

6
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
ALELOQUÍMICOS EN EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C A

FARMACÉUTICA

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARÍA DE LOS ÁNGELES CÁRDENAS RÍOS

MEXICO, D. F.

OCTUBRE 29

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna CÁRDENAS RÍOS MA. DE LOS ANGELES, con número de cuenta 8754443-5 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 29 del mes de Octubre de 2001 a las 17:00 hrs. para presentar examen profesional, que tendrá lugar en esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Q. MIKI OTANI IMURA
VOCAL	M. en C. MA. TERESA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ
SECRETARIO	Q. MA. TERESA MENDOZA MATA
SUPLENTE	Q. MARTHA TRINIDAD JULIETA OLIVEROS GARCÍA
SUPLENTE	DR. R. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

El título de la tesis que se presenta es: Aislamiento y caracterización de ateloquímicos en extractos etanólicos de girasol (Helianthus annuus L.)

ATENTAMENTE DE ESTUDIOS SUPERIORES
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 México, D.F. a, 27 de Septiembre de 2001.
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"
 MTRO. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ
 DIRECTOR DIRECCIÓN

RECIBÍ

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo Bo

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA DE Q.F.B.

DEDICATORIA

A Dios porque no hay palabras para agradecerle, solo puedo decir gracias.

A mis hijos:

Con mucho amor y cariño a mis hijos Cesarito y Yatzin Yatziri porque son el motor que mueve mi vida es para ellos este logro y es que, en mi sueño de titularme les robé un poco del tiempo que les correspondía, sin embargo, espero que este presente justifique en algo esa acción. Que este pequeño logro sea un gran inicio para ellos, porque es bonito soñar y porque los sueños a veces se hacen realidad.

Con amor y profundo agradecimiento a César porque desde que lo conozco siempre me ha apoyado, muchas veces con trabajo, otras tantas con ideas y muchas más sentimentalmente. Por otro lado, el que siempre me recordara lo importante que es el título tan solo como logró personal, me motivo a hacer a un lado mi resistencia y a trabajar para terminar lo que un día inicie por lo cual, sin duda ese apoyo a sido de gran valor e imprescindible.

A mis padres:

Con amor a mi madre Irínea, pues me dio el más hermoso de los regalos, la vida, porque por ella, soy la persona que soy, y fue ella quien me enseñó mis primeras letras, y abrió un universo en mi vida y porque sin ella mi vida no sería posible, gracias mamá.

A mi padre Enedino (†) a quien la vida le fue arrebatada, sin embargo, estoy cierta que le hubiese gustado compartir este logro conmigo, donde quiera que te encuentres papá te amo.

A mis hermanos:

Israel, Vicky, Sebastián, Estela y Araceli con profundo amor, cariño y agradecimiento para todos y cada uno de ellos porque cada uno de ellos es un impulso en mi vida, de manera muy especial a mi hermana Estela, porque posee el más grande de los dones la bondad y gracias a ese don que Dios le dio, es que yo siempre he contado con ella, por todo eso y más gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo a través del proyecto 28598-B

Al laboratorio de Fitoquímica de la Especialidad de Botánica del Instituto de Recursos Naturales del Colegio de Postgraduados por las facilidades del sitio y equipo.

Un profundo agradecimiento a la M. en C. María Teresa Rodríguez González por su dirección en este trabajo.

Al Dr. R. Marcos Soto Hernández, por su asesoría en este trabajo y el tiempo que en el laboratorio de manera muy gentil me dedicó.

Al Dr. J. Alberto Escalante Estrada, por su valiosa asesoría en el aspecto estadístico de este trabajo.

Al Sr. Jorge Rodríguez López, por su valioso apoyo dentro del laboratorio, para la realización de la parte experimental de este trabajo.

A todos mis profesores, porque todos y cada uno de ellos contribuyeron en mi formación y todos son iguales de importantes, ya que no hay contribución más pequeña ni más grande.

A todas mis escuelas, porque sin esos preciosos recintos no hay enseñanza posible.

Contenido

ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE APÉNDICES	VI
RESUMEN	VII
I INTRODUCCIÓN	1
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
3.1 OBJETIVO GENERAL	4
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	4
3.3 HIPÓTESIS	4
IV ANTECEDENTES	5
4.1 GENERALIDADES SOBRE EL GIRASOL	5
4.1.1 Origen de la especie	5
4.1.2 Clasificación taxonómica (Cano y Marroquín, 1994)	6
4.2 ASPECTOS QUÍMICOS ESTUDIADOS	7
4.2.1 Compuestos Fenólicos	7
4.2.2 Terpenoides	8
4.2.2.1 Monoterpenoides	10
4.2.2.2 Sesquiterpenoides	11
4.2.2.3 Diterpenoides	14
4.2.2.4 Triterpenoides	17
4.2.2.5 Tetraterpenoides o carotenoides	17
4.2.2.6 Poliisopreno:	18
4.3 BIOENSAYO	18
4.3.1 Germinación de semillas	20
4.3.2 Factores que afectan la germinación	20
4.3.2.1 Agua	21
4.3.2.2 Temperatura	22
4.3.2.3 Gases	22
4.3.2.4 Luz	23
4.3.3 Factores Bióticos	23
V MATERIALES Y MÉTODOS	24
DIAGRAMA DE FLUJO QUE MUESTRA LAS PRINCIPALES ETAPAS DE LA FASE EXPERIMENTAL	24
5.1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	25
5.2.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	25
5.3.- EXTRACCIÓN	25
5.4.- ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR	27
Determinación de alcaloides:	28
Determinación de saponinas:	28
Determinación de flavonoides	28
Determinación de terpenoides:	28
Determinación de ácidos fenólicos:	28
5.5 BIOENSAYO DE LOS EXTRACTOS	29

<u>5.6.- PH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS ETANÓLICOS DE TALLO Y RECEPTÁCULO</u>	30
<u>5.7.- ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO</u>	31
<u>5.7.1.- Análisis cromatográfico de los extractos crudos etanólicos de tallo y receptáculo por cromatografía en capa delgada</u>	31
<u>5.7.2.- Análisis por cromatografía en columna del extracto seleccionado</u>	33
<u>VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	37
<u>6.1.- ANÁLISIS DE EXTRACTOS</u>	37
<u>6.2.- PRUEBAS PRELIMINARES (COLORIMÉTRICAS)</u>	38
<u>6.3.- BIOENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN DE AMARANTO CON EXTRACTOS ETANÓLICOS DE TALLO Y RECEPTÁCULO</u>	40
<u>6.4.- PH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA</u>	42
<u>6.5.- CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA</u>	43
<u>6.6.- ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO</u>	45
<u>6.7.- CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO SELECCIONADO</u>	46
<u>6.8.- BIOENSAYOS POR FRACCIONES</u>	49
<u>6.9.- ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN COLUMNA DE LA MEZCLA</u>	56
<u>VII CONCLUSIONES</u>	61
<u>VIII REFERENCIAS</u>	62

Índice de cuadros

CUADRO 1.- TERPENOIDES AISLADOS DEL GIRASOL (TIPO DE EXTRACTO Y ÓRGANOS VEGETALES DE LOS QUE SE HAN EXTRAÍDO)	16
CUADRO 2.- SÓLIDOS SOLUBLES (G) EN ETANOL OBTENIDOS DE RECEPTÁCULO Y TALLO A DISTINTOS TIEMPOS	37
CUADRO 3.- PRUEBAS PRELIMINARES (DESARROLLO DE COLOR) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE TALLO Y RECEPTÁCULO DE GIRASOL) EN SOLUCIÓN METANÓLICA Y ACUOSA(+ LIGERAMENTE COLORIDA, ++ COLORIDA, +++ MUY COLORIDA, RESPUESTA NEGATIVA --)	39
CUADRO 4.- POTENCIAL DE HIDRÓGENO (PH) PRESENTE EN LAS SOLUCIONES DE TALLO Y RECEPTÁCULO A DIFERENTES CONCENTRACIONES	42
CUADRO 5.- CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE TALLO Y RECEPTÁCULO A DISTINTAS CONCENTRACIONES	43
CUADRO 6.- EFECTO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE TALLO Y RECEPTÁCULO DE GIRASOL SOBRE EL CRECIMIENTO(MM) DE LAS RADÍCULAS Y VÁSTAGOS DE LAS PLÁNTULAS DE AMARANTO. A LAS 48 HORAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA	44
CUADRO 7.- BANDAS Y SUS RESPECTIVOS VALORES DE R _F OBTENIDOS EN LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA, DEL EXTRACTO DE RECEPTÁCULO EN LA IDENTIFICACIÓN DE TERPENOIDES	46
CUADRO 8.- BANDAS Y SUS RESPECTIVOS VALORES DE R _F OBTENIDOS EN LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA, DEL EXTRACTO DE RECEPTÁCULO EN LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	46
CUADRO 9.- FRACCIONES OBTENIDAS EN LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA A PARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE RECEPTÁCULO, ASÍ COMO LAS FASES MÓVILES DE LAS CUALES FUERON OBTENIDAS Y LA CANTIDAD EN GRAMOS OBTENIDA	47
CUADRO 10.- FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA A PARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE RECEPTÁCULO, ASÍ COMO LOS VALORES R _F REGISTRADOS A PARTIR DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA EN CADA UNA DE LAS FRACCIONES	48
CUADRO 11.- EFECTO DE LAS FRACCIONES ETANÓLICAS DE RECEPTÁCULO DE GIRASOL SOBRE EL CRECIMIENTO (MM) DE RADÍCULAS Y VÁSTAGOS DE LAS PLÁNTULAS DE AMARANTO, 48 HORAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA	54

CUADRO 12.-EFECTO DE LAS FRACCIONES ETANÓLICAS DE RECEPTÁCULO DE GIRASOL SOBRE EL CRECIMIENTO (MM) DE LAS RADÍCULAS Y VÁSTAGOS DE LAS PLÁNTULAS DE AMARANTO. A LAS 120 HORAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA.	55
CUADRO 13.- EFECTO DE LAS FRACCIONES ETANÓLICAS DE RECEPTÁCULO DE GIRASOL SOBRE EL CRECIMIENTO (MM) DE LAS RADÍCULAS Y VÁSTAGOS DE LAS PLÁNTULAS DE AMARANTO. A LAS 168 HORAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA.	56
CUADRO 14.- FRACCIONES COLECTADAS EN EL ANÁLISIS, ASÍ COMO LAS FASES MÓVILES DE LAS CUALES SE OBTUVIERON Y LA CANTIDAD (G) OBTENIDA DE CADA UNA DE ELLAS.	57

Índice de Figuras

FIGURA 1 GIRASOL CV VICTORIA CULTIVADO EN EL COLEGIO DE POSTGRADUADOS. (CORTESÍA J. A. ESCALANTE ESTRADA).....	6
FIGURA 2.- RUTA DE LA BIOSÍNTESIS DE TERPENOIDES .POR SIMPLICIDAD SÓLO LOS ESQUELETOS DE CARBONO SON MOSTRADOS (BASADO EN HARBORNE, 1991).....	9
FIGURA 3.- MONOTERPENOIDES (BASADO EN DEL HARBORNE, 1991).....	11
FIGURA 4.- SESQUITERPENOIDES (BASADO EN HARBORNE, 1991 P. 96),	12
FIGURA 5.- DITERPENOIDES CON IMPORTANCIA ECOLÓGICA (HARBORNE, 1991).....	14
FIGURA 6.- TRITERPENOIDES (BASADO EN HARBORNE, 1991).....	17
FIGURA 7.- INHIBICIÓN A LAS 24 Y 48 HRS DE <i>A. HYPOCHONDRIACUS</i> CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE TALLO Y RECEPTÁCULO.....	41
FIGURA 8.- INHIBICIÓN A LAS 48 HORAS DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE AMARANTO POR EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE DIFERENTES FRACCIONES COLECTADAS.	50
FIGURA 9.- INHIBICIÓN A LAS 120 HORAS DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE AMARANTO POR EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE DIFERENTES FRACCIONES COLECTADAS.	51
FIGURA 10.- INHIBICIÓN A LAS 168 HORAS DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE AMARANTO POR EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE DIFERENTES FRACCIONES COLECTADAS.	53
FIGURA 11.-CROMATOGRAMA DEL COMPUESTO OBTENIDO DE LA FRACCIÓN 2 (KAURANO / TRAQUILOBANO)	58
FIGURA 12.-ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO ENCONTRADO EN LA FRACCIÓN 2 (KAURANO / TRAQUILOBANO).	59

Índice de apéndices

APÉNDICE A: PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	65
<u>Reactivo de anisaldehído</u>	65
<u>Reactivo de Dragendorff</u>	65
<u>Reactivo de Liberman – Burchard</u>	65
APÉNDICE B: CUADROS DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN.....	66
APÉNDICE C - CUADROS DE LA ELONGACIÓN DE RADÍCULA Y VÁSTAGO	71

RESUMEN

Esta investigación está enfocada al estudio de los aleloquímicos presentes en las estructuras vegetales que forman parte de la materia residual de los cultivos y que intervienen en el control de maleza. Se aislaron, separaron y caracterizaron los aleloquímicos presentes en tallo y receptáculo de girasol cv. Victoria. Los sólidos fueron extraídos de los tejidos vegetales con alcohol etílico en equipo Soxhlet, y separados y purificados a través de cromatografía en columna y placa fina. La caracterización de las fracciones obtenidas se hizo a través del bioensayo de germinación de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Las fracciones que presentaron mayor actividad inhibitoria sobre la germinación fueron la 3, 4 y 5, las cuales son medianamente polares. La cantidad de muestra obtenida con esta metodología fue de 20.5 mg, y el análisis cromatográfico acoplado a espectrometría de masas mostró la presencia de un compuesto de naturaleza diterpenoide (kaurano / traquilobano). Dicho compuesto inhibió la germinación de semillas de amaranto y se sugiere está significativamente involucrado en la acción alelopática del girasol cv. Victoria.

I Introducción

Los vegetales constituyen una fuente de productos naturales con potencial para ser aplicado en usos agronómicos, por la gran diversidad de estructuras que sugieren acciones biológicas específicas y su carácter aparentemente inocuo sobre el ambiente, ya que son degradados a corto plazo.

Desde tiempos inmemoriales (Teofrasto, 300 años a. C., citado por Rice 1984), se observó la capacidad que presentan las plantas para establecer interacciones químicas a través de dichos compuestos, al ser vertidos al ambiente. En épocas más recientes (Molich, 1937; Rice 1974) han englobado dentro del término alelopatía las interacciones indicadas, empleando dicho término para referirse a cualquier proceso que involucre metabolitos preferentemente secundarios de origen vegetal o microbiano, que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos incluyendo tanto efectos positivos como negativos. En estos términos, se podría atender al control de la maleza por medio de efectos alelopáticos selectivos.

Del estudio de las interacciones alelopáticas entre especies cultivadas y maleza, ha nacido el interés por caracterizar, aislar y ensayar las sustancias implicadas. Se han puesto en marcha, proyectos de búsqueda de productos con actividad biológica propia, o a través de modificaciones puntuales de su estructura. El procedimiento integral y "artificial" de caracterización de la actividad herbicida de un producto alelopático se conoce como "bioensayo", el cual consiste en el uso de material biológico como indicador de la acción inhibitoria, cuantificándose los cambios que se puedan producir sobre una determinada actividad bioquímica o con respecto a un testigo (Castellano *et al.*, 2000).

Es bastante amplia la gama de sustancias bioquímicas que las plantas producen como metabolitos secundarios y que presentan un carácter alelopático. Destacada es la participación de los terpenoides que se constituyen de múltiplos de isopreno, una molécula orgánica de cinco carbonos. La planta utiliza los terpenoides (deri-

vados de la ruta del ácido mevalónico), como un mecanismo de protección (Rogers *et al.*, 1995). También para ahuyentar insectos, parásitos y depredadores (Krebs, 1986), ya que son constituyentes de las resinas, látex, feromonas (Fessenden y Fessenden, 1994) y aceites esenciales con los cuales puede modificar el comportamiento de muchos animales, atrayéndolos o ahuyentándolos (Krebs, 1986). También, se han encontrado como un componente importante de los alelopáticos producidos por hojas y raíces y que son vertidos en el suelo (file:///A|Substveg.htm).

Las plantas que se distinguen como productoras de terpenoides con actividad alelopática son las compuestas (<http://gente.pue.udlap.mx/~pwesch/3.00html>); esto es posible por su modo de evolución y adaptación a los diferentes medios y a que muchas de estas plantas se consideran componentes de la maleza, praderas y ruderales por lo que tienen un fuerte carácter de dominancia ecológica y de oportunismo siendo de las especies más diseminadas (<http://gente.pue.udlap.mx/~pwesch/3.00html>). La dominancia de las compuestas pudiera atribuirse en cierta medida por su despliegue de estrategias alelopáticas.

Entre las compuestas destaca la presencia del girasol (*Helianthus annuus* L.), que es una planta de interés agrícola y en la actualidad de muy amplia distribución en cinco de los seis continentes. Esta planta crece con muy poca competencia y en una alta densidad pudiendo evitar la presencia de muchos otros tipos de plantas.

El utilizar esta planta para fines de control de plagas y de maleza, puede ser una estrategia muy importante y de plantearse los mecanismos de transferencia de tecnología convenientes, le daría a la especie una mayor diversificación en su uso y un mayor valor agregado.

II Planteamiento del problema

EL control oportuno de la maleza en los agro ecosistemas es básico para la obtención de rendimientos óptimos. En las pasadas décadas dicho control se ha realizado fundamentalmente a partir de herbicidas sintéticos, los cuales constituyen un riesgo para la salud pública y ambiental debido principalmente a su persistencia en el ambiente y además porque en algunos de ellos se ha observado actividad carcinogénica y mutagénica (Matsunaka y Kawatsuka, 1975; Duke, 1988).

Debido a lo anterior, se están buscando alternativas que permitan el control efectivo de la maleza, pero reduciendo al mínimo los efectos negativos señalados (Rodríguez, 1999).

La alelopatía puede ser una alternativa en la búsqueda de estrategias para el control de maleza. Los aleloquímicos, que son los compuestos químicos responsables de dichas interacciones, ofrecen una fuente de posibles herbicidas de origen natural, que tendrían como ventaja el ser más específicos en su acción, biodegradables en el corto plazo y menos dañinos que los sintéticos.

A partir de toda una serie de estudios en campo, Rodríguez y colaboradores (1994;1998;1999) han encontrado que los residuos del girasol cultivado, controlan la maleza que de manera natural emerge en agro ecosistemas de clima templado y cálido.

Así en el presente estudio se propuso aislar los compuestos que controlan la maleza mediante la técnica de extracción continua "sólido – líquido" (Soxhlet) y caracterizarlos por medio de análisis fitoquímico. La separación de los aleloquímicos presentes en los tallos y receptáculos de girasol cv Victoria en etapas fenológicamente maduras, se realizará a partir de técnicas cromatográficas. La actividad biológica de los compuestos obtenidos de la cromatografía en columna, se evaluará por medio de bioensayos de germinación y crecimiento de semillas de amaranto (*A. hypochondriacus* L.).

III OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo General

Aislar, caracterizar y purificar los aleloquímicos presentes en tallo y receptáculo del girasol.

3.2 Objetivos Particulares

- Aislar y comparar la cantidad de aleloquímicos presentes en tallo y receptáculo del girasol, solubles en alcohol etílico, por el método de extracción continua sólido-líquido.
- Caracterizar y comparar mediante análisis fitoquímico y biológico los aleloquímicos presentes en los extractos etanólicos de tallo y receptáculo del girasol.
- Separar y purificar mediante técnicas cromatográficas los aleloquímicos presentes en los extractos etanólicos de tallo y receptáculo del girasol.

3.3 Hipótesis

El girasol cv. Victoria presenta aleloquímicos en tallo y receptáculo, dichos aleloquímicos serán aislados y caracterizados a través de pruebas biológicas y fitoquímicas, las cuales se espera sean positivas para corroborar su presencia.

IV Antecedentes

4.1 Generalidades sobre el girasol

4.1.1 Origen de la especie

El girasol es nativo de América del Norte, puede ser encontrado en estado silvestre desde las planicies del noroeste de Canadá, hasta América del Sur (Gonçalves,2000).

Evidencias arqueológicas, revelan el uso del girasol entre los indios americanos. El cultivo de girasol tuvo inicio en Arizona y en Nuevo México aproximadamente 3000 años a. C. Dichos indicios señalan que un tipo monocefálico de girasol doméstico existió en la prehistoria y que éste pudo haber sido domesticado antes de ser introducido el mijo en América del Norte (Gonçalves,2000).

Se cree que el girasol de tallo único, aparece como resultado de una mutación del tipo silvestre que es ramificado y éste fue deliberadamente seleccionado por los indios. Otras características como pigmentación, tamaño de las semillas, peculiaridades de la cáscara y maduración, también fueron fijadas por los indios (Gonçalves,2000).

El girasol fue introducido en Europa a principios del siglo XIV, y desde entonces se ha distribuido por todo el mundo, en una amplia gama de climas y suelos, desde los áridos y los semiáridos, hasta los tropicales pasando por los templados y los fríos (fig.1). El cultivo de girasol se ha constituido en un elemento económico de gran importancia en varios países como Estados Unidos y los países que conformaron a la ex Unión Soviética (Gonçalves,2000).



Figura 1.- Girasol cv Victoria cultivado en el Colegio de Postgraduados (Cortesía J. A. Escalante Estrada).

4.1.2 Clasificación taxonómica (Cano y Marroquín, 1994)

División	Antophyta (Tracheophyta)
Subdivisión	Pteropsida
Clase	Angiosperma (Magnoliopsida)
Orden	Dicotiledónea
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Tubiflorae
Tribu	Heliantheae
Género	<i>Helianthus</i>
Especie	<i>Helianthus annuus</i> L.

El girasol pertenece al género *Helianthus*, familia Asteraceae. Es un género complejo, que comprende 49 especies y 19 subespecies, de los cuales 12 especies son anuales y 37 perennes. Unas pocas especies son de ocurrencia bastante rara, otras son elementos comunes de la vegetación natural y algunas otras son plantas

dañinas, desenvolviéndose en áreas bastante alteradas por el hombre. Muchas especies fueron domesticadas. De éstas, *H. annuus.*, ó girasol común, y *H. tuberosus.*, o "Jerusalem artichoke", son plantas alimenticias. La primera debido al aceite y a la proteína que contienen los achenios y la última por sus raíces. Además de esto, el girasol es empleado como planta ornamental (Gonçalves,2000).

4.2 Aspectos químicos estudiados

En el girasol se encuentran una amplia gama de metabolitos secundarios como resultado de un metabolismo complejo.

Por su abundancia y las implicaciones ecológicas y adaptativas en las que se involucran, en el girasol, han resultado de gran interés determinados grupos que enseguida se describen:

4.2.1 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos vegetales comprenden un amplio intervalo de sustancias que poseen un anillo aromático y por lo menos un grupo hidroxilo (Harborne, 1991). Los compuestos fenólicos representan uno de los grupos más abundantes encontrados en la naturaleza y son de interés particular en la fisiología postcosecha por su papel en el color y sabor de los frutos (<http://gente.pue.udlap.mx/~pwesch/3.17html>, 2000).

Los compuestos fenólicos usualmente son localizados en la vacuola celular, son solubles en agua y frecuentemente, se encuentran combinados con azúcares como glucósidos. Entre los compuestos fenólicos naturales, de los cuales más de mil estructuras son conocidas, los flavonoides forman el grupo más grande, pero los fenoles monocíclicos simples, fenil propanoides y quinonas fenólicas existen en números considerables. Ciertos grupos importantes de materiales poliméricos en plantas -las ligninas, melaninas y taninos- son polifenólicos y unidades fenólicas ocasionales son encontradas en proteínas, alcaloides y entre los terpenoides (Harborne, 1991).

Mientras la función de algunas clases de compuestos fenólicos está bien establecida (por ejemplo las ligninas como material estructural de la pared celular; las antocianinas como pigmentos florales), la función de otras clases es todavía una materia de especulación. Los flavonoides, por ejemplo, parecen ser importantes en la regulación del control de crecimiento en la planta del chícharo y su presencia en cloroplastos de espinaca sugiere que pueden estar involucrados en la fotosíntesis; sin embargo, ninguna de estas funciones, ha sido firmemente establecida (Harborne, 1991).

Algunos de los compuestos que se encuentran distribuidos entre las angiospermas son el ácido *p*-hidroxibenzóico; ácido protocateuico, ácido vainílico y ácido siringico. El ácido gentísico también está ampliamente distribuido, menos común es el ácido salicílico y ácido *o*-protocateuico, estos dos ácidos son comúnmente encontrados en la Ericacea (Harborne, 1991).

4.2.2 Terpenoides

Constituyen un grupo muy abundante e importante de sustancias, que se encuentran universalmente distribuidos en la naturaleza y que derivan de una simple unidad de isopreno (C_5H_7)_n, hidrocarburo insaturado. Generalmente son liposolubles y están localizados en el citoplasma de la célula vegetal. Los aceites esenciales algunas veces se encuentran en células glandulares especiales en la superficie de las hojas, los carotenoides se encuentran asociados con cloroplastos en las hojas y con cromoplastos en los pétalos.

De acuerdo con el número de átomos de carbono pueden ser divididos en: monoterpenoides (10 átomos de carbono), sesquiterpenoides (15 átomos de carbono), diterpenoides (20 átomos de carbono), triterpenoides (30 átomos de carbono) Tetraterpenoides o Carotenoides (40 átomos de carbono), Poliisopreno (C_n) (Harborne, 1991).

Aunque los terpenoides son biosintéticamente derivados de la molécula de isopreno, recientemente detectado como un producto natural en la hoja de *Hamamelis*,

esta sustancia no es un precursor in vivo. Su equivalente es el isopentenil-pirofosfato $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPP}$, que es formado sólo de acetato vía ácido mevalónico, $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2\text{C}(\text{OH}, \text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$. En biosíntesis, dos isopentenil pirofosfatos son enlazados para dar geranil pirofosfato (C_{10}), la llave intermedia en la formación de monoterpenos; geranil pirofosfato e isopentil pirofosfato, procede enlazada para dar farnesil pirofosfato (C_{15}), la llave intermedia de síntesis de sesquiterpenos. Diferentes combinaciones de estas unidades C_5 , C_{10} y C_{15} están involucradas en la síntesis de los terpenoides mayores (fig. 2). La mayoría de los terpenoides naturales tienen estructuras cíclicas con uno o más grupos funcionales (hidroxilo, carbonilo, etc.) así que los pasos finales en síntesis involucran ciclización y oxidación u otra modificación estructural (Harborne, 1991).

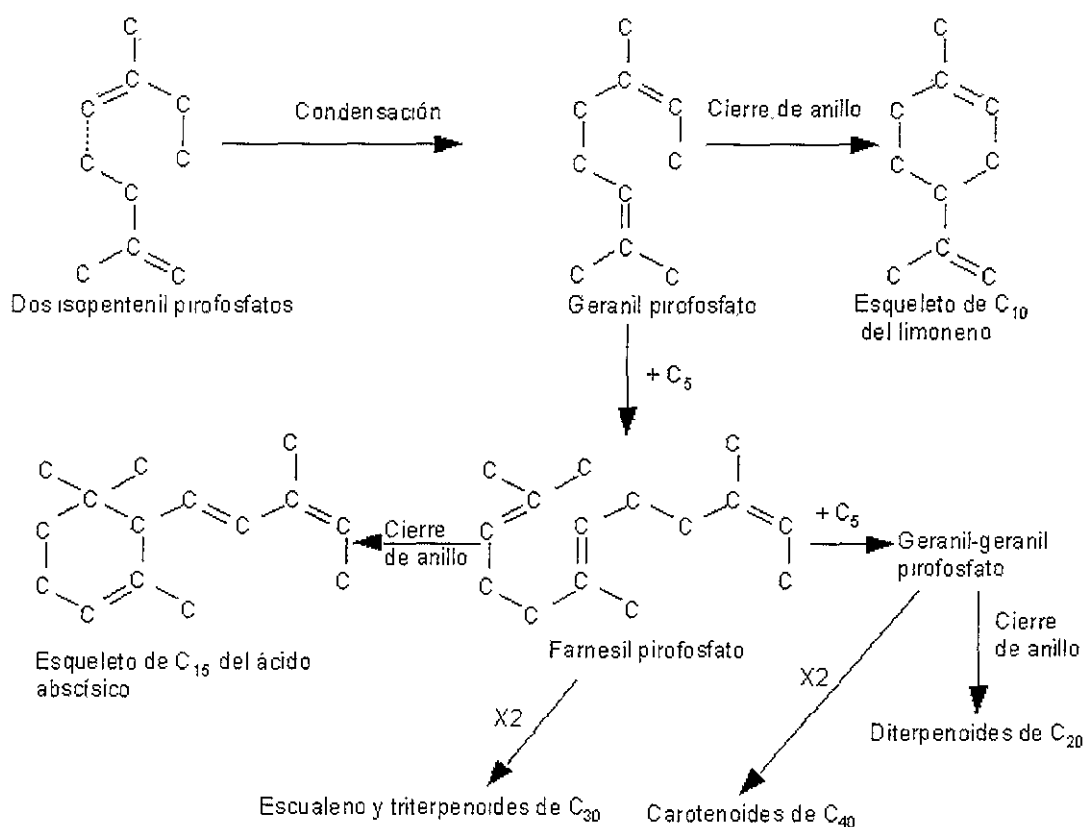


Figura 2.- Ruta de la biosíntesis de terpenoides .Por simplicidad sólo los esqueletos de carbono son mostrados (Basado en Harborne, 1991).

Los terpenoides de bajo peso molecular se caracterizan por ser los principales componentes de los aceites esenciales responsables de las fragancias naturales de flores, frutas, hojas y tallos (Pacheco Leal, 1996).

Las funciones biológicas y aplicaciones prácticas son muy variadas. Es de resaltar la importancia de los monoterpenoides y sesquiterpenoides como fragancias y aromas. Los aceites esenciales son importantes comercialmente en la elaboración de sabores, perfumería y cosmetología (ej. linalol, citral, mentol, geraniol, limoneno) Aula virtual de biología: www.um.es/~molecula/indice.htm.

4.2.2.1 Monoterpenoides

Son compuestos formados por 2 unidades de isopreno, su esqueleto se compone de diez átomos de carbono (C_{10}), y el punto de fusión es entre $140 - 180^{\circ}C$. Los aceites esenciales de muchas plantas están constituidos de monoterpenoides, a los que dan sus olores y sabores característicos y pueden ser divididos en: acíclicos (geraniol), monocíclicos (limoneno), bicíclico (α y β pineno). Dentro de cada grupo, los monoterpenoides pueden ser hidrocarburos insaturados simples (limoneno) o pueden tener grupos funcionales y ser alcoholes (mentol), aldehídos y cetonas (mentona y carvona) (figura 3) (Harborne, 1991).

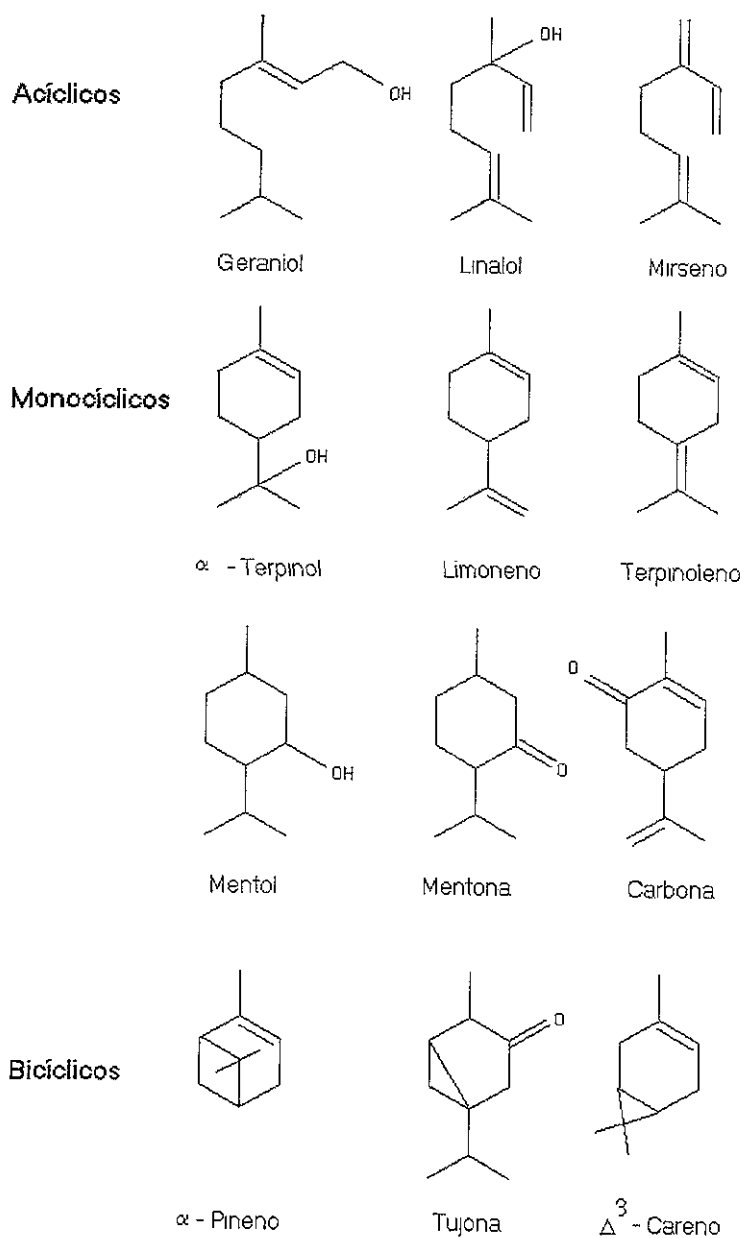


Figura 3.- Monoterpenoides (Basado en del Harborne, 1991).

4.2.2.2 Sesquiterpenoides

Este grupo es ejemplificado en la figura 4, el punto de fusión de estos compuestos es $> 200^{\circ}\text{C}$ (Harborne, 1991). Son comunes en la familia Asteraceae, al igual que los monoterpenoides son el principal constituyente de los aceites esenciales se clasifican en acíclicos (farnesol) monocíclicos (γ -bisaboleno) o bicíclicos (β -selineno, carotal) (Harborne, 1991).

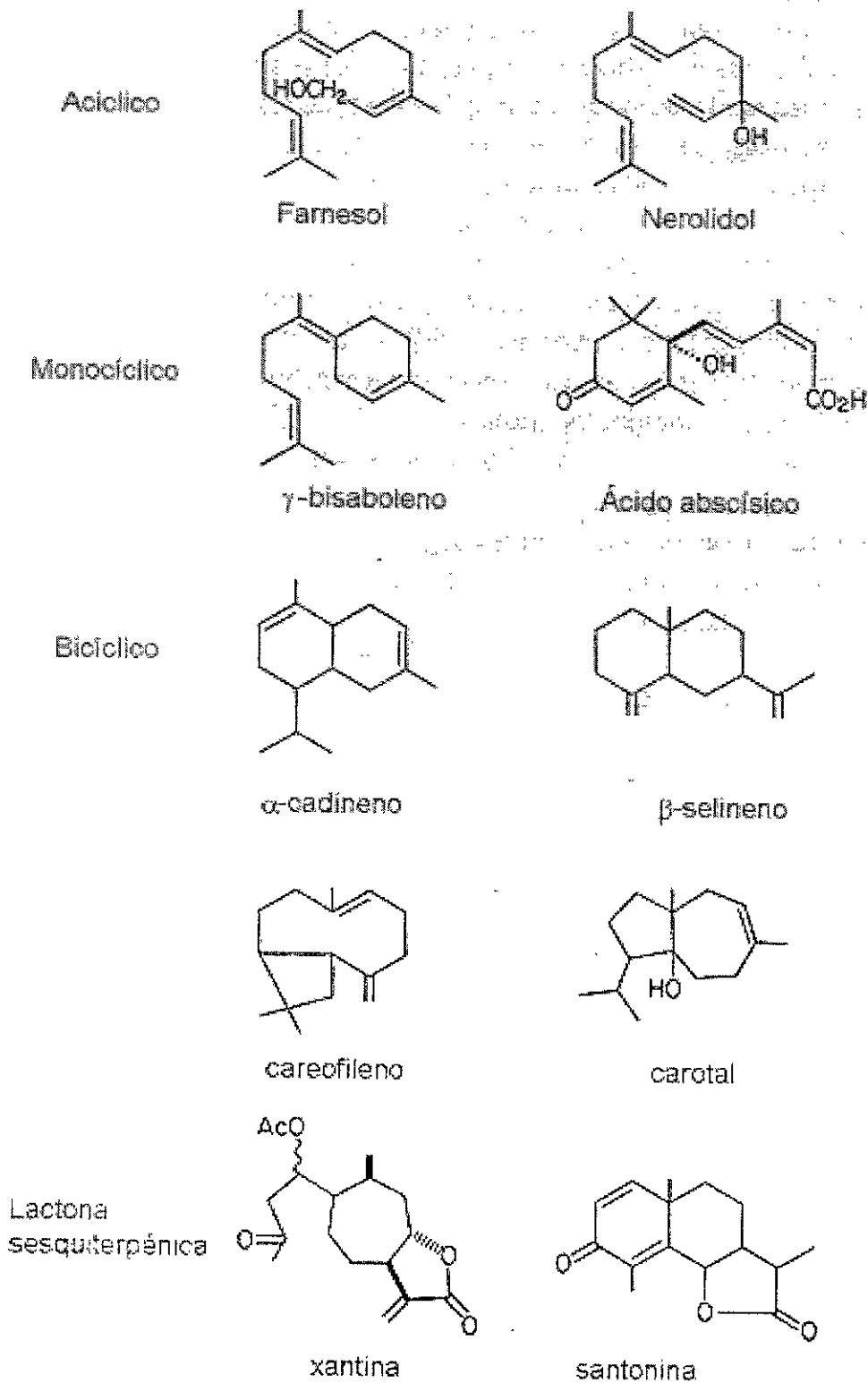


Figura 4.- Sesquiterpenoides (Basado en Harborne, 1991 p. 96).

Dos derivados sesquiterpenoides reservan mención especial, el ácido abscísico un ácido carboxílico sesquiterpénico relacionado en su estructura con el carotenoide violaxantina, es mejor conocido como la hormona que regula la latencia en semillas de plantas herbáceas y en capullos de especies leñosas. La Xantina tiene un papel menor bien definido en la fisiología de la planta como una auxina antagonista, representa una clase importante de sesquiterpenos los cuales también son lactonas y tienen una amplia distribución en Compositae. Otras propiedades que poseen estas lactonas sesquiterpénicas incluyen su ocasional sabor amargo o picante y su habilidad para actuar como alérgenos (Harborne, 1991).

Las lactonas sesquiterpénicas sustancias amargas (relativamente estables), son constituyentes lipofílicos, los cuales son biogénicamente derivados de trans, trans farnesil pirofosfato seguida de una ciclización y modificaciones oxidativas subsecuentes. De acuerdo a su esqueleto oxigenado, se clasifican en: germacranólidos, guaianólidos, pseudoguaianólidos, edesmanólidos, eremofilanólidos y xantonólidos. Se han encontrado también en especies de otras familias como Umbeliferae, Magnoliaceae, Lauraceae, Illiciaceae, Aristolochiaceae, Menispermaceae, Cortiariaceae y Acanthaceae (Rodríguez *et al.*, 1976). Su separación se realiza por cromatografía en columna, que sigue siendo la más efectiva (Mahato *et al.*, 1992). Un nuevo sesquiterpenoide el heliannuol aislado, a partir de tejidos frescos, está significativamente involucrado en la acción alelopática de girasoles cultivados, sobre la inhibición en la germinación de semillas y la longitud de la raíz de cultivos diferentes (Macías *et al.*, 1993a).

En otros estudios realizados en hojas frescas de girasol variedad SH-222, en el 3er estado de desarrollo vegetal, un mes antes de la cosecha, se encontraron 5 nuevas lactonas sesquiterpénicas tipo guaianolido; las cuales son llamadas annuolides A-E. Estas lactonas fueron probadas por sus efectos sobre la germinación y crecimiento de especies de dicotiledóneas *Lactuca sativa* (lechuga) y la monocotiledónea *Hordeum vulgare* (Macías *et al.*, 1993b). Estas 5 lactonas poseen actividad potencialmente alelopática, en particular sobre especies dicotiledóneas,

y están significativamente involucradas en la acción alelopática de girasoles cultivados (Macías *et al.*, 1993b).

4.2.2.3 Diterpenoides

Son un grupo de compuestos heterogéneos, desde el punto de vista químico (figura 5). Su esqueleto se compone de 20 átomos de carbonos basados en cuatro unidades de isopreno. Su distribución es muy limitada, probablemente el único universalmente distribuido es el diterpeno acíclico precursor del fitol, el cual está presente como éster en la molécula de clorofila. (Harborne, 1991).

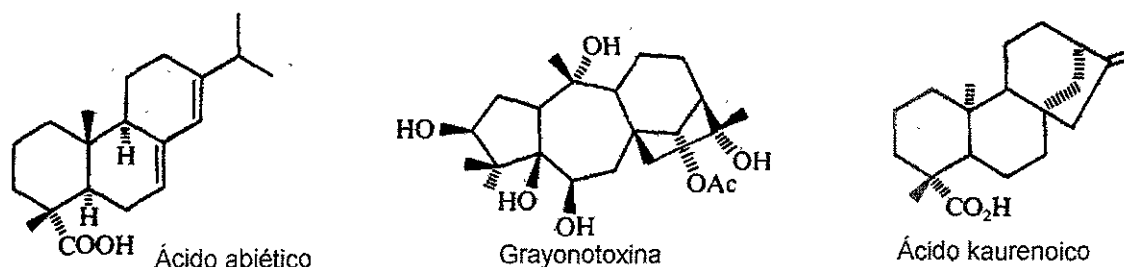


Figura 5.- Diterpenoides con importancia ecológica (Harborne, 1991).

Son consideradas tres clases de diterpenoides:

Las resinas diterpénicas que comprenden compuestos como los ácidos abiético y agático, han sido encontradas tanto en plantas actuales como en fósiles. A estos compuestos se les ha atribuido una función protectora en la naturaleza, se han encontrado en los exudados de árboles de madera o el látex de plantas herbáceas. El ácido abiético se encuentra ampliamente distribuido en las resinas de gimnospernas, especialmente en *Pinus*. En la resina del copal obtenida de leguminosas se encuentran varios diterpenos, por ejemplo el ácido Hardwico.

Dentro de los diterpenos tóxicos encontramos las grayano toxinas, como la grayanotoxina 1, la cual se encuentra en el tallo de *Rhododendron sp*, *Kalmia sp* y les confiere la naturaleza tóxica que presentan dichas plantas (Harborne, 1991).

En la tercera clase de diterpenoides se encuentran las giberelinas un amplio grupo de hormonas de origen natural las cuales generalmente estimulan el crecimiento vegetal (Harborne, 1991).

En otros estudios realizados en el pericarpio de aquenios de girasol en estado reproductivo se aislaron diterpenoides tales como kaurenos (ácido Kaur-16-en-19-oico), el traquilobano, ácido traquiloban-19-oico, 1-hexacosanol (un alcohol alifático) y el ácido angeloxy-grandiflorico, de los cuales las cantidades de ácido angeloxy-grandiflorico y ácido traquiloban-19 oico, son significativamente mayores en comparación con los demás compuestos obtenidos a partir de esta estructura (Rogers *et al.*, 1995). De trabajos realizados en inflorescencias de girasol variedad SH-222 en estado reproductivo, fueron aislados los ácidos diterpénicos traquiloban-19-oico (IIIa) junto con el ácido kaur-16-en-19-oico (Ia) (Pyrek, 1970). En el cuadro No. 1 se muestra algunos diterpenoides aislados de girasol.

Cuadro 1.- Terpenoides aislados del girasol (tipo de extracto y órganos vegetales de los que se han extraído).

<i>Estructura Vegetal</i>	<i>Tipo de Extracto</i>	<i>Estadio fenológico</i>	<i>Variiedad</i>	<i>Grupo Químico</i>	<i>Especie Química</i>	<i>Técnica de Identificación</i>	<i>Referencia</i>
Inflorescencias Frescas	Etéreo saponificado	Reproductivo	SH-222	Diterpenoide Kaureno	Ác. Traquiloban-19-oico Ác (-)-kaur-16-en-19-oico	Espectro de IR y RMP así como Pf	Pirek, 1970
Hojas frescas	Acuoso	Vegetativo	SH-222	Sesquiterpeno	Heliannuol A	EM y Difracción de RX	Macías, <i>et al.</i> , 1993a
Hojas Frescas	Acuoso	3er estado de desarrollo vegetal 1 mes antes de la cosecha	SH-222	Lactonas sesquiterpénicas tipo Guainolides	Annuolides A-E	EM, ¹³ C-RMN y ¹ H-RMN	Macías, <i>et al.</i> , 1993b
Pericarpio de aquenios	Cloruro de metileno	Reproductivo	RHA265, 266, 270, 278	Ác. Diterpénicos	Ác. Kaur-16-en-19-oico Ác. Traquiloban-19-oico, 1 hexaconasol Ácido Angeloxy-grandiflorico	Cromatografía columna/gases y EM	Rogers, <i>et al.</i> , 1995

4.2.2.4 Triterpenoides

Su esqueleto se compone de treinta átomos de carbono basado en seis unidades de isopreno (fig. 6). Biosintéticamente son derivados del escualeno, hidrocarburo acíclico. Estos compuestos tienen estructuras cíclicas relativamente complejas, la mayoría existe como alcohol, aldehídos o ácidos carboxílicos (Harborne, 1991).

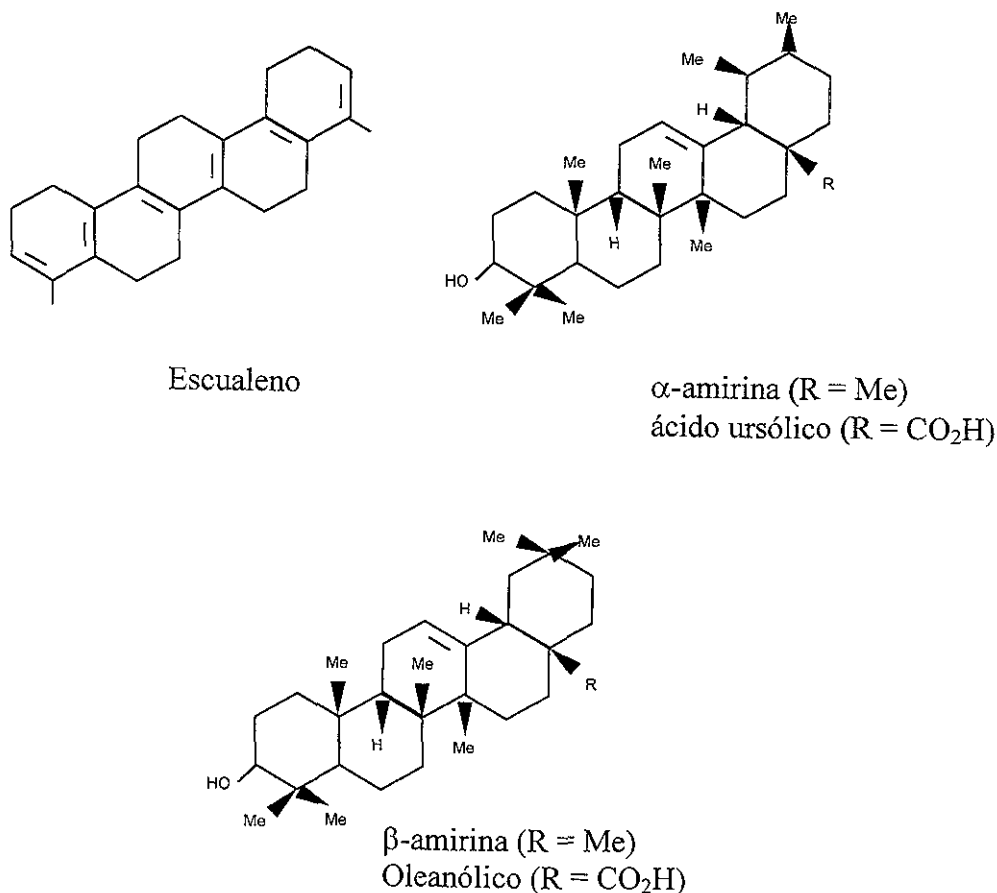


Figura 6.- Triterpenoides (Basado en Harborne, 1991).

4.2.2.5 Tetraterpenoides o carotenoides

Su esqueleto se compone de cuarenta átomos de carbono basado en ocho unidades de isopreno un ejemplo de estos compuestos es el β -caroteno (Harborne, 1991).

4.2.2.6 Poliisopreno:

Su esqueleto se compone de n átomos de carbono y está basado en n unidades de isopreno el caucho de *Hevea brasiliensis* forma parte de este grupo (Harborne, 1991).

4.3 Bioensayo

Un bioensayo, en términos generales es una prueba que sirve para establecer la respuesta que produce un agente dado, cuando los organismos vivos son expuestos a él y al cabo de un tiempo se evalúa el efecto que dichos agentes provocan sobre el ser vivo en cuestión (Bitton y Dutka, 1986).

Cuando se realizan bioensayos con vegetales después de un período de exposición al compuesto probado, se evalúan, entre otros parámetros, el proceso de germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas o plantas adultas (o alguno de sus tejidos), la actividad de algunos procesos fisiológicos (fotosíntesis, respiración, contenido en clorofila, etc.). Generalmente se prefieren medidas de germinación y crecimiento a parámetros fisiológicos, ya que los primeros ofrecen información indirecta de la acción de los segundos, cubriéndose un intervalo más amplio de efectos. Los parámetros globales ofrecen la ventaja de que los efectos son más evidentes, necesitan aparatos simples, resultan fácilmente reproducibles; además inciden en un período muy importante: el del establecimiento de las especies (Castellano *et al.*, 2000).

Los bioensayos de germinación de especies vegetales se llevan a cabo principalmente a escala de laboratorio. Se realizan en cajas Petri o en cajas especiales donde se hacen germinar en condiciones muy controladas de luz, temperatura, humedad. pH, un número conocido de semillas de diversas especies receptoras, las cuales se toman como modelos de las especies de maleza a combatir. La objeción fundamental que reciben es la de no ser muy representativos de las condiciones naturales, como las variaciones diarias de temperatura, la presencia de microorganismos o de otras especies, que modifican las respuestas de los agen-

tes aleloquímicos (Castellano *et al.*, 2000), pero en primera instancia ofrecen información valiosa acerca de la actividad biológica de los extractos en estudio.

La germinación de semillas en el laboratorio constituye un modelo muy adecuado para evaluar condiciones ecológicas como las de alelopatía, sequía, acidez, alcalinidad, etc., y ofrece posibilidades para revelar el comportamiento de las mismas y sugerir mecanismos de funcionamiento y plantear estrategias de manejo y/o solución.

El bioensayo con semillas tiene varias ventajas (Angeles, 1999):

Las semillas almacenadas adecuadamente permanecen viables durante un largo tiempo, pudiéndose activar en algún momento, dando la posibilidad de realizar la prueba cuando se requiere; ello es una ventaja sobre otras pruebas en las cuales los especímenes son costosos y de difícil mantenimiento, en algunos casos sólo desarrollables en un determinado tiempo.

La prueba es simple e inofensiva y hacerla no requiere mayor equipo. Por lo general se emplea un pequeño volumen de muestra. Estos bioensayos pueden ser realizados casi sin ningún riesgo, pues el contacto humano es mínimo.

El efecto tóxico del aleloquímico puede ser evaluado experimentando con diferentes tipos de semillas ya sea a través del porcentaje de germinación y elongación de radícula y plántula, determinación de biomasa, o bien se podría evaluar mediante alguna reacción bioquímica.

Algunas de las especies que han sido recomendadas para pruebas de ecotoxicidad usando métodos de germinación de semillas y elongación de radícula son: lechuga, rábano, trébol rojo y trigo, especies agrícolas importantes en términos de familia, distribución y abundancia. La inhibición de la elongación de la raíz es un indicador válido y sensible de toxicidad ambiental (Ratsh, 1983).

4.3.1 Germinación de semillas

La germinación de la semilla de una planta la podemos considerar como una serie de pasos consecutivos que dan como resultado que una semilla en estado latente, con una pequeña cantidad de agua, muestre un incremento en su actividad metabólica general e inicie la formación de una plántula. Asimismo, cuando las condiciones no son favorables para que se lleve a cabo este proceso, el porcentaje de germinación se reduce (Angeles, 1999).

La semilla madura de la planta contiene un embrión o planta rudimentaria, que tiene la capacidad de crecer en condiciones apropiadas y convertirse en una nueva planta. Acompaña al embrión en la semilla una reserva compacta de alimento que es suficiente para abastecer a la plántula hasta que ésta se halle en capacidad de alimentarse por sí misma. Además, está rodeada por una cubierta especialmente permeable (Angeles, 1999).

La semilla es una estructura en reposo; por lo regular está sumamente deshidratada, compuesta principalmente de tejido de reserva. Los procesos metabólicos ocurren muy lentamente o están suspendidos; la semilla está en una condición de vida latente, debido principalmente a su carencia de agua y oxígeno. El proceso de germinación consiste en la absorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento. Durante la germinación, uno de los extremos del embrión, originará la radícula, que más tarde será la raíz de la planta; el vástago, formará el tallo y las hojas (Angeles, 1999).

4.3.2 Factores que afectan la germinación

Las semillas puestas a germinar, se encuentran sometidas a una serie de factores ambientales fluctuantes que, a la larga, determinan su germinación, su supervivencia en letargo o su muerte. Estos factores son de dos tipos: abióticos y bióticos.

Los factores abióticos son los ya conocidos de agua, temperatura, gases y luz, a los que puede añadirse la presencia de sustancias tóxicas.

4.3.2.1 Agua

El primer proceso que ocurre durante la germinación es la entrada de agua a la semilla conocida como imbibición. El grado de imbibición está determinado por tres factores: la composición de la semilla, la permeabilidad de la testa y la disponibilidad de agua líquida o en forma de vapor en el ambiente. Durante la imbibición las moléculas del disolvente penetran a la testa la cual se hincha provocando solvatación de las partículas coloidales y por adición, ocupan los espacios capilares libres y los espacios intermicelares del coloide, generándose la presión de absorción que puede alcanzar centenares de atmósferas y que es de gran importancia en los procesos de germinación, ya que esto conduce al rompimiento de la testa de la semilla, de esta manera posibilita la emergencia del embrión y también genera espacio en el suelo para el desarrollo de la plántula. La magnitud de la presión de absorción es también un indicativo del poder de retención de agua por la semilla y por lo tanto determina la cantidad de agua disponible para la rehidratación de los tejidos de la semilla durante la germinación. En las semillas la absorción de agua es determinada por los coloides hidrofílicos. Los coloides están caracterizados por el tamaño de partículas en la fase de dispersión y la absorción es una propiedad de los coloides que están en forma de gel, donde las partículas coloidales constituyen una red continua formando una malla y mostrando una cierta rigidez (Mayer Y Poljakoff Mayber, 1989).

En semillas el principal componente que absorbe agua es la proteína. Sin embargo, otros componentes también la retienen. La absorción puede diferir en diferentes especies de semillas de acuerdo a la naturaleza de sus proteínas en cada nivel de hidratación, solo ciertas funciones fisiológicas pueden tener lugar. Así en los niveles más bajos de hidratación casi no se detecta actividad enzimática (Mayer y Poljakoff Mayber, 1989). Para la presente investigación la cantidad de agua que se aplicó fue constante y el volumen utilizado fue el óptimo requerido por la especie para la germinación bajo las condiciones de estudio.

4.3.2.2 Temperatura

Las semillas de las diferentes especies requieren de intervalos de temperatura variados para su germinación. Las semillas cuando están secas pueden tolerar temperaturas extremas, pero cuando se hidratan se vuelven más sensibles a dicho factor.

La temperatura óptima de germinación para una especie es aquella a la que se obtiene el porcentaje de germinación más alto en el tiempo más corto. Así para maíz se menciona una temperatura óptima de germinación entre 32 y 35 °C, para avena entre 25 y 31°C y para amaranto entre 25 a 27°C (Mayer y Poljakoff Mayer, 1989).

4.3.2.3 Gases

La germinación es un proceso relacionado con células vivas y requiere un gasto de energía. El requerimiento de energía de células vivas es usualmente conocido por la utilización de ATP, el cual se sintetiza por el proceso de oxidación aeróbica, aunque cierto ATP es formado como resultado de la glicólisis (Hourmant y Pradet, 1981; Raymond *et al.*, 1983). La mayoría de las semillas germinan en una atmósfera que contiene 20% de oxígeno y un bajo porcentaje de CO₂ 0.03%. Sin embargo, muchos autores han mostrado que ciertas semillas responden a un incremento en la concentración de oxígeno arriba del 20% por ejemplo *Xanthium* y ciertos cereales. Por otro lado, ciertas semillas mostraron un incremento en la germinación cuando el contenido de oxígeno en el aire disminuyó por abajo del 20%. Ejemplos de estas semillas son *Typha latifolia* y *Cynodon dactylon* las cuales germinaron mejor en presencia de aproximadamente 8% de oxígeno (Morinaga, 1926a,b). La germinación puede ser inhibida por una baja concentración de oxígeno.

Muchas semillas no logran germinar si la concentración de dióxido de carbono esta muy incrementada como se mostró para *Hordeum vulgare* y *Brassica alba*

(Kidd ,1941). En la presente investigación, la germinación se llevo a cabo bajo condiciones atmosféricas constantes (20% de oxígeno).

4.3.2.4 Luz

No existen muchas evidencias de que la luz sea un factor que influya en la germinación de las semillas. Muchos cultivos de plantas usualmente germinan igual en oscuridad que en la luz, sin embargo, también existen las semillas que solo germinan en la oscuridad y las que únicamente lo hacen en la luz (Mayer y Poljakoff Mayber, 1989).

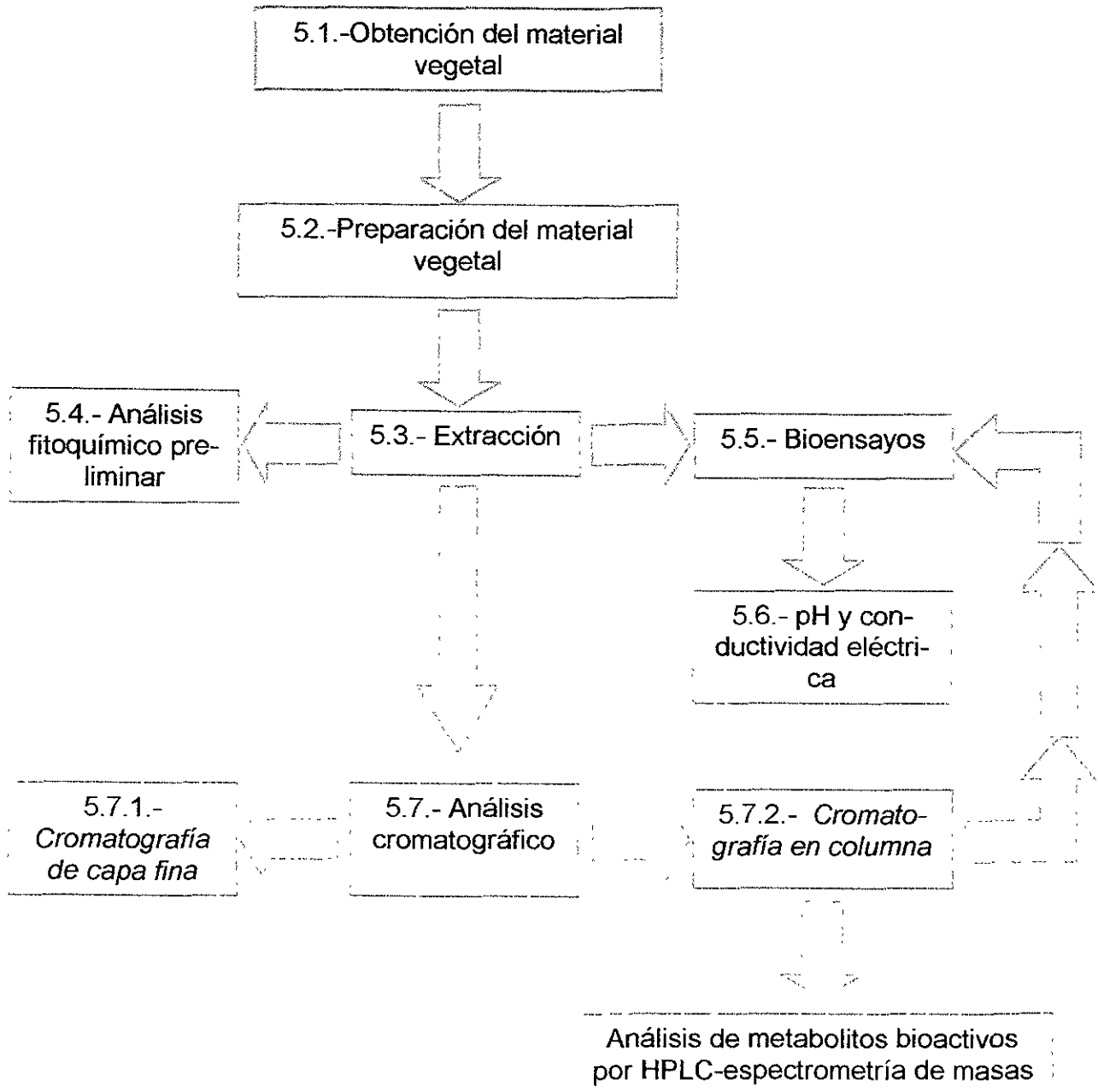
4.3.3 Factores Bióticos

Las semillas en su hábitat natural interactúan con plantas y animales. La interacción para estas plantas puede ser a través de inhibidores, estimuladores o modificadores del micro hábitat. Los animales pueden afectar el desarrollo de la germinación al suavizar la testa cuando la semilla pasa a través del tracto digestivo, o por la distribución hacia otros hábitats. El hombre a través de sus actividades también afecta la germinación de las semillas, ya sea por el manejo o por cambios tecnológicos que ocasionan cambios al ambiente. El fuego accidental o planeado también afecta la germinación (Mayer y Poljakoff Mayber, 1989).

El presente estudio se realizó utilizando el bioensayo de germinación y crecimiento de plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* L.

V MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama de flujo que muestra las principales etapas de la fase experimental.



Nota.- Para cada recuadro del diagrama se mencionan los detalles en las páginas siguientes.

Todos los reactivos empleados en este estudio son de la marca Merck, grado analítico a excepción de los reactivos en los cuales se indica la marca respectiva

5.1.- Obtención del material vegetal

El material vegetal se obtuvo a partir de girasol cv Victoria (cosecha 1998) de 118 días de madurez fisiológica; cultivado en los Campos Experimentales del Colegio de Postgraduados, México (19°29'N y 98°54'O, 2250msnm).

5.2.- Preparación del material vegetal

Se utilizaron plantas de girasol obtenidas a la cosecha. Dichas plantas fueron separadas en tallo y receptáculo, que son los órganos que prevalecen a la cosecha. Una vez hecho esto, se procedió a retirar los aquenios del capítulo quedando solamente el receptáculo. Posteriormente se hizo un secado a temperatura ambiente. Una vez seco el material vegetal, se molió utilizando un molino para forrajes de tipo artesanal.

5.3.- Extracción

Materiales:

3 Pliegos de papel Whatman No. 1

Tijeras

Engrapadora

Cucharón

9 Frascos ámbar

3 Matraces bola de 1L

1 Pipeta Pasteur

1 Embudo de plástico de cuello corto

1 Vaso de precipitados de 500 mL

Probeta graduada de 500 mL

Material Vegetal:

Tallos y Receptáculos de girasol secos y molidos.

Equipo:

Soxhlet

Balanza granataria con capacidad de 2.5 kg Ohaus

Rotaevaporador Modelo R-114 Büchi

Reactivo:

Alcohol etílico.

Procedimiento:

Los tallos y receptáculos de girasol se sometieron a una extracción continua sólido – líquido, utilizando un equipo Soxhlet. Para ello se preparó el cartucho y se introdujo el material vegetal (tallo o receptáculo). En total se trabajó con un kg de material vegetal seco y molido de cada órgano, el cual por razones de la capacidad del equipo de extracción se distribuyó en 3 cartuchos (con 333 g cada uno). Se emplearon 2.1L de alcohol etílico. La extracción se realizó por 24 horas, cambiando el disolvente cada 8 horas.

Los extractos colectados a las 8,16 y 24 horas se concentraron en el rotaevaporador a una temperatura entre 45 y 50 °C. Una vez eliminado el disolvente fueron pesados y posteriormente unidos para constituir un solo extracto por órgano.

5.4.- Análisis fitoquímico preliminar

Material:

15 Tubos de ensayo de 2.5X12 cm

6 Pipetas graduadas de 5 mL

1 Gradilla

Reactivos:

Cinta de magnesio en trocitos

Ácido Clorhídrico concentrado.

Reactivo de Folin Ciocalteu

Reactivo de Liberman – Burchard su preparación se indica en el apéndice A.

Reactivo de Dragendorff su preparación se indica en el apéndice A.

Agua destilada

Metanol

Equipo:

Balanza analítica Modelo HK 160 Mettler

Agitador rotatorio para tubos de ensayo Modelo 129 Lab Line Instruments, Inc.

Procedimiento:

Este análisis consiste en identificar a partir de reacciones colorimétricas, los principales grupos de metabolitos secundarios que pudiesen estar presentes en los tejidos vegetales.

El procedimiento se aplicó, según se indica en el manual de prácticas de fitoquímica, Soto y Rodríguez (2000).

Se pesaron 300 mg de extracto crudo etanólico y se disolvieron en 50 mL de metanol o agua destilada, se tomaron alícuotas de 2.5 mL de esta solución y se depositaron en tubos de ensayo, 15 en total ya que el análisis se realizó por triplicado.

Determinación de alcaloides:

Se adiciona a la muestra 1 mL de reactivo de Dragendorff. (apéndice A). La formación de un precipitado marrón, indica la presencia de alcaloides.

Determinación de saponinas:

Se adicionaron 2 volúmenes de agua destilada a cada muestra, y se agitó vigorosamente por 5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja durante 15 minutos aproximadamente, indica que la prueba es positiva.

Determinación de flavonoides

Se añadió a cada muestra un trocito de cinta de magnesio y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. La formación de espuma rojiza es indicativa de la presencia de flavonoides.

Determinación de terpenoides:

Se adicionó a cada muestra 1 mL de reactivo de Liberman – Burchard (apéndice A). El desarrollo de color violáceo indicó la presencia de triterpenoides.

Determinación de ácidos fenólicos:

A cada muestra se agregó 1 mL de reactivo de Folin Ciocalteu y se agitó. La formación de un color azul indicó la presencia de ácidos fenólicos.

5.5 Bioensayo de los extractos

Material:

6 matraces aforados de 50 mL

18 cajas Petri de 10 cm de diámetro, con cuatro divisiones

Papel Whatman No. 1

6 vasos de precipitados de 100 mL

7 pipetas graduadas de 5 mL

Equipo:

Estufa de incubación Modelo 2480 Scientific Scorpio.

Reactivos:

Metanol

Agua destilada

Material Biológico:

Semillas de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.)

Procedimiento:

A partir del extracto crudo, se prepararon soluciones a 1000, 500 y 250 ppm utilizando como disolvente metanol. En cajas Petri de 10 cm de diámetro con 4 divisiones se colocó una base de papel Whatman No.1(2 triángulos por división), enseguida se adicionó 1.1 mL de la solución metanólica del extracto por división. Una vez que se evaporó perfectamente el metanol se agregó 1.1 mL de agua destilada y se colocaron 10 semillas de amaranto por división. La prueba se realizó

por triplicado. Se utilizaron 2 testigos los cuales se rotularon como testigo absoluto y testigo metanol – agua, que se prepararon de la siguiente forma: Se colocó en cada división de la caja Petri una base de papel filtro, al testigo metanol – agua, se le adicionó 1.1 mL de metanol. Una vez evaporado, se agregó 1.1 mL de agua destilada. Al testigo absoluto sólo se le adicionó 1.1 mL de agua destilada y de igual forma se colocaron 10 semillas por división.

Las cajas así preparadas, se incubaron por 48 horas a 27 °C, en la oscuridad. Se registró el porcentaje de inhibición de la germinación a las 24 y 48 horas y la elongación de la radícula y vástago a las 48 horas. Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS.

5.6.- pH y conductividad eléctrica de los extractos crudos etanólicos de tallo y receptáculo

Material:

3 matraces aforados de 100 mL.

Reactivos:

Agua destilada

Material biológico:

Extracto etanólico de tallo y receptáculo

Equipo:

Potenciómetro Modelo 210A Orión

Electrodo de calomel

Balanza analítica Modelo HK 160 Mettler

Procedimiento:

A partir del extracto crudo se prepararon soluciones a 1000 y 500 ppm utilizando como disolvente agua destilada. Se colocaron las soluciones en vasos de precipitados de 150 mL. Se procedió a registrar el pH del agua destilada a una temperatura de 25°C, de igual forma se determinó el pH y la conductividad eléctrica de cada una de estas soluciones, utilizando como testigo agua destilada.

5.7.- Análisis cromatográfico

Se realizaron dos tipos de cromatografía:

5.7.1.- Análisis cromatográfico de los extractos crudos etanólicos de tallo y receptáculo por cromatografía en capa delgada

Material:

2 Vasos de precipitados de 5 mL

5 Placas analíticas de *silica gel* de 20 X 20 cm

Capilares

2 Cámaras de elución

4 Probetas de 100 mL

Reactivos:

Tolueno

Acetato de etilo

Hexano

Etanol

Reactivo de Anisaldehído su preparación se indica en el apéndice A.

Ácido perclórico (J.T. Baker)

Anhídrido acético (J.T. Baker)

Ácido sulfúrico (J.T. Baker)

Hielo

Equipo:

Estufa de calentamiento

Lámpara UV $\lambda=254\text{nm}$

Campana de Extracción

Procedimiento:

Este análisis se hizo para realizar una identificación preliminar de los compuestos de interés en los extractos crudos de tallo y receptáculo.

Se partió de 30 mg de extracto, el cual fue disuelto en metanol y depositado en forma de banda sobre una cromatoplaqueta cuantitativa de sílica gel. Hacia los extremos de la banda de muestra y dejando una distancia de 1.5 cm, se colocaron los estándares de diterpenoides (FII= ácido kaur-16-en-19-oico y FIX = ácido grandiflorico).

La fase móvil para eluir los diterpenoides fue: tolueno - acetato de etilo (7:3). Posteriormente, los cromatogramas fueron revelados con reactivo de anisaldehído.

Para la identificación de los posibles compuestos fenólicos, se utilizó una cromatoplaqueta, en la cual se colocó la muestra y los estándares de esta naturaleza, los estándares y muestra fueron colocados en forma de punto de manera individual, y posteriormente se realizó una mezcla de estándar con muestra y se aplicó en for-

ma de punto. La fase móvil para eluir los compuestos fenólicos fue: hexano - acetato de etilo (1:1).

Una vez que eluyeron las muestras, y se evaporó la fase móvil del cromatograma, fue analizado bajo luz ultravioleta, para realizar una identificación preliminar de los compuestos fenólicos. Posteriormente fue revelado con Reactivo de Folin Ciocalteu.

De acuerdo a los resultados obtenidos se procedió en consecuencia, realizando la cromatografía en columna para el extracto seleccionado.

5.7.2.-Análisis por cromatografía en columna del extracto seleccionado

Material:

Columnas de vidrio de 5.0 cm de diámetro y 72 cm de altura; 2.5 cm de diámetro y 40 cm de altura.

Papel Whatman No. 1

1 Vaso de precipitados de 200 mL

Agitador

Espátula

4 probetas graduadas de 250 mL

Fibra de vidrio

8 Matraces bola de 250 mL

Placas analíticas de 2 X 5 cm

66 frascos ámbar

regla de 30 cm

Equipo:

Bomba para vacío Modelo 4QD48C17011BP Industries Inc.

Rotaevaporador Modelo R-114 Büchi.

Balanza Analítica Modelo HK 160 Mettler.

Parrilla de calentamiento Modelo SP46925 Barnstead / thermolyne.

Reactivos :

Silica gel 60 GF Merck para columna.

Silica gel F₂₅₄ Merck para placa.

Metanol

Tolueno

Acetato de etilo

Éter etílico

Ácido sulfúrico 5M

Material Biológico:

Extracto crudo de receptáculo de girasol

Procedimiento:

Este análisis se realizó con el fin de separar el o los compuestos de interés presentes en el extracto seleccionado.

Preparación de la columna. Se preparó por vía seca: para ello se utilizó una columna de vidrio de 5.0 cm de diámetro y 72 cm de altura con base de vidrio poro-

so, así como una entrada para vacío. Se colocó dentro de la columna y a la altura del filtro un círculo de papel Whatman No. 1, de igual diámetro al filtro. Se adicionó tolueno para adherir el papel al filtro; enseguida se colocaron 90 g de sílica gel para columna y se compactó.

Preparación de la muestra. Se pesaron 10 g del extracto en estudio y se disolvieron en un pequeño volumen de metanol, se le adicionaron 20 g de sílica gel y se mezclaron hasta que la sílica adsorbió a la muestra en su totalidad. Se procedió a eliminar el metanol de la muestra en el rotaevaporador. La muestra así preparada se depositó dentro de la columna y se compactó perfectamente. Sobre la muestra se colocó un filtro de papel Whatman No. 1 y enseguida un poco de fibra de vidrio, con la finalidad de amortiguar la caída de la mezcla de elusión.

La cromatografía en columna se realizó al vacío, usando los siguientes eluyentes:

Tolueno 400 mL.

Tolueno : Éter etílico (9:1) 500 mL.

Tolueno : Acetato de etilo (8:2) 1L.

Tolueno : Acetato de etilo (7:3) 500 mL.

Tolueno : Acetato de etilo (6:4) 100 mL.

Acetato de etilo (al 100%) 500 mL.

Acetato de etilo: Metanol (9:1) 500 mL.

Acetato de etilo: Metanol (8:2) 100 mL.

Acetato de etilo: Metanol (7:3) 500 mL.

Cada eluato, fue concentrado en el rotaevaporador hasta alcanzar un volumen de 3 mL. Los eluatos fueron monitoreados por cromatografía en capa fina en placas analíticas de *silica gel* (2X5 cm) y revelados con ácido sulfúrico 5M.

A las muestras obtenidas como resultado de este proceso se les aplicó el bioensayo de germinación como se indica en el apartado 5.5.

Las muestras que presentaron una mayor inhibición en la germinación se separaron por cromatografía en columna.

Preparación de la columna. El procedimiento para la preparación de la columna es similar al utilizado en el análisis por cromatografía en columna del extracto, con las siguientes variantes. Se utilizó una columna de 2.5 cm de diámetro y 40 cm de largo, y se empacó con 34.7g de *silica gel* para columna.

Preparación de la muestra. El procedimiento es similar al descrito en la preparación del extracto, excepto que en este análisis, la cantidad de muestra es de 1.3 g y 5.5 g de *silica gel* para columna. La cromatografía se realizó al vacío, utilizando los siguientes eluyentes.

Tolueno : Acetato de etilo (1:1) 210 mL.

Tolueno : Acetato de etilo (4:6) 140 mL.

Tolueno : Acetato de etilo (3:7) 140 mL.

Tolueno : Acetato de etilo (2:8) 100 mL.

Cada eluato, fue concentrado en el rotaevaporador hasta alcanzar un volumen de 3 mL. Los eluatos fueron analizados en cromatoplasmas de *silica gel* (2X5 cm) y revelados con ácido sulfúrico 5M. De este análisis se obtuvieron siete fracciones de las cuales se eligió la No.2 (tolueno – acetato de etilo 1:1), dado que en ésta se observaba un solo compuesto, y el bioensayo de germinación que se aplicó como se indica en el apartado 5.5, mostró una inhibición del 100%.

VI Resultados y discusión

6.1.- Análisis de Extractos

Los resultados de las extracciones practicadas a las muestras de receptáculo y tallo se muestran en el cuadro 2, y corresponden a los valores por triplicado de la masa seca total extraída (g de solutos etanólicos) por masa seca de material vegetal (kg).

Cuadro 2.- Sólidos solubles (g) en etanol obtenidos de receptáculo y tallo a distintos tiempos.

CARTUCHO No.	Tiempo de reflujo		
	0-8 hrs	8-16 hrs	16-24 hrs
Receptáculo I	43.7533	18.5910	6.7793
Receptáculo II	43.5368	18.9599	6.4845
Receptáculo III	29.0082	11.4822	6.0896
Promedio	38.7661	16.3443	6.4511
Tallo I	9.9133	3.3141	1.2021
Tallo II	9.9201	3.3071	1.1233
Tallo III	12.7540	4.0362	1.3756
Promedio	10.8624	3.5524	1.2336

El 66.20% de solutos obtenidos del receptáculo y 58.04% del tallo son extraídos en las 8 horas por lo que, a causa de su naturaleza, son bastante solubles en etanol; existen otros compuestos que son moderadamente solubles: 25.42 y 26.56% de receptáculo y tallo respectivamente, y se obtuvieron de 8 a 16 horas; por último están los que son pobremente solubles que tienen que pasar por un proceso de más de 16 horas de reflujo y que correspondieron al 8.37 y 15.40% de receptáculo y tallo respectivamente.

La naturaleza química del primer extracto, debe ser primordialmente orgánica y polar, como sería el caso de moléculas con grupos funcionales correspondientes a los ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles y otros compuestos protónicos polares.

Las sustancias con estas características, pueden afectar la conductividad eléctrica en la solución, por lo que deben ser lo suficientemente polares como para salir en el primer extracto colectado; por lo tanto, estas sustancias deben ser de las más abundantes, ya que dicho extracto es el más rico en sólidos solubles en etanol, disolvente que resulta ser suficientemente polar para interactuar con dichas sustancias.

La polaridad de los otros extractos disminuyó y es cada vez menor en la medida en que van saliendo. Esto es, que conforme los compuestos presentes son menos polares, más difícil es su extracción con etanol.

Las diferencias observadas, tienen especial relevancia en el sentido que las distintas estructuras, presentan una composición química diferente no sólo en cuanto a la presencia de compuestos sino también en su abundancia, ya que cada estructura es el resultado de presiones genéticas y ambientales y presentan una ontogenia diferente (Mejía-Barradas, 1998; Aguilar, 1998).

6.2.- Pruebas preliminares (colorimétricas)

En el cuadro 3 se muestran los resultados de las pruebas preliminares (colorimétricas). Se detectó la presencia de compuestos fenólicos, terpenoides y flavonoides, lo cual nos indicó que la muestra es heterogénea en su composición y en ella no son relevantes las saponinas, ni los alcaloides.

Cuadro 3.- Pruebas preliminares (desarrollo de color) del extracto etanólico de tallo y receptáculo de girasol) en solución metanólica y acuosa(+ ligeramente colorida, ++ colorida, +++ muy colorida, respuesta negativa ---).

Material vegetal analizado	Solución	Flavonoides	Saponinas	Ácidos fenólicos	Alcaloides	Terpenoides
Tallo	Metanólica	---	---	++	---	++
	Acuosa	+	---	++	---	---
Receptáculo	Metanólica	---	---	++	---	++
	Acuosa	---	---	---	---	---

En dicho cuadro se observó que existieron diferencias en las dos disoluciones para un mismo órgano; por ejemplo en solución metanólica, el tallo presentó respuesta negativa a flavonoides, en tanto que en solución acuosa es positiva, posiblemente esto se debió a que los compuestos son solubles en agua; mientras que para el receptáculo el resultado es negativo en ambas soluciones. Por otro lado, los ácidos fenólicos en tallo tienen el mismo comportamiento en ambas soluciones, en tanto que en receptáculo únicamente se observa respuesta positiva en solución metanólica, tal vez la concentración de estos compuestos en dicho órgano es baja y sólo logra solubilizarse en metanol. Para el caso de terpenoides, la respuesta es positiva en las soluciones metanólicas de ambos órganos, sin embargo en solución acuosa la respuesta es negativa, posiblemente esto tenga que ver con la solubilidad de los metabolitos en este disolvente, aunque la mayoría de los estudios enfocados a efectos aleloquímicos se ha realizado en órganos tales como hojas frescas (Macías *et al*, 1993a), inflorescencias (Pyrek, 1970), o pericarpio de aquenios (Rogers *et al*, 1995), dando como resultado la existencia de sustancias que ejercen este efecto alelopático. Es importante el resultado que se obtiene en este análisis ya que se observó que también estos órganos presentan dicho tipo de compuestos, aunque la etapa fenológica de esta planta en trabajos

anteriores, es en su mayoría en estado vegetativo y/o reproductivo, en tanto que este análisis se realizó en órganos en estado senescente. Asimismo, Aguilar (1998) reporta haber encontrado terpenoides en ambas estructuras, en esta etapa fenológica de la planta. Es importante considerar este aspecto ya que el metabolismo de la planta se va modificando, así como sus requerimientos nutricionales. Lo anterior se debe a que durante el desarrollo de la planta, los diferentes órganos y estructuras presentan una demanda de metabolitos primarios y secundarios propios de cada etapa específica, los cuales cambian constantemente en su composición y abundancia conforme pasan de una a otra etapa, redistribuyéndose de cierto órgano o tejido a otro más demandante; por lo que los metabolitos, en especial los terpenoides se encuentran en diferentes proporciones y composiciones en las distintas estructuras de la planta, dependiendo de sus necesidades (Aguilar, 1998).

6.3- Bioensayo de inhibición de la germinación de amaranto con extractos etanólicos de tallo y receptáculo.

Los resultados del bioensayo (apéndice B, cuadro 1 y 2) con los extractos de tallo y receptáculo a distintas concentraciones y en distintos tiempos (24 y 48 horas) se muestran en la figura 7. Las barras muestran la desviación estándar.

Para la concentración más alta estudiada (1000ppm), el extracto de tallo inhibió la germinación de amaranto en un 99.17 y 97.5% respectivamente, tanto a las 24 como a las 48 horas, en tanto que el extracto de receptáculo la inhibió en un 100% en ambos tiempos. En la concentración de 500ppm del extracto de tallo se observó una disminución en la inhibición de la germinación del 86.67 y 65.83% en las 24 y 48 horas respectivamente, en tanto que el extracto de receptáculo provocó una fuerte inhibición de la germinación de *A. hypochondriacus* (100 y 99.17%) para los mismos tiempos indicados.

Para la concentración más baja estudiada (250 ppm), el extracto etanólico de tallo inhibió en menor grado la germinación de *A. hypochondriacus* (64.17 y 39.17%)

ste efecto fue observado a las 24 y 48 horas, en tanto que, a dicha concentración para las 24 horas el extracto etanólico de receptáculo siguió inhibiendo la germinación en un 100%, sin embargo, a las 48 horas esta inhibición disminuyó a 85%; es claro que el tiempo si influyó en la inhibición de la germinación de *A. Hypochondriacus* a esta concentración.

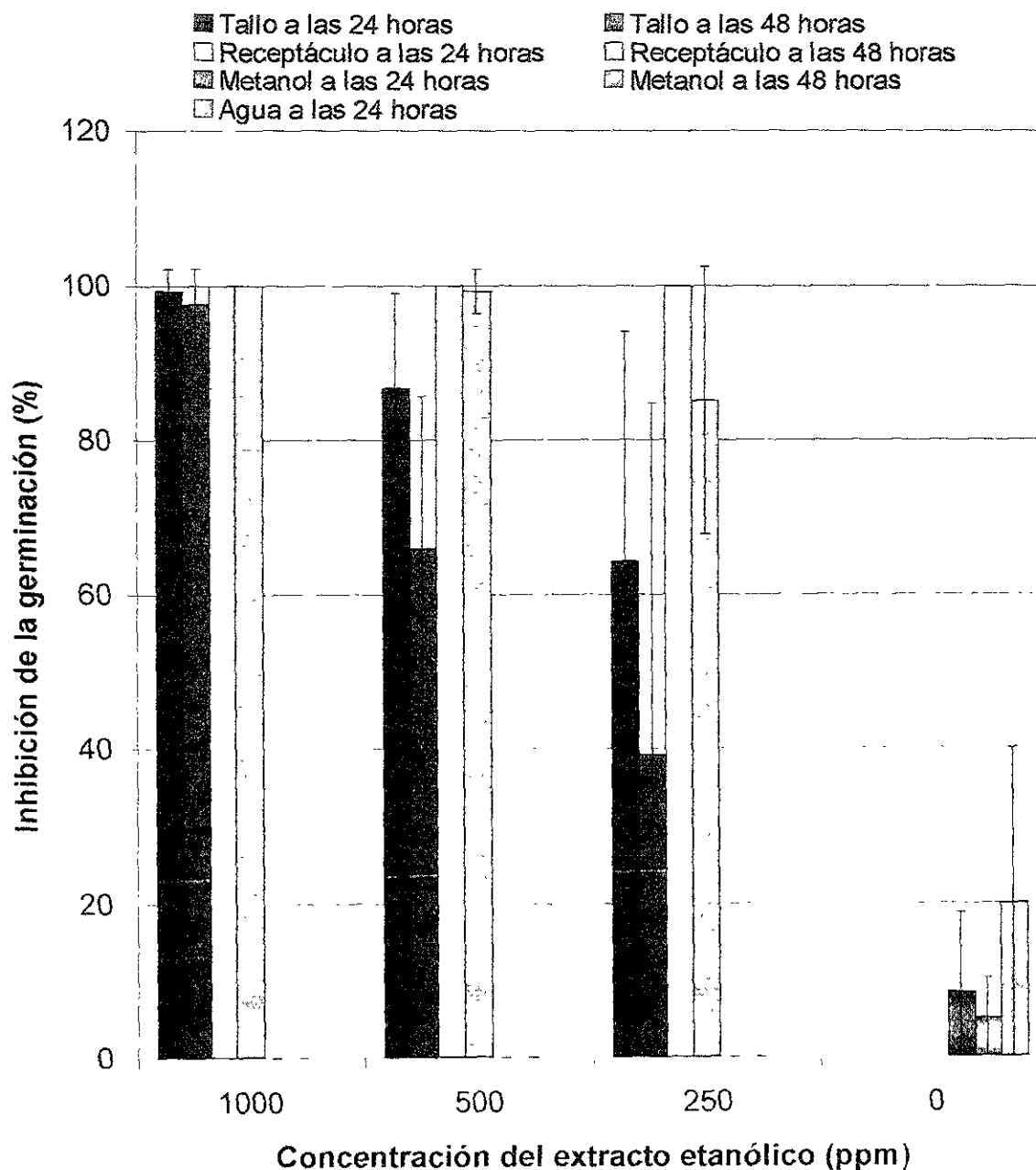


Figura 7- Inhibición a las 24 y 48 hrs de *A. hypochondriacus* con diferentes concentraciones de extractos etanólicos de tallo y receptáculo.

Es importante señalar que el testigo metanol – agua a las 24 horas presenta un 91.67% de germinación y 95% a las 48 horas, lo cuál nos indica que el disolvente empleado para la disolución de la muestra no ejerce efecto inhibitorio sobre las semillas.

6.4.- pH y conductividad eléctrica

Entre los factores que afectan la germinación de las semillas se encuentran el pH y la conductividad eléctrica, debido a que la absorción por parte de la semilla, depende del pH de la solución. Por otro lado, esta absorción depende también de la cantidad de electrolitos presentes en la solución, así como de la naturaleza de los mismos. De ahí la importancia de realizar este análisis.

Cuadro 4.- Potencial de hidrógeno (pH) presente en las soluciones de tallo y receptáculo a diferentes concentraciones.

Concentración del extracto ppm	pH	
	Receptáculo	Tallo
250	4.94	4.74
500	4.32	4.60
1000	3.88	4.55

La lectura de pH para el agua destilada (testigo) fue de 7.0, en el cuadro 4 observamos que prácticamente todas las soluciones tienen pH de carácter ácido, siendo más acentuado en la solución del extracto de receptáculo a una concentración de 1000 ppm, sin embargo, valores de pH de 3 a 11 no afectan la germinación de *A. Hypochondriacus* (Rodríguez, 2001, resultados no publicados), por lo cuál, el pH no esta ejerciendo efecto de inhibición sobre la germinación de amaranto en estas

En dicho cuadro, también se observan los valores para cada uno de los tratamientos aplicados, así como la inferencia estadística correspondiente (SAS y DSH). De este modo podemos indicar que con respecto a los testigos de agua (1) y metanol - agua (2), no se observaron diferencias significativas entre los testigos, lo cual nos indicó, que el metanol no afectó los parámetros (longitud de radícula, vástago y plántula). Con respecto a los extractos de tallo y receptáculo, éstos inhibieron significativamente la elongación de la radícula y el vástago de amaranto con respecto al testigo.

Para las concentraciones de 250 y 500 ppm de extracto de tallo, se observó un mismo comportamiento estadístico para la elongación de la radícula (cuadro 6). Sin embargo, con respecto a vástago sí se encontró diferencia significativa y ésta se ve reflejada en la elongación de la plántula. Para el testigo, se puede observar que el extracto de tallo inhibió la elongación de la radícula en un 50%, la del vástago en un 55%, y la de la plántula en 52%.

Por otro lado, el extracto de receptáculo mostró una diferencia significativa con respecto a los testigos (cuadro 6), en el cual la elongación de la radícula, vástago y plántula mostraron ser significativamente inhibidas (74%, 77% y 75%), en promedio resultaron inhibidas en un 75%. De estos resultados se desprende que el extracto de receptáculo, aún en la concentración más baja presentó un efecto inhibitorio significativo para amaranto.

Para los residuos a la cosecha de tallo y receptáculo, Aguilar(1998) encuentra una mayor concentración de agentes alelopáticos en el extracto etanólico de receptáculo, esto apoya los resultados que aquí se muestran, en el sentido que el mismo extracto inhibió la germinación de amaranto en un mayor grado que el extracto de tallo.

6.6- Análisis cromatográfico

Dado que en el extracto etanólico de receptáculo es en donde se observa el mayor efecto de inhibición de la germinación de amaranto, además de que los sólidos

presentes en el extracto de dicho órgano fueron más abundantes, y las soluciones preparadas con este órgano presentaron una conductividad eléctrica más baja que las del extracto de tallo, se decidió continuar las siguientes etapas de este estudio únicamente en el extracto etanólico de receptáculo.

Cuadro 7.-Bandas y sus respectivos valores de Rf obtenidos en la cromatografía en capa delgada, del extracto de receptáculo en la identificación de terpenoides.

Bandas No.	1	2	3	4	5	6	7
Valor Rf	0.13	0.21	0.45	0.55	0.65	0.74	0.91

En el cuadro 7 los valores de Rf obtenidos indican que la muestra es muy heterogénea en su composición. Lo que corresponde ahora es investigar que compuestos son y si alguno de ellos ejerce actividad alelopática sobre las semillas de amaranto.

Con respecto a los compuestos fenólicos (cuadro 8), éstos son claramente perceptibles en el cromatograma con luz UV, y se observan dos bandas, lo cual nos da un indicativo de que quizás estos compuestos no son abundantes en el receptáculo.

Cuadro 8.- Bandas y sus respectivos valores de Rf obtenidos en la cromatografía en capa delgada, del extracto de receptáculo en la identificación de compuestos fenólicos.

Bandas No.	1	2
Valor Rf	0.2	0.71

6.7- Cromatografía en columna del extracto seleccionado

La cromatografía en columna proporcionó diversas fracciones y combinada con la cromatografía en placa fina permitieron caracterizar 47 eluatos de modo preliminar. Los cuales se unieron para conformar 9 fracciones, el criterio utilizado para unir las muestras en las diferentes fracciones, fue en primera instancia la fase elu-

yente en la cual se obtuvieron, así como la mancha cromatográfica del compuesto observado en la cromatografía en capa delgada. En el cuadro 9 se resumen los resultados obtenidos en este análisis.

Cuadro 9.- Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna a partir del extracto etanólico de receptáculo, así como las fases móviles de las cuales fueron obtenidas y la cantidad en gramos obtenida.

<i>Fase móvil</i>	<i>Muestras</i>	<i>Fracción</i>	<i>Peso (g)</i>
Tolueno 100%	1-3	1	0.1020
Tolueno – éter etílico (9:1)	4-7	2	0.0863
Tolueno – acetato de etilo (8:2)	8-14	3	0.4011
Tolueno – acetato de etilo (7:3)	15-17	4	0.4785
Tolueno – acetato de etilo (6:4)	18-25	5	0.4546
Acetato de etilo al 100%	26-28	6	0.2246
Acetato de etilo – Metanol (9:1)	29-32	7	0.0349
Acetato de etilo – Metanol (8:2)	33-41	8	0.0129
Acetato de etilo – Metanol (7:3)	42-47	9	0.0173

En las muestras 1-3 (F1) el análisis por cromatografía en placa fina sugiere la presencia de 2 compuestos de naturaleza no polar, en la fracción 2, la cual está formada por cuatro eluatos los cuales fueron eluidos en tolueno: éter etílico (9:1), los compuestos que se tienen aún siguen siendo de naturaleza no polar y posiblemente sean químicamente diferentes a los anteriores. Fracción 3, en ésta se incluye 7 eluatos y los compuestos encontrados aparentemente presentan cierta polaridad con respecto a los anteriores. Fracción 4 los compuestos separados en esta fase, son de polaridad media ya que éstos son eluidos en una fase de tolueno: acetato de etilo (7:3). Es importante señalar, que la cantidad de eluatos que contiene esta fracción es de 3 y la cantidad de muestra registrada en esta fracción es la más grande de las recolectadas por medio de este análisis. En la fracción 5, al aumentar la polaridad se sigue obteniendo una cantidad de muestra considerable, aunque esta es menor a la registrada en la fracción 4 y obviamente la polaridad de los compuestos en esta fase es mayor a los de las fases anteriores. Para la fracción 6 se observa cómo la cantidad de muestra disminuye, de igual forma

sucede en la fracción 7. Dentro de las fracciones 8 y 9 las cantidades son menores a las registradas durante todo el análisis, cabe mencionar que la polaridad de estos compuestos es mayor a la de los encontrados en las fases anteriores

Cuadro 10.- Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna a partir del extracto etanólico de receptáculo, así como los valores Rf registrados a partir de la cromatografía en capa fina en cada una de las fracciones.

Fracción	Rf
1	0.42, 0.48, 0.62, 0.74, 0.79, 0.89, 0.95
2	0.46, 0.62, 0.67, 0.74, 0.79, 0.89, 0.95
3	0.45, 0.5, 0.65, 0.76
4	0.44, 0.5, 0.56, 0.63, 0.74
5	0.23, 0.44, 0.5, 0.56, 0.65, 0.69, 0.75, 0.89
6	0.23, 0.27, 0.49, 0.57, 0.75, 0.89
7	Sin mancha
8	Sin mancha
9	0.22, 0.59

Por otro lado los valores de Rf (cuadro 10) que corresponden al estándar FII (0.89) sólo se encuentran en las fracciones 1, 2, 5 y 6, en tanto que el valor de Rf del estándar FIX (0.76) es más conspicuo en la fracción 3. Por otro lado estos valores de Rf muestran que las fracciones obtenidas en este análisis son muy heterogéneas en su composición y que el eluyente utilizado en la separación es de alta polaridad, para la mayoría de los casos. También es importante señalar que la mayoría de los compuestos separados son medianamente polares. La cantidad de muestra obtenida por medio de este análisis fue de 1.88g que corresponde a un 18%, tomando como referencia los 10g de los cuales se partió, aunque el rendimiento obtenido por esta técnica es bajo, la técnica nos permitió hacer una primera aproximación en la separación de los compuestos de interés, tal como se ilustra en los resultados, que a continuación se analizan con respecto al bioensayo.

6.8.- Bioensayos por fracciones

A las fracciones colectadas por cromatografía en columna se les aplicó el bioensayo de germinación y crecimiento, para seleccionar las fracciones que mostraran actividad alelopática. Los resultados (cuadros 3, 4 y 5, apéndice B) son ilustrados en las figuras 8, 9 y 10 y contemplan los resultados obtenidos a las 48, 120 y 168 horas, después de aplicados los tratamientos correspondientes. Cada barra representa el promedio de inhibición de la germinación, las líneas sobre la barra representan la desviación estándar.

En la figura 8 se observa que para las fracciones 1-6 a las 48 horas la inhibición es del 100%, en tanto que para las fracciones 7 y 8 esta inhibición se ve disminuida. Para la fracción 9 la inhibición en la germinación es del 0%; por tanto, en esta fracción no se detectó la presencia de sustancias con actividad alelopática.

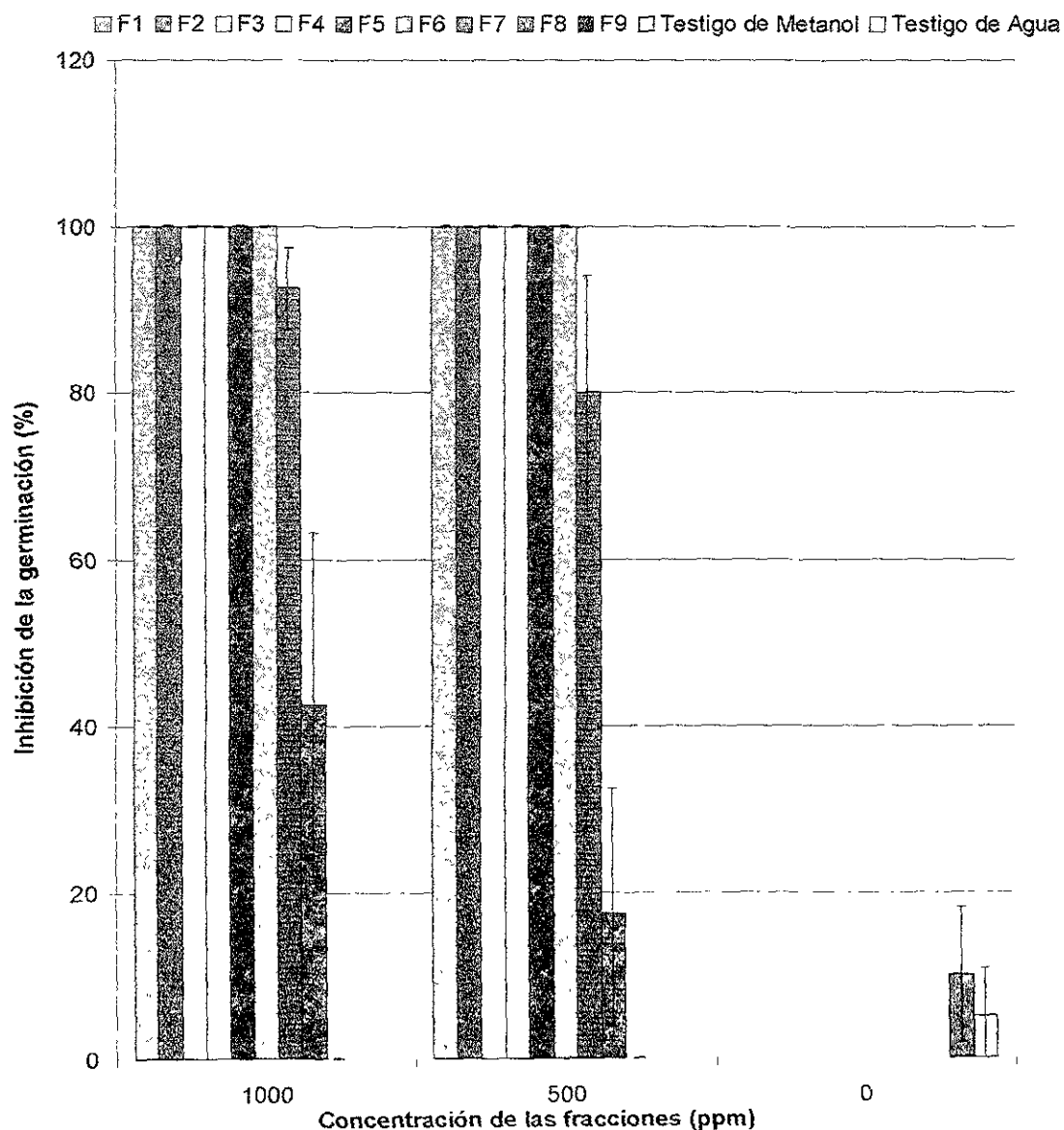


Figura 8.- Inhibición a las 48 horas de la germinación de semillas de amaranto por efecto de dos concentraciones de diferentes fracciones colectadas.

En la figura 9, que representa la inhibición en la germinación a las 120 horas se observa, como en las fracciones 1 y 2, a una concentración de 500 ppm el efecto de inhibición se reduce en un 80 y 85% al transcurrir las 120 horas, sin embargo, en lo que respecta a las fracciones 3 a 6, se sigue observando el 100% de inhibición en la germinación, en tanto que en las fracciones 7 y 8 el efecto de inhibición sigue disminuyendo en ambas concentraciones para las dos fracciones.

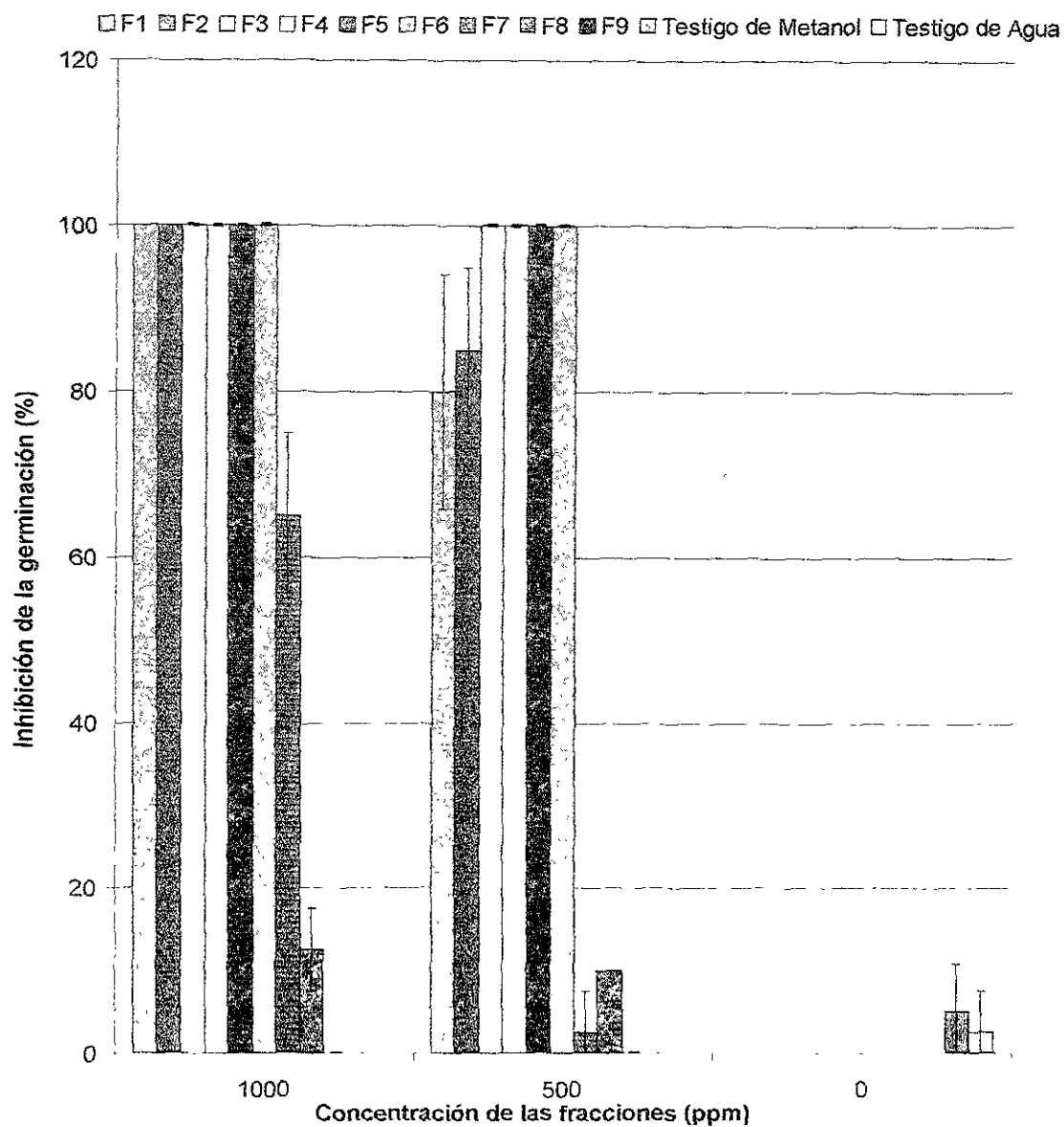


Figura 9.- Inhibición a las 120 horas de la germinación de semillas de amaranto por efecto de dos concentraciones de diferentes fracciones colectadas.

En la figura 10 se ilustran los resultados obtenidos al transcurrir 168 horas después de la aplicación de los tratamientos. Observamos como para las fracciones 1 y 2 a la concentración de 500 ppm el efecto de inhibición disminuye ligeramente (80 y 82.5%) al promedio registrado a las 120 horas (82.5%). Por otro lado en la fracción 6 a la concentración de 500ppm, se presenta una disminución en la inhibición de la germinación, a esta concentración no observada en los tiempos an-

riores; sin embargo pese a este comportamiento en estas fracciones, se nota claramente que los compuestos con naturaleza alelopática están presentes, pero la concentración en la que se encuentran no es suficiente para ejercer el efecto de inhibición en un 100%. En las fracciones 3-5 el comportamiento de inhibición no presenta ningún cambio, manteniéndose así la inhibición en un 100%, por lo cual, podemos decir que en las fracciones de polaridad media es donde se encuentran los compuestos que inhiben la germinación de *A. hypochondriacus*; y es en estas fracciones en las cuales se encuentran los compuestos (aproximadamente 8 según el análisis por placa delgada) con actividad alelopática, así pues, con dichas fracciones se continuó el estudio de este trabajo.

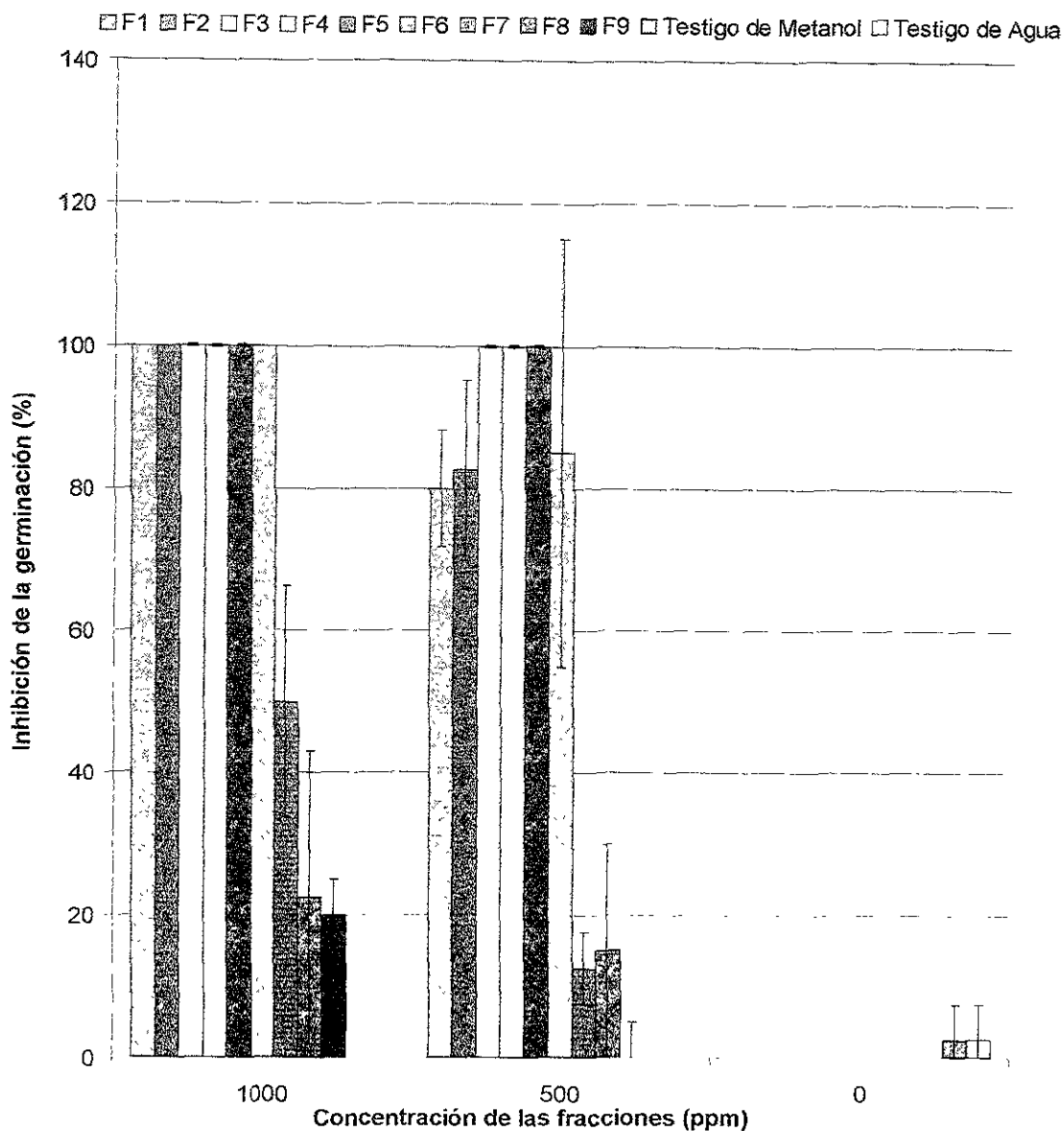


Figura 10.- Inhibición a las 168 horas de la germinación de semillas de amaranto por efecto de dos concentraciones de diferentes fracciones colectadas.

Para el caso de las fracciones 7 y 8 la inhibición que presentaron sólo fue consecuencia de un retardo en la germinación de las semillas y no una inhibición como se observó en las primeras 48 horas.

Por otro lado el análisis de crecimiento (elongación de radícula y vástago) para las fracciones (cuadros 2, 3 y 4, apéndice C), en donde la inhibición de la germinación no fue total se ilustran en los cuadros 11, 12 y 13.

Cuadro 11.- Efecto de las fracciones etanólicas de receptáculo de girasol sobre el crecimiento (mm) de radículas y vástagos de las plántulas de amaranto, 48 horas después de la siembra.

<i>Tratamiento</i>	<i>Elongación (mm)</i>	
	<i>Radícula</i>	<i>Vástago</i>
Test 1 (agua)	27.0a	9.2 a
Test 2 (metanol-agua)	24.5 a, b	10.9 a
F 8 500 ppm	19.5 c, d	4.1 b
F 8' 1000 ppm	8.8 d	3.1 b
F 9 500 ppm	24.4 a, b	5.7 b
F 9' 1000 ppm	18.3 c	5.1 b
Prob F	27.82*	16.23*
DSH 0.05	5.2	3.2

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. * $P > 0.001$.

En el cuadro 11 a las 48 horas después de la siembra existen diferencias significativas en cuanto a la elongación de la radícula y vástago. La fracción 8 a 500 ppm reduce la elongación de la radícula en un 20% con respecto al testigo (2), mientras que a 1000 ppm la reduce en un 64%. En la fracción 9 a 500 ppm no se observa diferencia significativa en la elongación de la radícula con respecto al testigo (2); en cambio a 1000 ppm hay una reducción del 25%. Por otro lado en la elongación del vástago se encontró que la fracción 8 (500 ppm) se redujo la elongación en un 62%, a 1000 ppm, 71%. Para la fracción 9 (500 ppm) en 47% a 1000 ppm, en un 53%, con respecto al testigo 2.

Cuadro 12.-Efecto de las fracciones etanólicas de receptáculo de girasol sobre el crecimiento (mm) de las radículas y vástagos de las plántulas de amaranto. A las 120 horas después de la siembra.

Tratamiento	Elongación (mm)	
	Radícula	Vástago
Test 1 (agua)	56.9 a	59.9 a
Test 2 (MeOH – agua)	33.1 b	30.9 b
F 1 500 ppm	21.1 b, c, d	15.1 d, e
F 2 500 ppm	8.9 d	2.0 f
F 7 500 ppm	21.6 b, c, d	18.8 c, d, e
F 7 1000 ppm	13.5 d	11.2 e, f
F 8 500 ppm	28.6 b, c	27.6 b, c
F 8 1000 ppm	23.9 b, c, d	21.6 b, c, d
F 9 500 ppm	29.8 b	28.2 b, c
F 9 1000 ppm	22.5 b, c, d	27.2 b, c
Prob. F	14.06*	48.92*
DSH 0.05	16.02	10.13

Valores con la misma letra indican que son estadísticamente iguales. * $P > 0.001$.

En el caso de las fracciones 1 y 2 hasta las 120 horas (cuadro 12) se registró elongación para la radícula y vástago (cuadro 3, apéndice C). Para el caso de radícula las fracciones 1 y 2 a 500 ppm, mostraron una reducción del 64 y 73 %, en tanto que para el vástago a esta misma concentración fue del 51 y 94 % respectivamente, con referencia al testigo 2. Por lo que se refiere a las fracciones 8 y 9 para vástago y radícula, se observó una tendencia de crecimiento a las 48 horas. Para el vástago en las fracciones 1,2 y 7 a 500 ppm los valores registrados fueron de 51, 94 y 39% observando una diferencia significativa con respecto al testigo 2. Por otro lado, para la fracción 7 a 1000 ppm, también se registró diferencia significativa con respecto al testigo 2 para radícula y vástago. Para la fracción 7 a 500 ppm se encontró diferencia significativa con respecto al testigo 2, únicamente para el vástago.

Cuadro 13.- Efecto de las fracciones etanólicas de receptáculo de girasol sobre el crecimiento (mm) de las radículas y vástagos de las plántulas de amaranto. A las 168 horas después de la siembra.

Tratamiento	Elongación (mm)	
	Radícula	Vástago
Testigo 1	76.4 a	65.4 a
Testigo 2	68.6 a, b	61.6 a, b
F 1 500	40.0 c, d	51.0 a, b, c, d
F 2 500	27.1 d	32.5 d, e
F 6 500	24.8 d	23.8 e
F 7 500	48.2 b, c, d	48.6 a, b, c, d
F 7 1000	34.0 c, d	35.2 c, d, e
F 8 500	58.4 a, b, c	45.4 b, c, d
F 8 1000	43.6 c, d	53.6 a, b, c
F 9 500	57.2 a, b, c	62.4 a, b
F 9 1000	43.2 c, d	49.4 a, b, c, d
Prueba F	9.58*	10.22*
DSH 0.05	24.8	19.24

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. * $P > 0.001$.

A las 168 horas (cuadro 13) se encontraron diferencias significativas de prácticamente todas las fracciones ya sea en radícula o en vástago o bien en ambos parámetros (cuadro 4, apéndice C), a excepción de la fracción 9 a 500 ppm. Por otro lado, se registra crecimiento en la fracción 6 a 500ppm a las 168 horas.

6.9.- Análisis cromatográfico en columna de la mezcla

El análisis cromatográfico de la mezcla obtenida a partir de las fracciones 3-5, proporciono 46 eluatos que caracterizados por la cromatografía en capa delgada, se redujeron a 7 fracciones, distribuidas de la siguiente forma (cuadro 14):

Cuadro 14.- Fracciones colectadas en el análisis, así como las fases móviles de las cuales se obtuvieron y la cantidad (g) obtenida de cada una de ellas.

<i>Fase Móvil</i>	<i>Muestras</i>	<i>Fracción</i>	<i>Peso (g)</i>
Tolueno – Acetato de etilo (1:1)	1 – 8	1	0.0687
Tolueno – Acetato de etilo (1:1)	9 – 16	2	0.0205
Tolueno – Acetato de etilo (4:6)	17 – 22	3	0.0285
Tolueno – Acetato de etilo (4:6)	23 – 25	4	0.0266
Tolueno – Acetato de etilo (3:7)	26 – 31	5	0.0272
Tolueno – Acetato de etilo (3:7)	32 – 39	6	0.0368
Tolueno – Acetato de etilo (2:8)	40 – 46	7	0.0116

De estas fracciones el análisis por cromatografía en capa delgada mostró un solo compuesto en la fracción 2, en tanto que las fracciones restantes presentaron mezclas de compuestos. Los compuestos obtenidos en este análisis son aparentemente 6, los cuales están distribuidos en las 7 fracciones, y se percibe claramente que son diferentes debido a que se obtienen en polaridades distintas. El rendimiento obtenido en este segundo análisis cromatográfico fue de 16% y permitió purificar por lo menos un compuesto de los que se encontraban en la mezcla original.

De estos compuestos se eligió la fracción 2, para realizar un bioensayo de inhibición de la germinación y se encontró que efectivamente esta fracción inhibe la germinación del amaranto en un 100%.

Con base en los resultados anteriores se continuo con el análisis de la fracción 2 empleando la combinación de cromatografía de líquidos – espectrometría de masas. El cromatograma mostró la presencia de un compuesto mayoritario con tiempo de retención 13 / 14 minutos (figura 11).

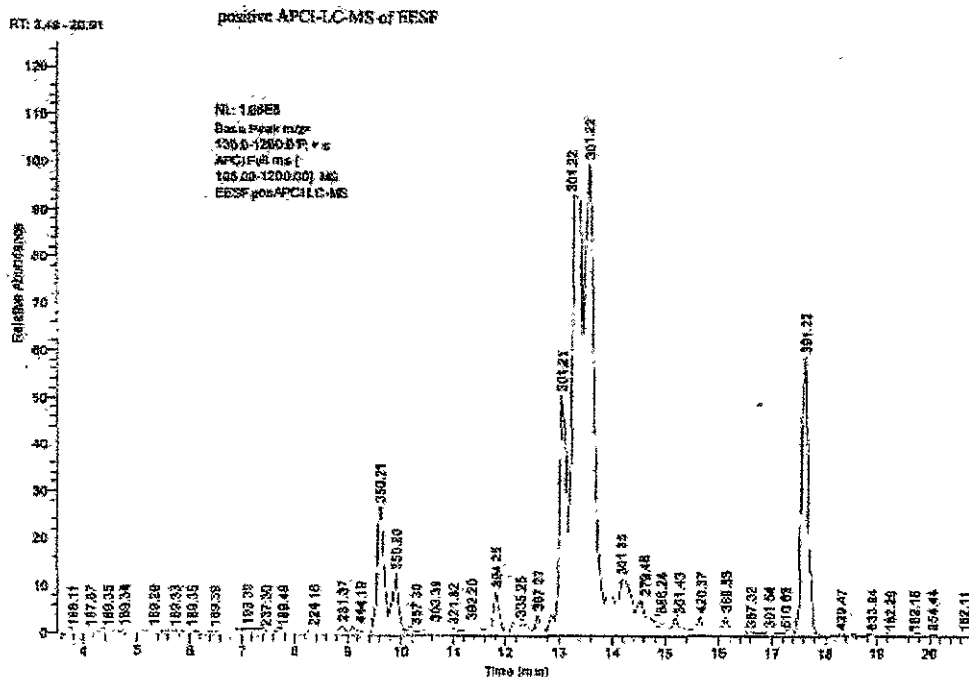
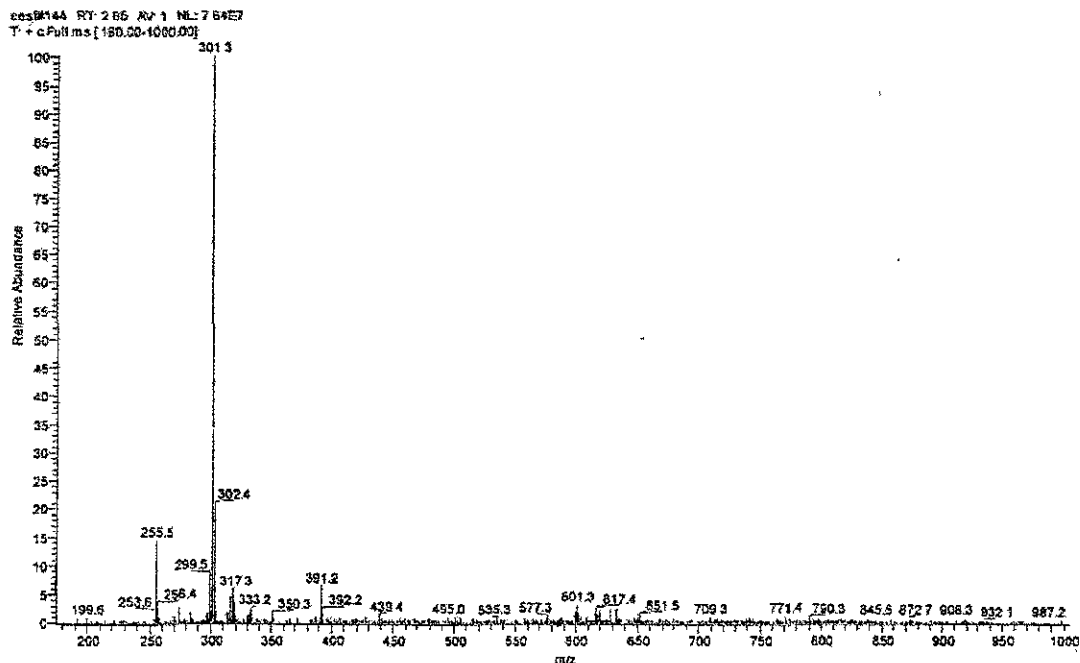


Figura 11.-Cromatograma del compuesto obtenido de la fracción 2 (kaurano / traquilobano) .

El espectro de masas del compuesto (figura 12), indicó un ion molecular de 300. El patrón de fragmentación mostró los siguientes fragmentos importantes: m/e 283 con correspondencia a M -17; m/e 255 que corresponde a M-44. Estos fragmentos están indicando presencia de grupos OH y COOH en el esqueleto del kaurano / traquilobano. La comparación con la biblioteca de espectros y compuestos conocidos sugieren que la estructura de este compuesto esta relacionada con la del ácido 6 - hidroxí -16 - kaurenoico y/o la del ácido 9-hidroxí-traquilobanoico, por la semejanza en el patrón de fragmentación.

EESF

pos APCI MS



MS-MS 301

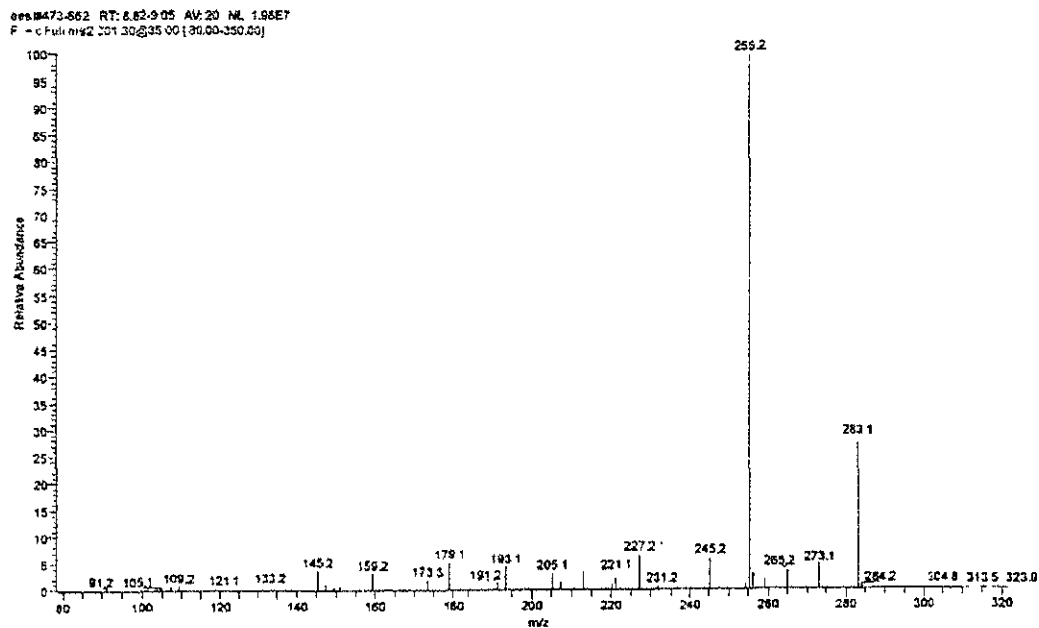


Figura 12.-Espectro de masas del compuesto encontrado en la fracción 2 (kaurano / traquilobano).

Para asegurar cual de los dos compuestos es el que corresponde al presente en dicha fracción, se está preparando en mayor escala un extracto para aislar la misma fracción y con una mayor cantidad poder hacer otros análisis como ^1H RMN, ^{13}C RMN y reacciones de derivación y de esta forma confirmar la estructura del compuesto (kaurano / traquilobano).

VII Conclusiones

Se demostró la presencia de aleloquímicos en el tallo y receptáculo de girasol cv. Victoria en etapas fenológicamente maduras. El análisis fitoquímico preliminar marcó la presencia de terpenoides en mayor concentración, así como trazas de compuestos fenólicos. Se encontró la presencia de compuestos que inhiben la germinación y retrasan el crecimiento de radícula y vástago de amaranto en los extractos etanólicos de receptáculo de girasol. El análisis por cromatografía de líquidos (HPLC), mostró la presencia de un compuesto mayoritario con un tiempo de retención de 13/14 minutos. El análisis espectral sugiere una estructura que esta relacionada con la del ácido 6-hidroxi-16-kaurenoico y/o la del ácido 9-hidroxi-traquilobanoico por la semejanza en el patron de fragmentación. Las pruebas estadísticas señalan que tanto la inhibición de la germinación como el retraso en el crecimiento de la radícula y el vástago son significativas con respecto a los testigos ($P > 0.001$). La influencia inhibitoria del compuesto es directa y no tiene que ver con los efectos de pH y conductividad eléctrica. Por lo tanto, en el receptáculo de girasol se encuentran compuestos con actividad alelopática, estos compuestos son responsables del control natural de maleza y son de tipo diterpenoide.

VIII Referencias

- Aguilar, G. L. 1998. Producción de aleloquímicos (Diterpenoides) en girasol (*Helianthus annuus* L.) en función de NPK. Tesis de licenciatura. Departamento de parasitología agrícola. UACH. México.
- Ángeles, C. M.E. 1999. Crecimiento de *Amaranto hypochondriacus* L. En función de la calidad del agua de lluvia en la región oeste del valle de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Bitton, D.W. y R.B.J. Dutka., 1986. Toxicity testing using microorganism. Vol. I. CRC. Press. U.S.A.
- Cano y Cano, G.; y Marroquin de la Fuente, J. S. 1994. Taxonomía de Plantas Superiores. Ed. Trillas.
- Castellano D, Cross P., Bernal e Irún. Aportación de nuevas técnicas a la búsqueda de herbicidas de origen natural. www.2.uca.es/dept/quimica-organica/Rota/antec.html. Universidad de Cádiz, España. (Consulta 29 febrero del 2000)
- Dirección General de Protección y Ordenación Ecológica. 1979. Manual del curso de análisis de aguas de desecho. Subdirección de Área de investigación y entrenamiento. Vol. I y II. México, D.F. p. 981
- Duke, S.O. 1988. Herbicide, Chemistry degradation and mode of action. Kearney, P.C. Kaufman, D.D., Eds, Marcel Dekker. New York. pp. 1-69.
- Fessenden, R. J. y Fessenden J.S. 1994. Química Orgánica. Traducción al español de Eliseo Seoane Bardanca, Manuel Arne, José Ramón Pedro, Universidad de Valencia, España, Rafael Castillo B., U.N.A.M., México. 2da ed, Grupo editorial Iberoamérica. Distrito Federal, México. pp 905-912.
- Gonçalves, U. M.R. O Girassol. www.c/c-in.com.br/sdc/girassol.htm. Sitio Duas Cachoeiras. (Consulta 29 febrero del 2000).
- Harborne, J. B. 1991. Phytochemical Methods. Chapman and Hall. London. pp 33, 35, 89.
- Hourmant, A. and Pradet A. 1981 Plant physiol. 68, 631.

Kidd, F. 1941 Proc. R. Soc. B. 87,410.

Krebs, C. J. 1986. Estudio de la distribución y la abundancia: Alelopatías, Control biológico. Traducción al español de J. Blanco. 2da edición. Editorial Harla. México, p 396.

Macías, F.A.;Varela R.M., Torres A. And Molinillo J.M.G. January 1993a. Novel Sesquiterpene from Bioactive Fractions of Cultivar Sunflowers. Tetrahedron Letters. Vol. 34(12): pp1999-2002.

Macías, F.A.; Varela R.M., Torres A. And Molinillo J.M.G. March 1993b. Potential Allelopathic Guianolides from Cultivar Sunflowers Leaves, Var SH-222. Phytochemistry, 34 (3): pp 669-674.

Mahato, S.B.;A.K. Nandy and G. Roy. 1992. Triterpenoids Phytochemistry. 31 (7): pp. 2199-2249.

Matsunaka,, S. and S. Kawatsuka. 1975. Environ. Quality Safety. 4:1388-1390.

Mayer, A. M. and Mayber-Poljakoff A. 1989. The germination of seeds.Factors affecting germination.4rd Edition. Pergamon Press. Great Britain.

Mejía,-B. C.-M. 1998. Producción del Girasol (*Helianthus annuus* L.) en función del tamaño de la fuente de fotosintatos. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; México.

Molich, H.1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathic. Fischer, Jena.

Morinaga, T. 1926a Am. J. Bot. 13, 126.

Morinaga, T. 1926b Am. J. Bot. 13, 159.

Pacheco, L. D. 1996.Bioquímica estructural y aplicada a la medicina. Grupo Misceláneo. 1era edición. Editorial Instituto Politécnico Nacional. México D. F.,p 358.

Pyrek, J.ST. 1970. New Pentacyclic Diterpene Acid trachiloban-19-oic acid from sunflower. Tetrahedron Vol. 26: pp 5029-5032.

Ratsch,H.C.1983. Interlaboratory root elongation testing of toxic substances on selected plant species. EPA-600/53-83-05; U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis,U.R.

- Raymond, P., Al-Ani A. and Pradet A. 1983 *Physiol. Veg.* 21, 677.
- Rice, E. L. 1974. Inhibition of Nitrogen-Fixing and nitrifying bacteria by seed plants. *Ecology* 45: pp 824-837.
- Rice, E. L. 1984. *Allelopathy*. Second Edition. Academic Press, Inc. p 422
- Rodríguez, E.; G.H.M. Tower and Mitchell. 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15 pp. 1573-1580.
- Rodríguez, M.T., M. Soto and S.A. Escalante. 1994. Germination inhibitors in sunflower (*Helianthus annuus* L) I. *International Sunflower Yearbook* p. 71.
- Rodríguez, M.T., M. Soto y J.A. Escalante, 1995. Germination Inhibitors in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) II. *International Sunflower Yearbook*. p. 85.
- Rodríguez, M.T., J.A. Escalante y L. Aguilar. 1998 Control de maleza con productos de Girasol (*Helianthus annuus* L.). *Memorias del siglo XIX Congreso Nacional de Ciencia de la Maleza, Mexicali, B.C. Méx.* pp. 24-26.
- Rodríguez, M.T. 1999. Los aleloquímicos en el control de la maleza. *Memorias del siglo XX Congreso Nacional y Simposium Internacional de la Ciencia de la Maleza. Culiacán Sinaloa, Méx.* pp. 185-187.
- Rogers, C.E., Severson R.F. and Chortyk O.T. 1995. Diterpenoid acid profile in the pericarp of immature sunflower achenes. *Helia* 18(23) : pp1-8.
- Soto, H. M. Y M.T. Rodríguez. 2000. *Manual de Prácticas de fitoquímica. Colegio de Postgraduados, Méx.* pp. 110.

IX Apéndice

Apéndice A: Preparación de reactivos

Reactivo de anisaldehído

Preparar una mezcla de ácido acético glacial, ácido sulfúrico y anisaldehído en proporción 10:0.2:0.1, de acuerdo a la cantidad requerida.

Reactivo de Dragendorff

Solución a) Pesar 0.25 g de nitrato de bismuto y disolver en una mezcla de ácido acético - agua (10:40).

Solución b) Pesar 8 g de yoduro de potasio y disolver en 20 mL. de agua.

Mezclar las soluciones a y b de acuerdo a la cantidad requerida.

Reactivo de Liberman – Burchard

Mezclar cuidadosamente 5 mL de anhídrido acético con 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y frío; adicionar esta mezcla cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto en frío. Utilizar el reactivo después de preparar.

Apéndice B: Cuadros de inhibición de la germinación

Cuadro 1.-Inhibición de la germinación para las semillas de amaranto de los extractos etanólicos crudos de tallo y receptáculo. A las 24 horas después de la siembra.

<i>Tratamiento(ppm)</i>	<i>Repetición 1</i>	<i>Repetición 2</i>	<i>Repetición 3</i>	<i>Repetición 4</i>
Tallo 1000ppm 1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	90	100
Tallo 500 ppm 1	70	70	80	70
2	100	100	100	90
3	90	90	80	100
Tallo 250 ppm 1	100	100	100	100
2	70	40	70	30
3	30	50	50	30
Receptáculo 1000ppm 1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
Receptáculo 500 ppm 1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
Receptáculo 250 ppm 1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
Testigo metano-agua1	10	30	20	0
2	0	20	0	0
3	0	10	0	10
Testigo agua destilada 1	0	10	10	0
2	30	40	20	30
3	70	10	10	10

Cuadro 2.- Inhibición de la germinación para las semillas de amaranto de los extractos etanólicos crudos de tallo y receptáculo. A las 48 horas después de la siembra.

<i>Tratamiento</i>	<i>Repetición</i> 1	<i>Repetición</i> 2	<i>Repetición</i> 3	<i>Repetición</i> 4
Tallo 1000ppm 1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	90	100	90	90
Tallo 500 ppm 1	80	50	70	30
2	60	80	90	100
3	50	60	50	70
Tallo 250 ppm 1	100	100	100	100
2	10	10	10	0
3	30	0	10	0
Receptáculo 1000ppm 1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
Receptáculo 500 ppm 1	100	100	90	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
Receptáculo 250 ppm 1	100	80	100	80
2	90	40	80	100
3	100	90	70	90
Testigo metano-agua1	10	0	0	10
2	10	0	10	10
3	0	0	10	0
Testigo agua destilada 1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3		0	0	0

Cuadro 3.- Inhibición de la germinación para las semillas de amaranto después de la aplicación de las fracciones de receptáculo de girasol. A las 48 horas después de la siembra.

Tratamiento(ppm)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4
Fracción 1 500	100	100	100	100
Fracción 1 1000	100	100	100	100
Fracción 2 500	100	100	100	100
Fracción 2 1000	100	100	100	100
Fracción 3 500	100	100	100	100
Fracción 3 1000	100	100	100	100
Fracción 4 500	100	100	100	100
Fracción 4 1000	100	100	100	100
Fracción 5 500	100	100	100	100
Fracción 5 1000	100	100	100	100
Fracción 6 500	100	100	100	100
Fracción 6 1000	100	100	100	100
Fracción 7 500	80	100	70	70
Fracción 7 1000	90	100	90	90
Fracción 8 500	10	10	10	40
Fracción 8 1000	70	40	20	40
Fracción 9 500	0	0	0	0
Fracción 9 1000	0	0	0	0
Testigo agua	0	10	10	0
Testigo MeOH - agua	0	20	10	10

Cuadro 4.- Inhibición de la germinación para las semillas de amaranto después de la aplicación de las fracciones de receptáculo. A las 120 horas después de la siembra.

<i>Tratamiento</i> (ppm)	<i>Repetición 1</i>	<i>Repetición 2</i>	<i>Repetición 3</i>	<i>Repetición 4</i>
Fracción 1 500	90	90	60	80
Fracción 1 1000	100	100	100	100
Fracción 2 500	80	80	80	100
Fracción 2 1000	100	100	100	100
Fracción 3 500	100	100	100	100
Fracción 3 1000	100	100	100	100
Fracción 4 500	100	100	100	100
Fracción 4 1000	100	100	100	100
Fracción 5 500	100	100	100	100
Fracción 5 1000	100	100	100	100
Fracción 6 500	100	100	100	100
Fracción 6 1000	100	100	100	100
Fracción 7 500	0	0	0	10
Fracción 7 1000	70	50	70	70
Fracción 8 500	10	10	10	10
Fracción 8 1000	10	20	10	10
Fracción 9 500	0	0	0	0
Fracción 9 1000	0	0	0	0
Testigo agua	0	0	10	0
Testigo MeOH – agua	0	10	0	10

ESTABLECIMIENTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y ZOOTECNICAS

Cuadro 5.- Inhibición de la germinación para las semillas de amaranto después de la aplicación de las fracciones de receptáculo. A las 168 horas después de la siembra.

Tratamiento (ppm)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4
Fracción 1 500	70	80	90	80
Fracción 1 1000	100	100	100	100
Fracción 2 500	70	80	80	100
Fracción 2 1000	100	100	100	100
Fracción 3 500	100	100	100	100
Fracción 3 1000	100	100	100	100
Fracción 4 500	100	100	100	100
Fracción 4 1000	100	100	100	100
Fracción 5 500	100	100	100	100
Fracción 5 1000	100	100	100	100
Fracción 6 500	100	40	100	100
Fracción 6 1000	100	100	100	100
Fracción 7 500	20	10	10	10
Fracción 7 1000	70	30	50	50
Fracción 8 500	30	30	0	0
Fracción 8 1000	10	30	40	10
Fracción 9 500	0	0	0	0
Fracción 9 1000	30	30	20	0
Testigo agua	0	0	10	0
Testigo MeOH - agua	0	10	0	0

Apéndice C.- Cuadros de la elongación de radícula y vástago

Cuadro 1.- Elongación(mm) de la radícula y vástago de las plántulas de amaranto con los tratamientos de tallo y receptáculo. A las 48 horas después de la siembra.

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Testigo agua 1	40/15	40/15	45/15	34/18	45/13	36/14	40/14	37/14	30/13	37/15
2	27/13	43/15	36/17	44/16	34/15	32/13	34/14	38/15	35/12	38/12
3	41/18	35/15	36/14	34/15	34/18	41/15	43/17	43/13	42/16	38/13
Testigo MeOH 1	40/14	35/17	41/18	42/17	42/15	47/15	37/17	43/15	42/16	44/13
2	35/19	48/13	30/15	35/16	46/15	41/15	41/16	35/18	30/17	47/13
3	42/17	45/15	35/10	46/14	38/11	35/9	47/13	46/10	45/14	41/15
Tallo 500ppm 1	24/6	21/9	23/6	22/6	19/4	26/10	15/5	25/8	23/8	18/7
2	20/5	20/6	16/4	15/31	8/2	16/4	17/6	17/6	17/6	17/6
3	19/9	16/2	25/8	15/4	27/8	20/8	25/7	23/10	22/10	19/8
Tallo 250ppm 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	30/9	25/9	29/11	29/8	25/11	29/17	24/12	32/8	30/6	31/8
3	33/10	27/8	23/11	28/6	24/8	28/6	15/10	31/11	25/8	13/33
Receptáculo 250ppm 1	15/5	16/4	5/1	10/3	7/2	7/2	7/2	7/2	7/2	7/2
2	15/3	8/3	16/4	23/10	23/10	13/3	23/8	24/10	12/4	6/0

R = semilla

Cuadro 2.-Elongación(mm) de la radícula y vástago de las plántulas de amaranto con los tratamientos de las fracciones de receptáculo de girasol. A las 48 horas después de la siembra.

Tratamiento (ppm)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Fracción 8 500	15/3	17/3	25/3	25/3	18/5	15/5	20/6	22/4	22/4	16/5
Fracción 8 1000	8/3	7/3	9/4	6/2	9/3	10/4	13/3	9/4	8/2	9/3
Fracción 9 500	26/5	22/6	23/6	26/6	28/8	27/7	27/5	26/6	21/5	18/3
Fracción 9 1000	12/4	19/4	16/5	19/9	15/5	20/5	17/2	22/5	21/4	22/6
Testigo agua	26/12	34/11	32/10	26/10	23/10	26/9	26/6	31/8	19/9	27/7
Testigo. MeOH-Agua	21/9	30/21	17/11	31/9	32/10	19/10	27/7	20/19	27/7	21/6

R = semilla

Cuadro 3.- Elongación(mm) de la radícula y vástago de las plántulas de amaranto con los tratamientos de las fracciones de receptáculo de girasol. A las 120 horas después de la siembra.

Tratamiento (ppm)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Fracción 1 500	24/20	22/19	40/5	20/25	32/28	12/20	9/2	10/2	21/15	21/15
Fracción 2 500	9/2	9/2	8/2	9/2	9/2	9/2	9/2	9/2	9/2	9/2
Fracción 7 500	19/18	15/15	19/16	16/20	32/20	20/16	25/27	28/21	17/15	25/20
Fracción 7 1000	9/11	13/16	7/6	10/8	11/4	9/7	10/3	20/15	27/22	19/20
Fracción 8 500	24/23	22/23	39/25	27/28	38/22	22/35	38/25	27/31	27/34	22/30
Fracción 8 1000	21/27	22/20	27/20	21/22	32/26	21/21	25/22	20/21	22/20	28/17
Fracción 9 500	20/27	37/35	45/27	15/17	33/26	33/26	20/34	35/37	30/25	32/26
Fracción 9 1000	15/20	25/29	20/31	22/28	16/26	16/26	25/16	20/32	33/32	26/28
Testigo agua	27/31	52/68	40/62	52/48	54/68	54/68	38/50	110/68	100/54	54/78
Testigo MeOH- Agua	22/36	55/31	55/33	20/22	27/20	27/20	47/27	27/43	27/32	20/40

R = semilla

Cuadro 4.- Elongación (mm) de la radícula y vástago de las plántulas de amaranto con los tratamientos de las fracciones de receptáculo de girasol. A las 168 horas después de la siembra.

Tratamiento (ppm)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Fracción 1 500	34/72	60/56	30/50	46/60	40/62	28/38	42/34	40/36	40/51	40/51
Fracción 2 500	36/34	32/34	24/24	28/38	28/38	18/26	24/30	27/32	27/32	27/32
Fracción 6 500	26/34	38/20	34/32	14/20	22/14	14/22	25/24	25/24	25/24	25/24
Fracción 7 500	44/52	56/44	56/46	74/50	50/68	48/44	34/44	32/48	44/42	46/48
Fracción 7 1000	30/34	28/46	32/48	44/36	38/22	40/52	34/20	26/28	24/18	40/48
Fracción 8 500	42/54	54/44	52/20	70/40	38/34	88/52	60/40	74/34	48/54	58/82
Fracción 8 1000	62/56	30/62	42/52	32/64	34/72	46/64	62/60	40/42	20/52	66/20
Fracción 9 500	70/56	70/76	50/70	60/48	60/48	64/34	48/50	72/100	40/68	38/74
Fracción 9 1000	58/50	44/56	52/30	46/44	40/50	34/58	38/30	42/56	36/72	42/48
Testigo Agua	64/76	68/60	68/60	120/54	44/52	82/70	32/74	64/66	68/74	100/50
Testigo MeOH-Agua	68/50	44/82	120/68	100/56	52/50	56/74	148/78	48/86	28/54	100/54

R = semilla