de prueba (50000 esporas/ml), que en nuestro caso fué Helminthosporium maidys y una gota de la solución de aceites esenciales a diferentes diluciones (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) las cuales se efectuaron con un sistema de acetona-agua (10:1). El portaobjetos se coloca dentro de una caja de petri con un papel humedecido y se sella con pepel parafilm. Se incuba a 26°C durante 20 horas y pasado este tiempo se cuenta el número de esporas germinadas y sin germinar en 6 diferentes campos en un microscopio de luz.

Se aplica la prueba de "F" para saber si existe diferencia significativa en la inhibición del hongo de prueba entre las poblaciones más dañadas y menos dañadas de la especie bajo estudio.

TABLA No. 4 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE FRACCION CLOROFORMICA C_1* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE Licaria alata.

COLECTA No. 2

Poblaciones menos dañadas		Poblaciones más dañadas	
Mancha	Rf	Mancha	Rf
1	0.02	1	0.02
2	0.10	2	0.10
3	0.24	3	0.24
4	0.35	4	0.35
-	----	5+	0.40
-	----	6+	0.43
7+	0.46	-	----
-	----	8+	0.55
9	0.65	9	0.65
10	0.83	10	0.83

ADSORBENTE: Silica gel GF_{254}

ELUYENTE: Cloroformo-metanol 9:1

Revelador: Anisaldehído-H_2SO_4

*Véase tabla del método general (p. 31)

+Componentes que difieren entre las poblaciones.

La fase acuosa (A_1) se liofiliza y el sólico obtenido se cromatografía en capa fina usando celulosa microcristalina como adsorvente y butano-ácido acético-agua (8:2:3) como eluyente. Como reveladores se usaron luz UV onda larga y anisaldehído-H_2SO_4. Con este sólido se efectuaron pruebas biológicas como las mencionadas en la pag. 31

Los resultados se muestran en la tabla 5.

3.3.4 Extracción y examen de la composición de aceites esenciales.

150 g de muestra fresca se extrajeron por destilación con arrastre de vapor durante 8 horas. Los aceites suspendidos en el agua del arrastre se extraen tres veces con acetato de etilo (por cada litro de agua se usaron 200 ml de acetato de etilo). Se satura el agua con NaCl y se vuelve a extraer dos veces en las mismas condiciones. Se elimina el acetato de etilo por destilación fraccionada obteniéndose el aceite esencial al que se le hacen los siguientes análisis.

-Cromatografía en capa fina.

Se usó silica gel GF_{254} como adsorbente, hexano-acetato de etilo (1:1) como eluyente y como reveladores yodo y anisaldehído-H_2SO_4.

Los resultados se muestran en las tablas 6, 7 y 8 para L. alata, N. ambigens y O. oleifera respectivamente.

-Cromatografía en fase de vapor.

Condiciones:

Cromatógrafo de gases "Varian" Modelo 3700

Columna FFAP 10% en Chomosorb WHP

Cantidad de muestra = 2 μl

Programa: Temperatura inicial = 80°C mantenida durante 2 minutos hasta una temperatura final de 220°C a velocidad de 4°C/min mantenida por 5 minutos

Atenuación = 4×10^{-9}.

Velocidad de la carta = 0.5 cm/min.

-Gas acarreador = nitrógeno.

-Flujo de gas acarreador = 25 ml/min.

-Flujo de hidrógeno = 30 ml/min.

-Flujo de aire = 300 ml/min.

-Se utilizó una columna de vidrio en espiral de 200 cm de largo con diámetro externo de 2 mm y de diámetro interno de 0.85 mm.

-Temperatura del detector = 250°C.

-Temperatura del inyector = 250°C.

Se utilizó como patrón externo una mezcla de terpenos puros (tabla 15 y figura 9) que se escogieron tomando en consideración criterios quimiotaxonómicos (22). Por otra parte y en las mismas condiciones se corrieron cromatogramas de los extractos obtenidos por arrastre de vapor. Cuando los tiempos de retención de terpenos coincidieron con algunos de los componentes de los aceites

esenciales extraído, éstos se usaron como patrones internos observando si hay un incremento en el área correspondiente. Se identificaron así algunos componentes (tabla 15).

La cuantificación de cada componente de los aceites esenciales se llevó a cabo por el método de triangulación del área bajo la curva.

Los resultados de esta cuantificación y los tiempos de retención de los aceites esenciales se muestran en las tablas 9 a 14 basados en los cromatogramas de las figuras 3 a 8.

Se seleccionaron los componentes cuyos porcentajes relativos diferían en más de 3% entre las poblaciones más dañadas y las menos dañadas y se indican en las tablas 16, 17 y 19 para las tres especies estudiadas.

En las tablas 19, 20, 21 se muestran los componentes que difieren en un porcentaje mayor de 3 en cuanto a la temporada de colecta para dos poblaciones de L. alata, N. ambigens y Q. oleifera, respectivamente.

Finalmente en la tabla 22 se muestran los componentes que varían solo con el grado de infección y no con la temporada de colecta y que presentan una diferencia mayor de 3%.

-Pruebas biológicas*. Se prueba la actividad antimicrobiana de estos aceites esenciales contra hongos y bacterias fitopatógenas aisladas de la misma o de otras plantas (véase pag. 31).

* Se llevaron a cabo por otro grupo de trabajo perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.

TABLA No. 5 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LA FRACCION ACUOSA (A_1)* DE EXTRACTOS ETANOLICOS.

Omphalea oleifera		*Nectandra ambigens*		*Licaria alata*	
Menos Dañadas	Más Dañadas	Menos Dañadas	Más Dañadas	Menos Dañadas	Más Dañadas
Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
0.01	0.01	0.01	0.01	0.30	0.30
0.1	0.1	0.1	0.1	----	Δ 0.38
0.19	0.19	0.22	0.22	0.46	0.46
0.32	0.32	0.27	0.27	0.58	0.58
0.48	0.48	0.32	0.32	0.64	0.64
0.94	0.94	----	Δ 0.40	0.74	0.74
--	Δ 0.94** (color rojo)	0.46	0.46	----	Δ 0.81
		0.51	0.51	0.94	0.94
		----	Δ 0.56		
		0.61	0.61		
		0.74	0.74		
		----	Δ 0.83		
		0.94	0.94		

** Detectado por U.V.

Δ Componentes que difieren entre poblaciones.

* Véase tabla del método general (pag.34)

CELULOSA MICROCRISTALINA

BUTANOL-ACIDO ACETICO-AGUA (8:2:3)

ANISALDEHIDO-H_2SO_4 } REVELADORES

LUZ U.V. ONDA LARGA. }

TABLA No. 6 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ACEITES ESENCIALES DE *Licaria alata*.

COLECTA No. 2

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
Mancha	Rf	Color	Mancha	Rf	Color
1	0.006	Amarillo	1	0.006	Amarillo
2	0.06	Amarillo	2	0.06	Amarillo
3	0.16	Rosa	3+	0.16	Rosa Intenso
4	0.51	Rosa	4	0.51	Rosa
5	0.67	Café Rojizo	5	0.67	Café Rojizo
6	0.72	Azul	6	0.72	Azul
7	0.8	Rosa	7+	0.8	Rosa Intenso
8	0.88	Café Rojizo	8	0.88	Café Rojizo
9+	0.88	Verde	9	----	---- ------

ADSORBENTE: SILICA GEL GF_{254}

ELUYENTE: HEXANO-ACETATO DE ETILO 1:1

REVELADOR: ANISALDEHIDO-H_2SO_4

+ Componentes que difieren entre poblaciones.

TABLA No. 7 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ACEITES ESENCIALES DE Nectandra ambigens.

COLECTA No. 2

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
Mancha	Rf	Color	Mancha	Rf	Color
1	0.62	Gris	1	0.62	Gris
2	0.73	Gris	2	0.73	Gris
3+	0.80	Rosa Intenso	3	0.80	Rosa
4	0.87	Café	4	0.87	Café

ADSORBENTE: SILICA GEL GF_{254}

ELUYENTE: HEXANO-ACETATO DE ETILO 1:1

REVELADOR: ANISALDEHIDO-H_2SO_4

+ Componentes que difieren entre poblaciones.

TABLA No. 8 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ACEITES ESENCIALES DE *Omphalea oleifera*.

COLECTA No. 2

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
Mancha	Rf	Color	Mancha	Rf	Color
1	0.28	(Trazas)	1+	0.28	Verde
2	0.46	Amarillo	2	0.46	Amarillo
3	0.68	(Trazas)	3+	0.68	Gris
4+	0.71	Café	-	----	----
5	0.74	Amarillo	5	0.74	Amarillo
-	----	---	6+	0.84	Café

ADSORBENTE: SILICA GEL GF_{254}

ELUYENTE: HEXANO-ACETATO DE ETILO 1:1

REVELADOR: ANISALDEHIDO-H_2SO_4

+ Componentes que difieren entre poblaciones.

TABLA No. 9 COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Licaria alata.

COLECTA No. 1 MARZO 1980

Poblaciones COMPONENTE	Menos dañadas t.ret(min)	%	Poblaciones COMPONENTE	Más dañadas t.ret(min)	%
1	7.6	1.38			
2	8.4	2.46			
3	11.0	5.71	3	11.0	0.84
4	11.2	2.48	4	11.2	0.48
5	12.2	.78	5	12.2	0.48
6	12.8	3.78	6	12.8	0.97
7	13.6	3.43	7	13.6	1.63
8	13.8	5.66			
9	14.6	10.41	9	14.6	2.72
10	15.2	2.96	10	15.2	1.33
11	20.6	1.65	11	20.6	2.57
12	21.0	1.18	12	21.0	1.21
13	22.9	4.26	13	22.9	5.26
14	24.0	5.44	14	24.0	14.71
15	25.1	19.87	15	25.1	31.36
16	26.4	2.96	16	26.4	3.63
17	28.0	1.18	17	28.0	2.90
18	29.6	2.20	18	29.6	2.90
19	30.0	1.79			
20	33.2	10.25	20	33.2	13.24
21	38.0	9.84	21	38.0	12.7
22	41.0	0.94	22	41.0	0.60

FIGURA No. 3

CROMATOGRAFIA EN FASE DE VAPOR DEL ACEITE ESENCIAL DE Licaria alata.

COLECTA No. 1

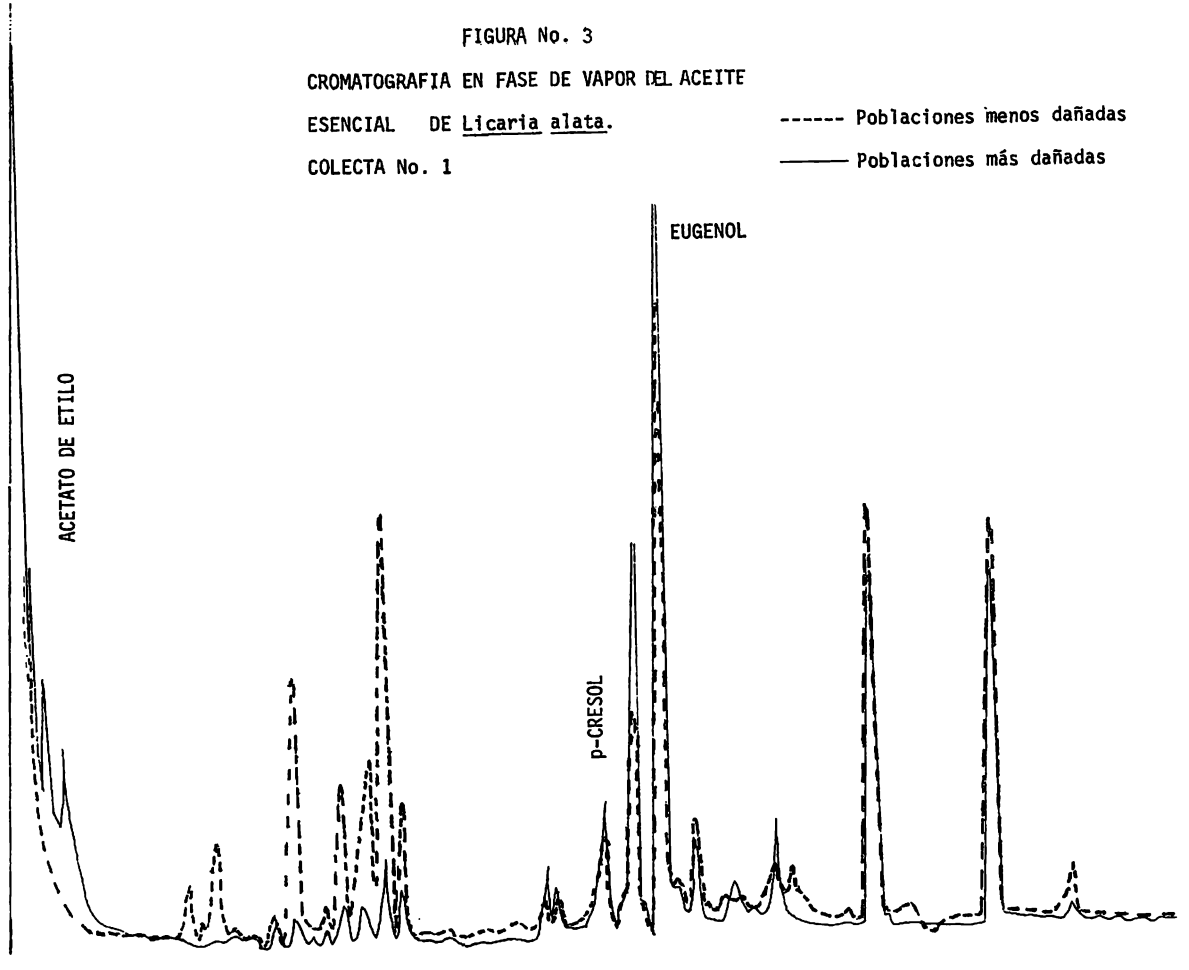


TABLA No. 10 COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Licaria alata.

COLECTA No.2 JULIO 1980

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
COMPONENTE	t ret.(min)	%	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
1	4.7	0.71			
2	7.6	1.42			
3	8.4	3.19	3	8.4	1.29
4	11.0	7.03	4	11.0	1.55
5	11.2	4.15			
6	12.2	0.71			
7	12.8	3.09	7	12.8	1.29
8	13.6	6.82			
9	13.8	5.11	9	13.8	2.14
10	14.6	9.37	10	14.6	6.8
11	15.2	4.04	11	15.2	2.10
12	17.6	3.99			
13	20.6	1.15	13	20.6	3.56
14	21.2	2.55	14	21.2	1.55
15	22.9	4.40	15	22.9	4.30
16	24.0	6.18	16	24.0	17.10
17	25.1	15.13	17	25.1	23.9
18	26.4	2.55	18	26.4	4.76
19	28.0	1.06	19	28.0	2.94
20	29.6	1.70	20	28.4	2.49
21	30.0	1.47	21	29.6	4.46
22	33.2	7.46	22	33.2	10.30
23	38.0	6.39	23	38.0	8.74
24	41.0	0.53	24	41.0	0.64

FIGURA No. 4

CROMATOGRAFIA EN FASE DE VAPOR DEL ACEITE ESENCIAL

DE Licaria alata.

COLECTA No. 2

------ Poblaciones menos dañadas

——— Poblaciones más dañadas

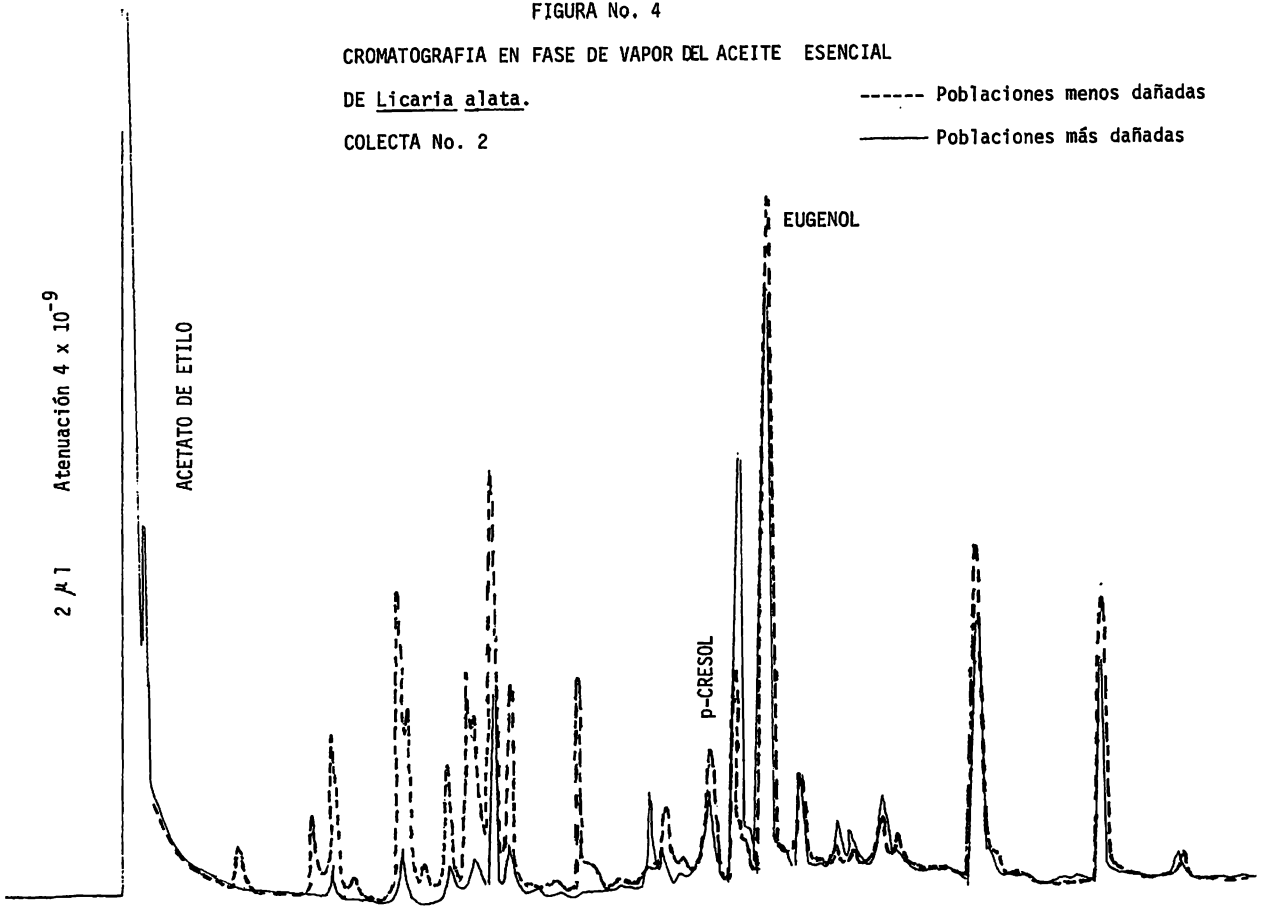


TABLA No. 11 COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Nectandra ambigens.

COLECTA No. 1 MARZO 1980

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
COMPONENTE	t. ret.(min)	%	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
1	4.5	0.98	1	4.8	0.97
2	4.8	0.13	2	7.0	0.34
3	5.2	0.55	3	7.6	0.29
4	5.6	0.44	4	8.2	0.51
5	7.0	0.84	5	9.1	0.97
6	7.6	2.99	6	10.6	1.53
7	8.2	2.60	7	11.0	3.97
8	9.1	2.14	8	11.6	0.51
9	10.2	0.87	9	12.0	0.64
10	10.6	4.63	10	12.5	1.47
11	11.0	6.08	11	12.8	1.26
12	11.6	0.49	12	13.4	6.44
13	12.0	2.08	13	13.9	4.86
14	12.5	1.82	14	14.8	3.15
15	12.8	1.95	15	15.4	0.71
16	13.4	3.35	16	15.8	0.45
17	13.9	4.92	17	16.8	1.35
18	14.8	1.59	18	17.4	5.53
19	15.4	0.11	19	18.8	2.14
20	15.8	1.08	20	20.3	0.64
21	16.8	1.73	21	21.1	5.23
22	17.4	0.81	22	21.6	0.96
23	17.7	1.86	23	22.1	3.61
24	18.8	3.25	24	22.6	7.88
25	20.0	1.57	25	23.8	8.65
26	20.3	2.43	26	24.4	2.82
27	21.1	2.28	27	24.9	2.61

(Continúa en la siguiente página)

TABLA No. 11 (Continuación)

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
COMPONENTE	t. ret.(min)	%	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
28	21.6	1.73	28	25.2	1.21
29	22.1	2.60	29	25.5	1.93
30	22.6	4.41	30	26.2	3.71
31	23.8	2.83	31	26.8	4.26
32	24.4	4.48	32	27.8	1.45
33	24.9	1.60	33	28.1	1.92
34	25.5	1.34	34	28.8	0.71
35	26.2	1.08	35	29.4	3.05
36	26.8	2.43	36	29.8	1.53
37	27.8	2.54	37	30.4	0.80
38	28.1	0.78	38	31.9	0.80
39	28.8	1.31	39	32.2	0.58
40	29.4	2.53	40	33.2	0.96
41	29.8	2.31	41	34.6	2.97
42	30.4	1.91	42	35.6	0.45
43	31.9	1.56	43	40.8	3.39
44	32.2	1.27			
45	33.9	2.38			
46	34.9	2.60			
47	35.6	3.02			
48	40.8	1.56			

Nota: El orden de los componentes está dado por la secuencia de aparición de estos en el cromatograma.

FIGURA No. 5

CROMATOGRAFIA EN FASE DEL VAPOR DE ACEITE ESENCIAL DE Nectandra ambigens. COLECTA No. 1

------ Poblaciones menos dañadas

——— Poblaciones más dañadas.

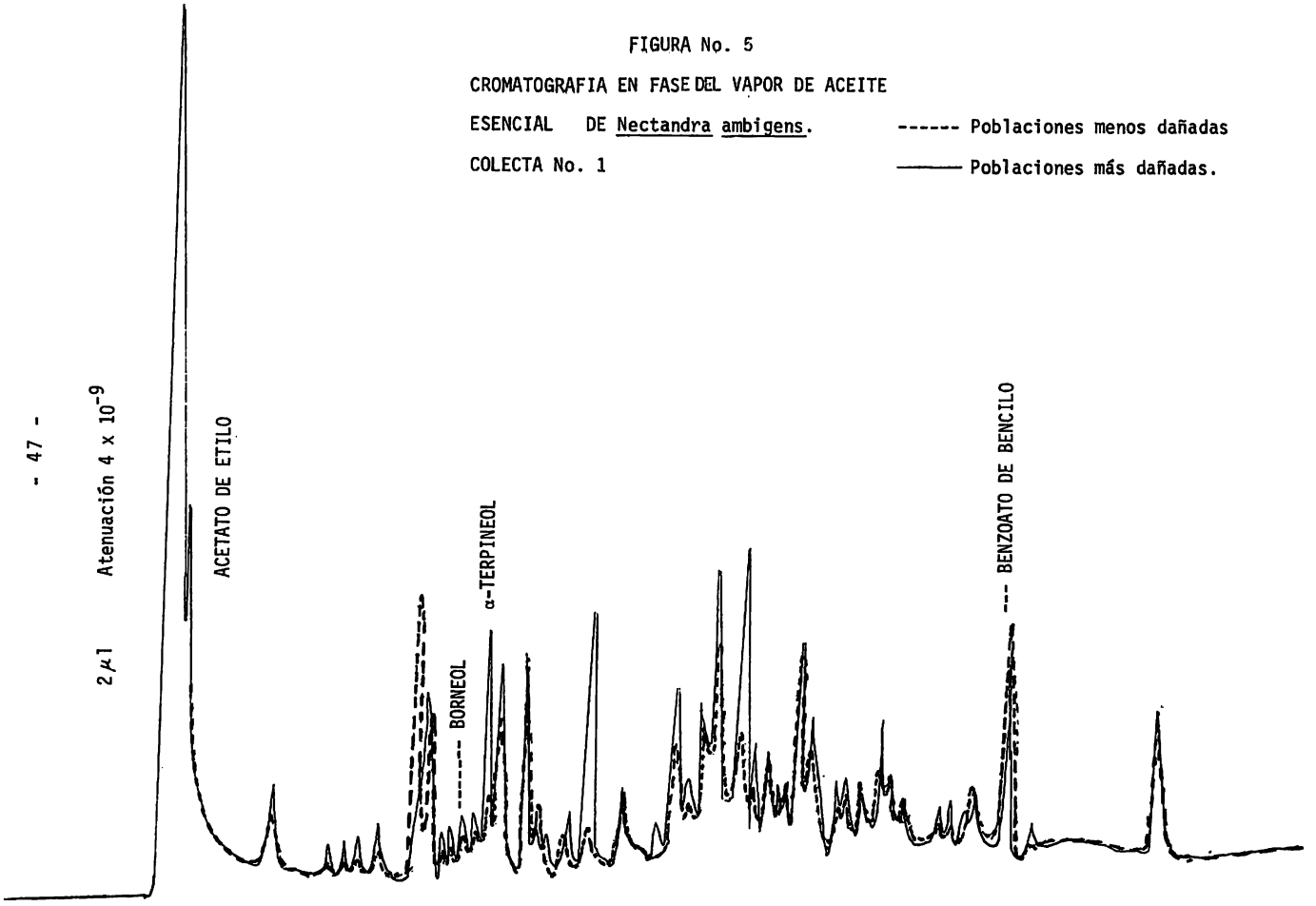


TABLA No. 12 COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Nectandra ambigens.

COLECTA No. 2 JULIO 1980

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
COMPONENTE	t. ret.(min)	%	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
1	4.8	0.3	1	4.8	1.01
2	7.4	0.8	2	7.4	0.78
3	7.6	1.51	3	7.6	1.82
4	8.2	2.06	4	8.2	2.05
5	9.1	3.44	5	9.1	4.15
6	10.2	0.54	6	10.2	0.31
7	10.6	5.55	7	10.6	5.32
8	11.0	6.76	8	11.0	6.81
9	11.6	1.26	9	11.6	1.02
10	12.0	1.87	10	12.0	1.88
11	12.5	2.05	11	12.5	2.74
12	12.8	1.69	12	12.8	1.98
13	13.4	7.08	13	13.4	6.73
14	13.9	4.75	14	13.9	4.85
15	14.2	5.87	15	14.2	4.78
16	14.8	2.71	16	14.8	2.29
17	15.4	0.52	17	15.4	0.58
18	15.8	0.36	18	15.8	0.34
19	16.8	1.39	19	16.8	1.35
20	27.8	1.02	20	17.8	0.88
21	18.0	0.45	21	18.0	0.35
22	18.8	1.28	22	18.8	1.50
23	19.4	0.66	23	19.4	0.70
24	20.3	0.72	24	20.3	1.23
25	20.8	1.26	25	20.8	1.58
26	21.1	2.32	26	21.1	2.46
27	21.6	1.19	27	22.1	2.46

(Continúa en la siguiente página)

TABLA No. 12 (Continuación)

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
COMPONENTE	t. ret.(min)	%	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
28	22.1	2.49	28	22.6	6.00
29	22.6	4.55	29	23.8	7.62
30	23.8	5.80	30	24.4	1.58
31	24.4	1.20	31	24.9	1.37
32	24.9	1.32	32	25.5	1.43
33	25.5	1.20	33	26.2	3.83
34	26.2	3.45	34	26.8	3.29
35	26.8	2.65	35	27.8	1.56
36	27.8	1.26	36	28.1	1.47
37	28.1	1.47	37	29.4	2.19
38	29.4	2.04	38	29.8	1.50
39	29.8	0.85	39	31.9	0.82
40	31.9	0.78	40	32.4	0.51
41	32.4	0.80	41	33.3	1.37
42	33.3	1.33	42	34.6	1.88
43	34.6	2.29	43	40.8	1.85
44	38.2	4.65			
45	40.8	1.97			

Nota: El orden de los componentes está dado por la secuencia de aparición de estos en el cromatograma.

FIGURA No. 6

CROMATOGRAFIA EN FASE DEL VAPOR DE ACEITE ESENCIAL DE Nectandra ambigens.

COLECTA No. 2

------ Poblaciones menos dañadas

——— Poblaciones más dañadas

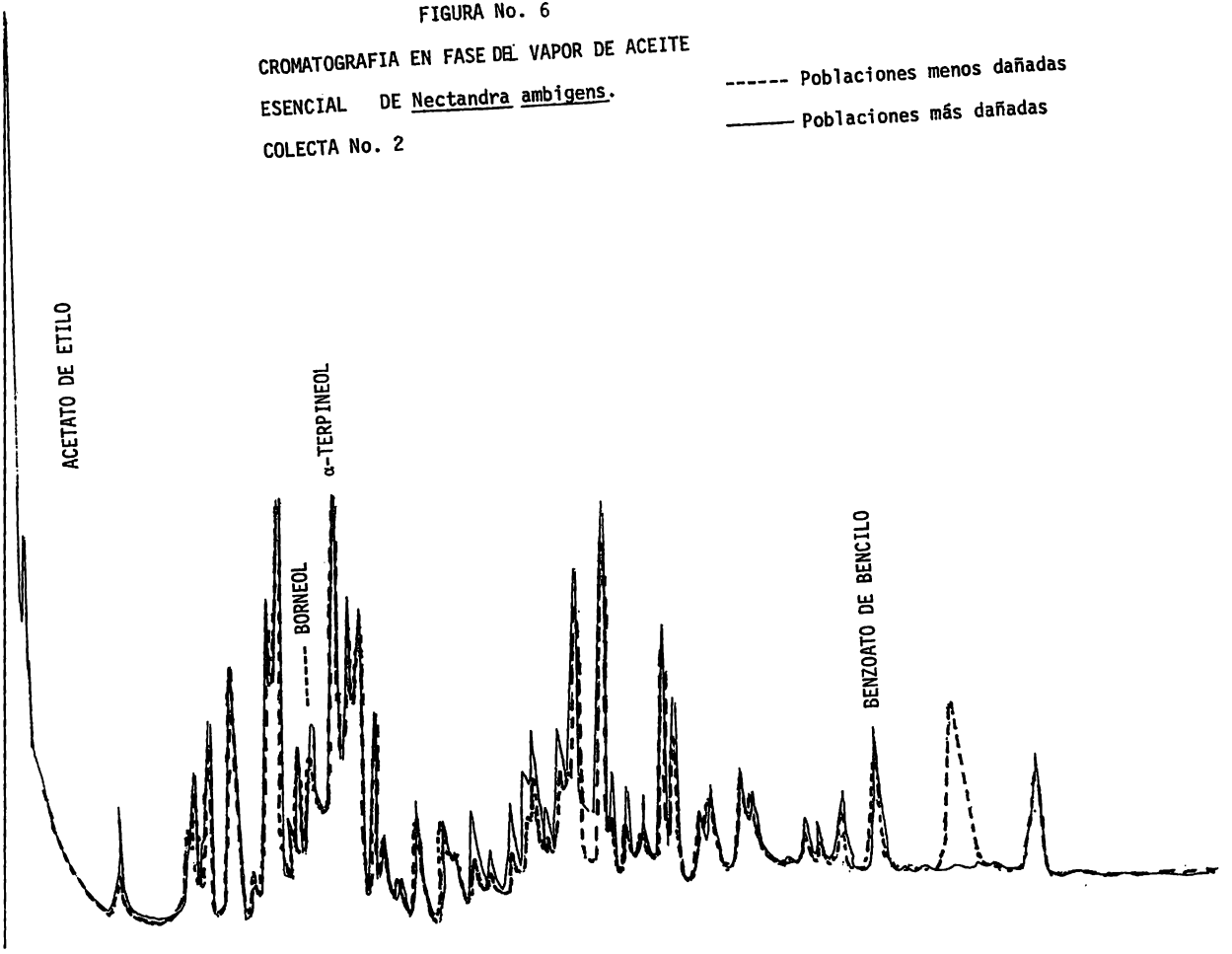


TABLA No. 13 COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Omphalea oleifera.

COLECTA No. 1 MARZO 1980

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
COMPONENTE	t. ret.(min)	%	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
1	3.6	2.38	1	2.3	1.12
2	4.8	1.05	2	3.6	0.87
3	7.0	0.95	3	4.8	1.12
4	9.0	0.53	4	6.4	0.50
5	11.6	1.48	5	7.0	0.50
6	13.8	1.58	6	9.0	0.62
7	14.3	3.49	7	11.6	0.62
8	16.6	1.90	8	12.3	1.25
9	17.0	2.91	9	14.3	0.87
10	18.0	2.38	10	17.0	1.00
11	19.8	4.44	11	18.0	1.09
12	20.6	2.38	12	19.8	3.56
13	21.2	3.49	13	20.6	1.31
14	22.0	3.49	14	21.2	2.44
15	24.2	3.17	15	22.0	3.00
16	24.8	3.49	16	22.9	0.93
17	27.9	1.69	17	23.7	1.56
18	29.4	6.98	18	24.2	3.19
19	32.2	1.90	19	24.8	12.01
20	33.0	4.12	20	25.3	1.00
21	34.6	22.22	21	26.8	1.00
22	36.0	1.48	22	27.9	0.94
23	37.4	2.11	23	29.4	7.32
24	38.5	15.23	24	32.2	2.81
25	40.6	5.07	25	33.0	3.94

(Continúa en la siguiente página)

TABLA No. 13 (Continuación)

Poblaciones menos dañadas	Poblaciones más dañadas		
	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
	26	34.6	18.01
	27	35.4	1.25
	28	36.0	3.00
	29	37.4	3.50
	30	38.5	9.00
	31	40.6	10.51

Nota: El orden de los compuestos está dado por la secuencia de aparición de estos en el cromatograma.

FIGURA No. 7

CROMATOGRAFIA EN FASE DE VAPOR DEL ACEITE ESENCIAL DE Omphalea oleifera.
COLECTA No. 1

------ Poblaciones menos dañadas
——— Poblaciones más dañadas

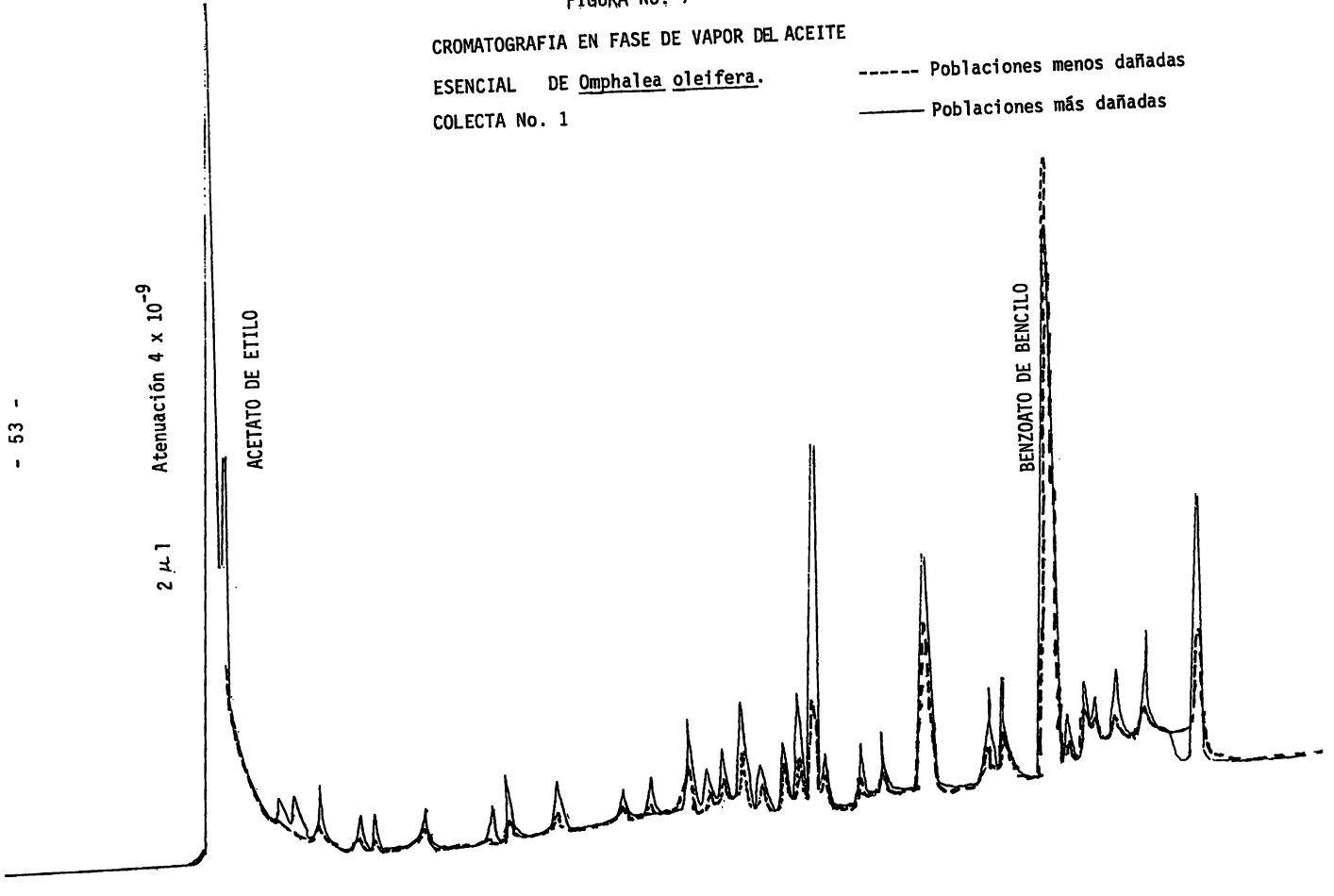


TABLA No. 14 COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Omphalea oleifera.

COLECTA No. 2 JULIO 1980

Poblaciones menos dañadas			Poblaciones más dañadas		
COMPONENTE	t. ret.(min)	%	COMPONENTE	t. ret.(min)	%
1	6.4	1.06	1	4.8	2.03
2	9.0	1.60	2	14.3	1.15
3	11.6	2.16	3	16.6	1.15
4	12.4	1.33	4	17.0	0.92
5	13.8	1.80	5	17.5	2.77
6	14.3	3.00	6	19.3	1.48
7	16.6	2.60	7	19.8	1.94
8	17.0	3.20	8	20.6	24.16
9	19.8	11.60	9	22.0	8.79
10	20.6	7.00	10	22.9	1.29
11	21.2	8.00	11	24.2	1.38
12	22.0	2.60	12	24.8	1.11
13	22.9	2.00	13	25.3	2.40
14	23.4	2.20	14	26.8	1.66
15	24.2	3.00	15	28.3	6.39
16	24.8	1.80	16	29.4	16.94
17	25.2	1.80	17	29.8	1.85
18	27.9	2.40	18	30.8	1.11
19	29.4	3.20	19	34.6	5.74
20	29.8	2.20	20	26.0	1.66
21	32.2	2.40	21	38.5	2.50
22	33.0	2.20	22	40.6	12.22
23	34.6	18.20			
24	36.0	1.06			
25	36.4	0.93			
26	38.5	4.80			
27	40.6	5.80			

Nota: El orden de los compuestos está dado por la sencuencia de aparición de estos en el cromatograma.

FIGURA No. 8

CROMATOGRAFIA EN FASE DE VAPOR DEL ACEITE ESENCIAL DE Omphalea oleifera COLECTA No. 2

------ Poblaciones menos dañadas

——— Poblaciones más dañadas

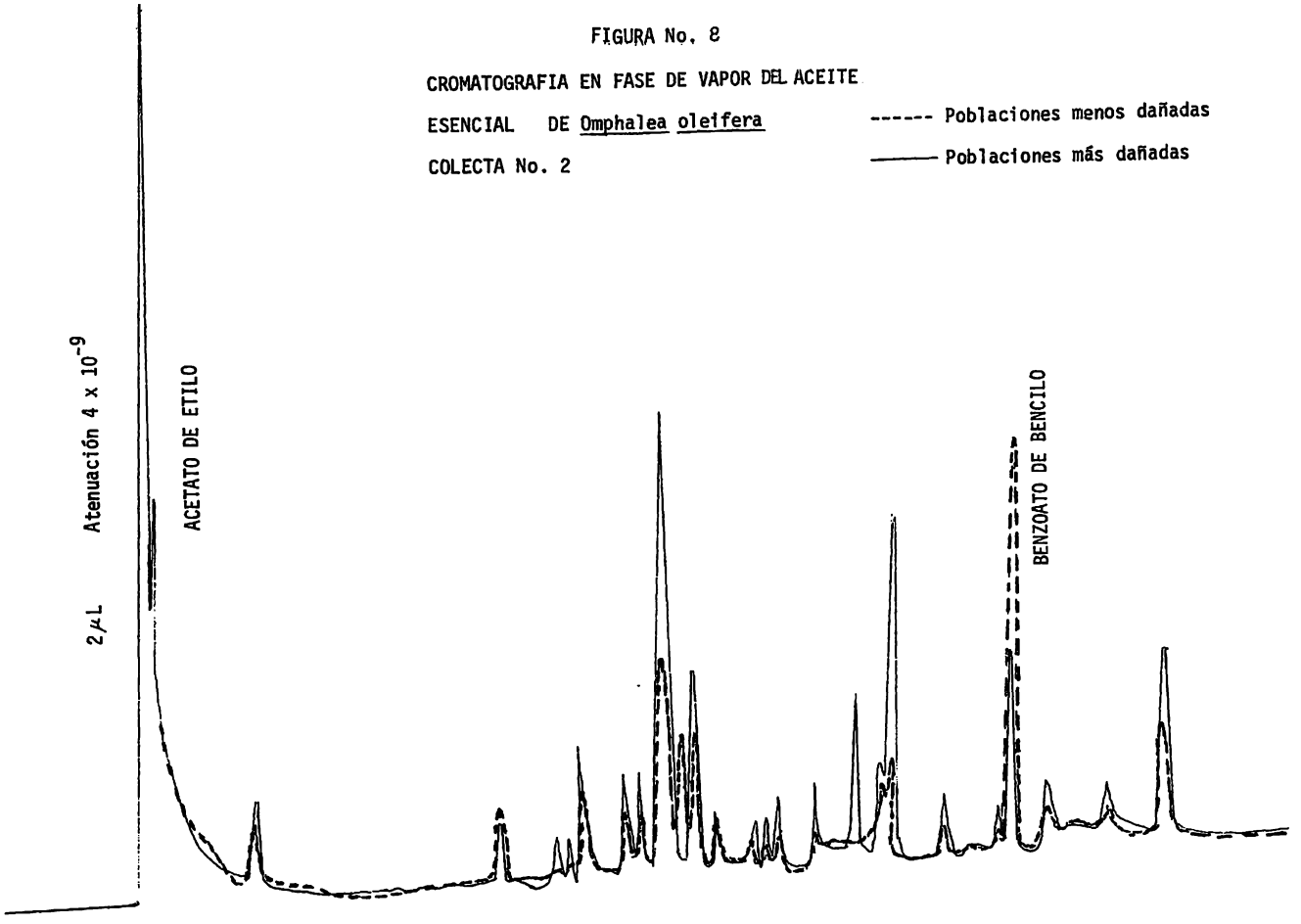


TABLA No. 15 IDENTIFICACION DE COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES POR ADICION DE UN PATRON.

PATRON	t.ret.(min)	Licaria alata	Omphalea oleifera	Nectandra ambigens
METILEUGENOL	21.4	-	-	-
CINAMALDEHIDO	22.2	-	-	-
CUMINALDEHIDO	15.6	-	-	-
BENZALDEHIDO	8.6	-	-	-
p-CRESOL	22.9	+	-	-
EUGENOL	25.1	+	-	-
CAMFENO	1.3	-	-	-
1,8-CINEOL	2.5	-	-	-
p-CIMENO	3.4	-	-	-
NEROL	16.2	-	-	-
α-TERPINEOL	13.4	-	-	+
BORNEOL	12.5	-	-	+
SAFROL	18.0	-	-	-
MIRCENO	1.9	-	-	-
GERANIOL	16.2	-	-	-
PINENO	1.4	-	-	-
BENZOATO DE BENCILO	34.6	-	+	+
LINALOL	9.4	-	-	-

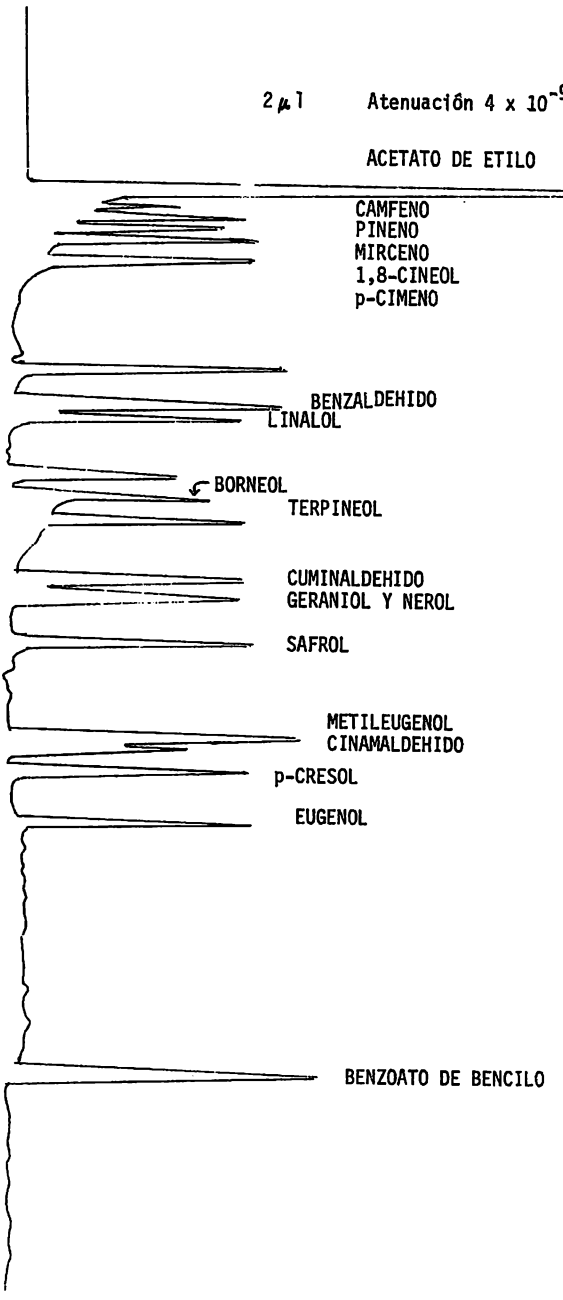


FIGURA No. 9

CROMATOGRAFIA EN FASE DE VAPOR DE DE LA MEZCLA DE SUSTANCIAS USADAS COMO PATRONES.

TABLA No. 16 DIFERENCIAS CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS EN LA COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Licaria alata. TOMANDO EN CUENTA EL GRADO DE INFECCION. (Diferencias mayores de 3%).

COLECTA No. 1

Poblaciones más dañadas			Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTES	t. ret. (min)	%	COMPONENTE	%	en %
	11.0	0.84	11.0	5.71	+ 4.87
			13.8	5.66	+ 5.66
	14.6*	2.72	14.6	10.41	+ 7.69
	24.0	14.71	24.0	5.44	- 9.27
eugenol	25.1*	31.36	25.1*	19.87	-11.49

COLECTA No. 2

Poblaciones más dañadas			Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE	t. ret. (min)	%	COMPONENTE	%	en %
	11.0	1.55	11.0	7.03	+ 5.48
			11.2	4.15	+ 4.15
			13.6*	6.82	+ 6.82
			17.6*	3.99	+ 3.99
	24.0	17.1	24.0	6.18	-10.92
eugenol	25.1*	23.9	25.1*	15.13	- 8.77

Signo (+) mayor cantidad en poblaciones menos dañadas
* varía también con respecto a la temporada de colecta
—— componente que se presenta en ambas colectas

TABLA No. 17 DIFERENCIAS CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS EN LA COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Nectandra ambigens*. TOMANDO EN CUENTA EL GRADO DE INFECCION.

COLECTA No. 1 (Diferencias mayores de 3%)

Poblaciones más dañadas			Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE	de t. ret. (min)	%	COMPONENTE de t. ret.	%	en %
	10.6*	1.53	10.6	4.63	+ 3.1
α-terpineol	13.4	6.44	13.4*	3.55	- 3.09
	17.4*	5.53	17.4	0.81	- 4.72
	22.6	7.88	22.6	4.41	- 3.47
	23.8	8.65	23.8	2.83	- 5.82

COLECTA No. 2 (Diferencias mayores de 3%)

Poblaciones más dañadas			Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE	de t. ret. (min)	%	COMPONENTE de t. ret.	%	en %
			38.2	4.65	+ 4.65

Signo (+) indica mayor cantidad en poblaciones menos dañadas
* componente que también varía con respecto a la temporada de colecta.

TABLA No. 18 DIFERENCIAS CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS EN LA COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Omphalea oleifera. TOMANDO EN CUENTA EL GRADO DE INFECCION. (Diferencias mayores de 3%)

COLECTA No. 1

Poblaciones más dañadas			Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE	t. ret. (min)	%	COMPONENTE t. ret.	%	en %
	24.8*	12.01	24.8	3.49	- 8.52
benzoato de bencilo	34.6*	18.01	34.6*	22.22	+ 4.21
	38.5	9.0	38.5*	15.23	+ 6.23
	40.6	10.51	40.6	5.07	- 5.44

COLECTA No. 2

Poblaciones más dañadas			Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE	t. ret. (min)	%	COMPONENTE t. ret.	%	en %
	19.8	1.94	19.8*	11.60	+ 9.66
	20.6*	24.16	20.6*	7.0	-17.16
			21.2*	8.0	+ 8.0
	22.0*	8.79	22.0	2.60	- 6.19
	28.3*	6.39			- 6.39
	29.4*	16.94	29.4*	3.20	-13.74
benzoato de bencilo	34.6*	5.74	34.6*	18.90	+12.46
	40.6	12.22	40.6	5.80	- 6.42

Signo (+) mayor cantidad en poblaciones menos dañadas
* varía también con respecto a la temporada de colecta
—— componente que se presente en ambas colectas.

TABLA No. 19 DIFERENCIAS CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS EN LA COMPOSICION DEL ACEITES ESENCIAL DE Licaria alata. TOMANDO EN CUENTA LA TEMPORADA DE COLECTA (Diferencias mayores de 3%)

Poblaciones más dañadas

COLECTA No. 1			COLECTA No. 2		Diferencia en %
COMPONENTE	en t. ret. (min)	%	COMPONENTE en t. ret.	%	
	14.6*	2.72	14.6	6.8	+ 4.08
eugenol	25.1*	31.36	25.1*	23.9	- 7.46
	38.0	12.7	38.0	8.74	- 3.96

Poblaciones menos dañadas

COLECTA No. 1			COLECTA No. 2		Diferencia en %
COMPONENTE	en t. ret. (min)	%	COMPONENTE en t. ret.	%	
	13.6	3.43	13.6*	6.82	+ 3.39
			17.6*	3.99	+ 3.99
eugenol	25.1	19.87	25.1*	15.13	- 4.74

Signo (+) indica mayor cantidad en segunda colecta
* componente que también presenta variación con respecto al grado de infeccion
—— componente que se presenta en ambos grados de infección.

TABLA No. 20 DIFERENCIAS CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS EN LA COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Nectandra ambigens* TOMANDO EN CUENTA LA TEMPORADA DE COLECTA (Diferencias mayores de 3%)

Poblaciones más dañadas

COLECTA No. 1			COLECTA No. 2		Diferencia en %
COMPONENTE	en t. ret. (min)	%	COMPONENTE en t. ret.	%	
	9.1	0.97	9.1	4.15	+ 3.18
	10.6*	1.53	10.6	5.32	+ 3.29
			14.2	4.78	+ 4.78
	17.4*	5.53			- 5.53

Poblaciones menos dañadas

COLECTA No. 1			COLECTA No. 2		Diferencia en %
COMPONENTE	en t. ret. (min)	%	COMPONENTE en t. ret.	%	
α-terpineol	13.4*	3.35	13.4	7.08	+ 3.73
			14.2	5.87	+ 5.87
	24.4	4.48	24.4	1.20	- 3.28

Signo (+) indica mayor cantidad en segunda colecta
* componente que también presenta variación con respecto al grado de infección
—— componente que se presenta en ambos grados de infección.

TABLA 21 DIFERENCIAS CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS EN LA COMPOSICION DEL ACEITE ESENCIAL DE Omphalea oleifera. TOMANDO EN CUENTA LA TEMPORADA DE COLECTA (Diferencias mayores de 3%)

Poblaciones más dañadas

COLECTA No. 1		COLECTA No. 2		Diferencia en %
COMPONENTE en t. ret. (min)	%	COMPONENTE en t. ret.	%	
20.6	1.31	20.6*	24.16	+22.85
22.0	3.0	22.0*	8.79	+ 5.79
24.8*	12.01	24.8	1.11	-10.90
		28.3*	6.39	+ 6.39
29.4	7.32	29.4*	16.94	+ 9.62
benzoato de bencilo 34.6*	18.01	34.6*	5.74	-12.27
37.4	3.5			- 3.5

Poblaciones menos dañadas

COLECTA No. 1		COLECTA No. 2		Diferencia en %
COMPONENTE en t. ret. (min)	%	COMPONENTE en t. ret.	%	
19.8	4.44	19.8*	11.6	+ 7.16
20.6	2.38	20.6*	7.0	+ 4.62
21.2	3.49	21.2*	8.0	+ 4.51
29.4	6.98	29.4*	3.20	- 3.78
benzoato de bencilo 34.6*	22.22	34.6*	18.2	- 4.02
38.5*	15.23	38.5	4.80	-10.43

Signo (+) indica mayor cantidad en segunda colecta
* componente que también presenta variación con respecto al grado de infección
——— componente que se presenta en ambos grados de infección.

TABLA No. 22 COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES QUE VARIAN CON RESPECTO AL GRADO DE INFECCION Y NO CON LA TEMPORADA DE COLECTA

1. Nectandra ambigens

COLECTA No. 1

Poblaciones más dañadas		Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE de t. ret.(min)	%	COMPONENTE de t. ret.(min)	%	en %
22.6	7.88	22.6	4.41	- 3.47
23.8	8.65	23.8	2.83	- 5.82

COLECTA No. 2

Poblaciones más dañadas		Poblaciones menos dañadas		Diferencia en %
		38.2 min	4.65	+ 4.65

2. Omphalea oleifera

COLECTA No. 1

Poblaciones más dañadas		Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE de t. ret.(min)	%	COMPONENTE de t. ret. (min)	%	en %
40.6	10.51	40.6	5.07	- 5.44

COLECTA No. 2

Poblaciones más dañadas		Poblaciones menos dañadas		Diferencia en %
40.6 min	12.22%	40.6 min	5.8%	- 6.42

Signo (+) indica mayor cantidad del componente en poblaciones menos dañadas.

TABLA No. 22(bis) COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES QUE VARIAN CON RESPECTO AL GRADO DE INFECCION Y NO CON LA TEMPORADA DE COLECTA.

3. Licaria alata

COLECTA No. 1

Poblaciones más dañadas		Poblaciones menos dañadas		Diferencia
COMPONENTE de t. ret.(min)	%	COMPONENTE DE t. ret.(min)	%	en %
11.0	0.84	11.0	5.71	+ 4.87
-	-	13.8	5.66	+ 5.66
24.0	14.71	24.0	5.44	- 9.27

COLECTA No. 2

Poblaciones más dañadas		Poblaciones menos dañadas		Diferencia en %
11.0 min	1.55%	11.0 min	7.03%	+ 5.48
		11.2 min	4.15%	+ 4.15
24.0 min	17.1%	24.0 min	6.18%	-10.92

Signo (+) indica mayor cantidad del componente en poblaciones menos dañadas.

4. DISCUSION DE RESULTADOS.

4.1 Sobre el material de estudio.

Como se indicó en la parte de materiales de estudio, las especies escogidas son representativas de la selva alta perenifolia: L. alata, N. ambigens y O. oleifera. Se trabajó con poblaciones colectadas en dos diferentes temporadas del año, una en primavera (marzo) en la cual la precipitación pluvial es reducida y otra en verano (julio) cuando es abundante. Esto se debió al hecho de que la producción de metabolitos secundarios (principalmente monoterpenos y sesquiterpenos en aceites esenciales) se ve influída por factores ambientales tales como la temporada de colecta, precipitación pluvial y zona de colecta (18), de tal manera que pueden existir componentes que varíen en cuanto a estos factores y por ende, modificar su importancia en la resistencia a la enfermedad.

Por otra parte, el hecho de utilizar la parte aerea de estados juveniles de plantas que al estado adulto son árboreas (8 a 12 g) y centrar la colecta en una sola zona hizo que la cantidad de muestra tuviera que ser limitada y no fuera suficiente para llevar a cabo estudios químicos posteriores. Sin embargo, estos podrían realizarse en un futuro de comprobarse que la composición del estado juvenil (aceites esenciales y compuestos fenólicos) es la misma que la de plantas adultas de estas especies.

En cuanto al grado de infección, los términos "más dañados" y "menos dañados" son relativos, ya que en realidad hubo pobla-

ciones "menos dañadas" como las de Q. oleifera que podrían considerarse como sanas ya que no mostraban síntomas aparentes de enfermedad o depredación. Sin embargo, poblaciones "menos dañadas de L. alata presentaban algunos síntomas de enfermedad, pero menos acentuados que las que presentaban las poblaciones "más dañadas".. Finalmente poblaciones "menos dañadas" de N. ambigens" presentaban también síntomas de enfermedad, pero estos eran notablemente menores a las que se presentaban en las "más dañadas". Estas observaciones están registradas por Nava (34).

4.2 Pruebas químicas preliminares.

Los metabolitos secundarios hasta ahora relacionados con la resistencia a la enfermedad son principalmente compuestos fenólicos y aceites esenciales (monoterpenos y sesquiterpenos). Sin embargo, se ha citado en algunos casos (21) saponinas y alcaloides, por lo que se realizaron las pruebas cualitativas para detectar la presencia de estos metabolitos secundarios en las plantas estudiadas. Como se muestra en la tabla 1, la presencia de alcaloides fué dudosa y la de saponinas fué negativa, por lo que la posible relación entre estos metabolitos y la resistencia a la enfermedad se descartó.

Por otro lado, las especies estudiadas contienen en mayor o menos grado compuestos fenólicos y aceites esenciales (tabla 1) Q. oleifera contiene más cantidad de compuestos fenólicos y menos de aceites esenciales con relación a las otras especies es-

pecies estudiadas. L. alata contiene más aceites esenciales y N. ambigens ligeramente menos que L. alata. Estas dos especies contienen comparadas entre si, aproximadamente la misma cantidad de compuestos fenólicos.

Debido a estos resultados, se encaminó el trabajo esperimental al estudio de estos grupos de metabolitos secundarios.

4.3 Compuestos fenólicos.

Las modificaciones hechas al método de cuantificación de estos compuestos propuesto por Price y Buttler (32), se debieron fundamentalmente a que los autores utilizan material seco, lo cual a nuestro parecer sería erróneo debido a que se desconoce la cantidad de compuestos fenólicos en estado fresco. Los resultados de esta parte están expresados en peso seco para mantenerlos uniformes.

Se empleó el extracto acuoso por dos razones:

a) Está más apegado a las condiciones naturales de lixiviación.

b) No se extraen clorofilas que pudieran interferir en la cuantificación.

Es importante hacer notar que la lectura de las muestras debe hacerse exactamente a los 10 minutos de agregado en ferricianuro de potasio debido que la absorbancia varía con el tiempo llegado a formarse un precipitado.

La curva patrón obtenida con ácido tánico (figura 2) tiene una muy buena correlación (0.999) lo que garantiza la precisión

del método.

Como puede observarse en la tabla 3, existen diferencias significativas en la cantidad de compuestos fenólicos en cuanto al grado de infección. Para O. oleifera y N. ambigens se encuentran estas diferencias en forma significativa de tal manera que poblaciones "menos dañadas" tienen menor cantidad que las "más dañadas" en la misma especie. Para L. alata no se encontraron diferencias. Estos resultados pueden relacionarse con la teoría de las fitoalexinas (13) que apoya la idea de un aumento en la producción de ciertos metabolitos secundarios cuando la planta ha sido dañada.

Por otra parte en la tabla 3 se observa también que las poblaciones menos dañadas, O. oleifera tiene mayor cantidad (0.038% peso seco) de compuestos fenólicos de N. ambigens y L. alata (0.0199% y 0.0216% respectivamente). Estos resultados, y las observaciones de que las poblaciones "menos dañadas" de O. oleifera muestran pocos síntomas de enfermedad, a diferencia de las de L. alata y N. ambigens nos hace pensar en un efecto protector debibido a compuestos fenólicos en esta especie.

Los compuestos fenólicos con posible actividad protectora se encuentran en el extracto etanólico al 70%. Las fracciones acuosas de estos extractos para las tres especies estudiadas mostraron diferencias cualitativas de composición entre las poblaciones más dañadas y menos dañadas (tabla 5). Las poblaciones más dañadas contenían al menos un componente que no se en-

contraba en las menos dañadas.

En las fracciones clorofórmicas de L. alata se observaron diferencias en la composición (tabla 4). En las otras especies no las hay.

4.4 Aceites esenciales.

Se usaron dos tipos de cromatografía para su estudio: en capa fina (C.C.F.) y en fase de vapor (C.F.V.). Esta última resultó ser la técnica que dió resultados más precisos. Sin embargo, podemos notar en las tablas 6, 7 y 8 que por C.C.F. pueden detectarse diferencias cualitativas entre poblaciones que difieren en el grado de infección para una especie dada.

Para C.F.V. se trabajó a temperatura programada con el objeto de tener una buena resolución de los picos. Se elevó la temperatura hasta 220°C manteniéndola así por 5 minutos. Estas condiciones aparentemente permitieron la detección de todos los componentes presentes en las muestras analizadas.

El método usado para la extracción de aceites esenciales fué el de destilación por arrastre de vapor comunmente empleado para estos fines, que sin embargo presenta la desventaja de que puede arrastrar otras sustancias que no son de naturaleza terpénica. A pesar de ello, para fines prácticos los nombramos "aceites esenciales".

La cuantificación de cada uno de los componentes fué expresado en terminos relativos, es decir el 100% corresponde al área

total de los picos en un cromatograma.

a) L. alata. En las figuras 3 y 4 (cromatogramas) puede observarse objetivamente las diferencias cualitativas y cuantitativas de la composición del aceite esencial de poblaciones más dañadas y menos dañadas de L. alata para las dos colectas. Se observa en ambas figuras que existe un grupo de compuestos (zonz izquierda) que están en mayor proporción (o exclusivamente) en poblaciones menos dañadas que en más dañadas. Estas observaciones son expuestas en la tabla 9 y 10 para la primera y segunda colecta respectivamente.

Sólo fueron seleccionados aquellos componentes que presentan diferencias mayores de 3% entre las poblaciones menos dañadas y más dañadas de L. alata identificándose uno de ellos como eugenol. Estos resultados se muestran en la tabla 16.

Por otro lado, en las figuras 3 y 4 y las correspondientes tablas (9 y 10) se observa que hay diferencias en la composición con respecto a la temporada de colecta. Los componentes que difieren en más de 3% son expuestos en la tabla 19, las cuales nos indican que eugenol fué uno de estos componentes.

Así pues, existen componentes que varían con respecto a la temporada de colecta y también al grado de infección (p. ej. eugenol). Hay también componentes que varían con respecto al grado de in fección sin variar con la temporada de colecta. Es tos se indican en la tabla 22 (bis). Son de notar los componen

tes de tiempo de retención 11.0 min y 24.0 min que se presentan en ambas colectas y los de 11.2 min y 13.8 min que se presentan sólo en poblaciones menos dañadas en la colecta 2 y 1 respectivamente.

a) O. oleifera y N. ambigens.

En las tablas 11 a 14, 17, 28, 20, 21 y 22 y figuras 5 a 8 se muestran los resultados para estas dos especies. Como se indica en la tabla 22, para O. oleifera sólo un componente (t. ret. = 40.6) varió exclusivamente con respecto al grado de infección presentándose en mayor proporción en poblaciones más dañadas, para las dos colectas. Para N. ambigens, los componentes que variaron de esta forma, no fueron similares en ambas colectas; en la primera, los componentes involucrados fueron los de t. ret. 22.6 min y 23.8 min que estuvieron en mayor proporción en poblaciones más dañadas a diferencia de la segunda en donde el componente con t. ret. 38.2 min se presentó solamente en poblaciones menos dañadas.

Los componentes identificados en los aceites esenciales se encuentran en la tabla 15. L. alata contiene p-cresol y eugenol; O. oleifera, benzoato de bencilo y N. ambigens, borneol, benzoato de bencilo y α-terpineol.

De acuerdo con los resultados, se puede decir que se observaron dos posibles mecanismos distintos de defensa química contra patógenos: Por un lado, la presencia exclusiva de ciertos componentes en poblaciones más dañadas podría responder a produc-

tos derivados (fitoalexinas u otros componentes) del metabolismo alterado de la planta por la influencia de los microorganismos. Por otra parte, la presencia exclusiva de componentes en poblaciones menos dañadas indicaría que estos están presentes en la planta antes del ataque del patógeno y que podrían tener alguna relación con la resistencia de la planta a este ataque.

Para comprobar estas hipótesis se están llevado a cabo en forma paralela estudios biológicos por Nava (33) para investigar la posible actividad fungicida de los extractos analizados en este trabajo. De esta forma, se probaron los aceites esenciales de las poblaciones más dañadas y menos dañadas de N. ambigens sobre la germinación de esporas de Helminthosporium maidys que es un hongo patógeno aislado de lesiones de hojas del maíz, habiendo encontrado que el aceite esencial de las poblaciones menos dañads inhibe considerablemente la esporulación del hongo prueba, a diferencia del aceite esencial proveniente de las poblaciones más dañadas; esto indica el posible efecto protector de algunos componentes del aceite esencial de poblaciones menos dañadas de N. ambigens (especialmente de t. ret. 38.2 min). Para comprobarlo se necesitaría aislar este componente y probar su actividad sobre el hongo de prueba y sobre hongos fitopatógenos aislados de la misma planta.

Finalmente resta por discutir la dificultad que se ha presentado para la disolución de los extractos en las pruebas biológicas ya que es necesario encontrar un disolvente que sea inocuo

para los microorganismos de prueba y que garantice la total disolución de los componentes del extracto.

5. ASPECTOS SOBRESALIENTES DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos son preliminares y vale la pena analizar algunos aspectos sobresalientes de los mismos:

1. Los metabolitos secundarios que al parecer tienen importancia en la resistencia a las enfermedades en los estados juveniles de las especies estudiadas, pertenecen al grupo de compuestos fenólicos y terpénicos contenidos en el aceite esencial (monoterpenos y sesquiterpenos).

2. En O. oleifera y N. ambigens se encontró mayor cantidad de compuestos fenólicos en las poblaciones más dañadas que en las menos dañadas, lo cual se relaciona con la teoría de las toalexinas.

3. Las poblaciones menos dañadas de O. oleifera que no presentaban síntomas de enfermedad contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos de las poblaciones similares de L. alata y N. ambigens, lo cual supone un efecto protector de tales compuestos en plantas.

4. La composición de las fracciones acuosas A_1 del extracto etanólico de las tres especies estudiadas difiere dependiendo del grado de infección. Sin embargo, sólo en el caso de L. alata la composición de la fracción clorofórmica de las poblaciones menos dañadas fué diferente a la de las más dañadas.

5. El mejor método de análisis para los aceites esenciales

fué el de C.F.V. aunque sería más conveniente para nuestros propósitos la cromatografía de líquidos a alta presión.

6. Se presentaron diferencias notables en la composición de los aceites esenciales de las especies estudiadas en función del grado de infección exclusivamente.

En L. alata, son interesantes para estudios posteriores los componentes identificados en la cromatografía de gases como de t. ret. 24.0 min y 11.0 min en ambas colectas y los de t. ret. 13.8 min y 11.2 min de la primera y de la segunda colecta respectivamente.

En N. ambigens los compuestos importantes son los de t. ret. 22.6 min y 23.8 min de la primera colecta y el de t. ret. 38.2 min de la segunda colecta.

En O. oleifera, el compuesto más importante parece ser de t. ret. 40.6 min presente en ambas colectas.

6. BIBLIOGRAFIA.

(1) Rzedowski. J. (1978). "Vegetación de México" Ed. Limusa Wiley. pp. 1-20.

(2) Gomez-Pompa A. y B. Ludlow Wiechers (1976). Regeneración de ecosistemas tropicales y subtropicales. En "Regeneración de Selvas" I.N.I.R.E.B. y Consejo Nacional para la Enseñanza de la Biología p. 11.

(3) Del Amo R.S. (1978) Crecimiento y regeneración de especies primarias de selva alta perenifolia. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

(4) Shaal, T.A. and Johnson G. (1955). The inhibitory effect of phenolic compounds on the growth of Strepromyces scabies as related to the mechanism of scab resistance. Phytopathology 45, 626-28.

(5) Kué, J. (1957). A biochemical study of the resistance of polatotuber tissue to attack by various fungi. Phytopathology 47: 676-80.

(6) Kué, J.; Henze, R.E.; Ulstrop, A.J. and Quckenbush F.W. (1956) Chlorogenic and caffeic acids as fungistratic agents produced by potatoes in response to inoculation with Helminthorporium carbonium. J.A.C.S. 78: 3123-3125.

(7) Byrde, A.J.W., Fielding, A.H. and Williams, A.H. (1960). The roles of oxidized poliphenols in the varial resistence of apples to brown rot. En "Phenolics in plants in health and disease" (J.B. Pridham, Ed.) pp. 95-99. Pergamon, Oxford.

(8) Condon, P. and Kué, J. (1960). Isolation of a fungistatic compound from carrot root tissue inoculated with Ceratocyslis fimbriata Phytopathology 50: 267-270.

(9) Hughes, J.C. and Swain T. (1960). Scopolin production in polato tubers infected with Phytophthora infestans Phytopathology 50: 398-400.

(10) Farkas B.L. and Kiraly, Z. (1962). Role of phenolic comp. in the physiology of plant disease and disease resistance Phytopathology Z. 44: 105-150.

(11) Minimikawa, T., Akazawa, T. and Urilaw, T., I. (1963). Analytical study of umbelliferone and scopolefin synthesis in sweet polato roots infested by Ceratocyslis fimbrials. Plant. Physiology 38: 493-497.

(12) Gardner, R.L. and Dayne M.G. (1964). Identification of phenolic comp. in a sugar beets responsible for resistance to cercospora beticola. J. Colo. Wyoming Acad. Sci. 5, 42 (abst).

(13) Cruickshank I.A.M. and Perrin D.R. (1964). Pathologycal function of phenolic compounds in plants. En "Biochemistry of phenolic compounds" (Harborne J.B. Ed.) pp. 511-544. Academic Prees, N.Y.

(14) Cobb E.W.J., Krstic, M., Zavarin, E. and Barbe, W.H., Jr. (1968). Inhibitory effects of volatile oleoresin component on Fomes annomis and four ceratocysts species (Diseace resistance). Phytopathology 58:= 1327 - 1335.

(15) Harborne J.B. (1973) Phytochemical methods London Chapman and Hall pp. 89-105.

(16) G. Weissmann (1966). En: Swaint T. Comparative Phytochemistry Academic Press. London pp. 97-120.

(17) Tyler, V.E. (1976). Pharmacognosy. Lea & Febiger 7a. Ed. Philadelphia pp. 134-173.

(18) Banthorpe D.V. (1972). The biosynthesis of monoterpenes Chem. Reviews, 72 (2): 115-154.

(19) Dominguez X.A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica Centro Regional de ayuda técnica. México Ed. Limusa.

(20) Ramstad Egil (1959). Modern Pharmacognosy Blakiston Division. Mc. Graw-Hill Book Co., Inc. London pp 147-180.

(21) Rice, E.L. (1974) Allelopaty Academic Press, N.Y., San Francisco, London

(22) Guenter E. (1960). The essential oils. D. Van Nostrand Co. Inc. Princeton, New Jersey N.Y. Tomo I pp. 15-85.

(23) R.H. Thomson (1974). "Structure and Reactivity of phenolic compounds" en "Biochemistry of phenolic compounds" (Harborne J.B. Ed). pp. 1-32 Academic Press, N.Y.

(24) Harborne J.B. and Simmon N.W. (1964) en "The natural distribution of the phenolic aglycons" en "Biochemistry of phenolic compounds" (J.B . Harborne, ed.) pp. 511-544 Academic Press, N.Y.

(25) Walker, 1. 1929 Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 15: 845.

(26) Trevor Robinson (1976). The organic constituents of higher plants. 2a. ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis.

(27) Hadwiger, L.A. (1966). The biosynthesis of pisatin Phytochem. 5, 523.

(28) Muñoz Rivera Miriam (1979). Tesis profesional. Facultad de Química, U.N.A.M.
"Determinación de saponinas, taninos y actividad antibiótica en algunas plantas silvestres mexicanas".

(29) Williams, A.H. (1963). Enzyme inhibition by phenolic compounds. In "Enzime chemistry of phenolic compounds" (J.B. Pridham, Ed.), pp. 87-96. MacMillan N.Y.

(30) Benoit, R.E. and Starkey, R.L. (1968). Inhibition of de-- composition of cellulose and some other carbohydrates by tannin. Soil Sci. 105, 291-296.

(31) Cavallito, C.J. and Haskell (1945). The mechanism of antibiotics. The reaction of unsaturated lactones with cysteine and related compounds. J.A.C.S. 67, 1991-1994.

(32) Price M.L. and Butler L.G. (1977)
Rapid visual estimation and Spetrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 25 (6): 1268-73.

(33) Nava, V. (1980). En preparación.

(34) Nava, V. (1980). Comunicación oral.

(35) Levin, D.A. (1976) Chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. Ann Review. Ecol. Fuft. 7: 121-159.

(36) Sharvelle, E.G. (1969) Chemical Control of plant diseases University Publishing, Texas 253-258.