

37

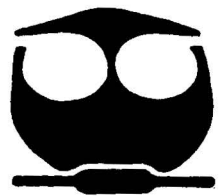


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HERBICIDA DE DOS ESPECIES DE LA FAMILIA ASTERACEAE; Baccharis salicifolia y Baccharis conferta.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIANA DOMINGUEZ LOPEZ



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2002.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

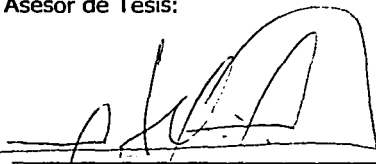
**JURADO ASIGNADO:**

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	M. en C. Blas Flores Perez
Secretario	Dr. Carlos Leonardo A. Céspedes Acuña
1er. Suplente	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
2o. Suplente	M. en C. Juan Valdez Garay

~~20-02-02~~  
~~Maria Domínguez López~~  
Dirección General de Bibliotecas  
a difundir en formato electrónico e impreso el  
trabajo de mi trabajo recepcional  
MARE: Mariana Domínguez López

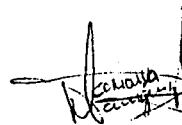
Esta tesis se desarrolló en el laboratorio No. 7 de la U. I. P. M. del Instituto de Química, bajo la dirección del Dr. Carlos Leonardo A. Céspedes Acuña.

Asesor de Tesis:



Dr. Carlos Leonardo A. Céspedes Acuña

Sustentante:



Mariana Domínguez López

## **DEDICATORIAS**

A mi papá Juan Saúl Domínguez Martínez aún cuando no estas presente siempre has sido y serás una de mis grandes fuerzas para conseguir lo que anhelo en la vida.

A mi mamá Concepción López Santos por el amor, apoyo y confianza que siempre me ha brindado (mi mamá es lo máximo).

Muy en especial a mis abuelitos Mercedes Martínez de Domínguez y Raúl Domínguez Maldonado por quererme como a una hija, el apoyo de ustedes es invaluable y se los agradeceré toda la vida espero que la vida me de la oportunidad de demostrarles lo mucho que los quiero.

A mis hermanos Rodrigo, Raúl y Saúl, cada uno de ustedes le da sentido a mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por contribuir a mi formación académica e integral.

Al Dr. Carlos Céspedes Acuña por su apoyo, asesoría, confianza y por la amistad que me ha brindado, gracias por impulsarme a seguir en este camino.

Al Dr. José Calderón Pardo por brindarme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis en su laboratorio.

A todas las personas que de alguna manera han estado presentes en mi vida y me han brindado su amistad.

Al programa DEGAPA IN215799 por el apoyo brindado para realizar este trabajo de tesis

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1 Metabolitos Secundarios.....	5
1.2 Alelopatía.....	6
1.3 Malezas.....	12
1.4 Semillas.....	13
1.4.1 Semillas monocotiledoneas.....	13
1.4.2 Semillas dicotiledoneas.....	13
1.5 Germinación.....	14
1.6 Herbicidas.....	15
1.6.1 Sitios de acción de herbicidas .....	15
1.6.2 Herbicidas de origen natural.....	16
<b>II. ANTECEDENTES</b>	
2.1 Las asteráceas.....	18
2.2 Antecedentes de la especie <i>Baccharis salicifolia</i>	
2.2.1 Antecedentes Botánicos.....	19
2.2.2 Antecedentes Químicos.....	21
2.3 Antecedentes de la especie <i>Baccharis conferta</i>	
2.3.1 Antecedentes Botánicos .....	22
2.3.2 Antecedentes Químicos.....	23
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>IV. OBJETIVOS</b>	
4.1 Objetivo General.....	25
4.2 Objetivos Específicos.....	25
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	26
5.1 Material Vegetal.....	26
5.2 Procedimientos Generales	
5.2.1 Preparación de los extractos orgánicos de <i>B. salicifolia</i> y <i>B. conferta</i> .....	27
5.2.2 Ensayo Biológico Primario.....	27
5.2.3 Ensayo Biológico Secundario.....	29
5.2.4 Ensayo biodirigido (placas bioautográficas) .....	29
5.3 Parte Química	
5.3.1 Análisis Cromatográfico.....	31

---

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1	Extractos orgánicos de <i>B. salicifolia</i> y <i>B. conferta</i> .....	33
6.2	Pruebas biológicas de inhibición de germinación de semillas y desarrollo de plántulas.....	33
6.3	Ensayo Biológico Primario de los extractos de <i>B. salicifolia</i> y <i>B. conferta</i> .....	34
6.4	Ensayos biológicos a 1000 ppm.....	45
6.4.1	Efecto de las fracciones de <i>B. salicifolia</i> a 1000 ppm sobre <i>L. sativa</i> .....	45
6.4.2	Efecto de las fracciones de <i>B. salicifolia</i> a 1000 ppm sobre <i>L. multiflorum</i> .....	46
6.4.3	Efecto de las fracciones de <i>B. conferta</i> a 1000 ppm sobre <i>L. sativa</i> .....	47
6.4.4	Efecto de las fracciones de <i>B. conferta</i> a 1000 ppm sobre <i>L. multiflorum</i> .....	47
6.5	Ensayo Biológico Secundario de las fracciones de <i>B. salicifolia</i> y de <i>B. conferta</i> .....	62
6.5.1	Efecto de las fracciones de <i>B. salicifolia</i> sobre <i>L. sativa</i> .....	62
6.5.2	Efecto de las fracciones de <i>B. salicifolia</i> sobre <i>L. multiflorum</i> .....	63
6.5.3	Efecto de las fracciones de <i>B. conferta</i> sobre <i>L. sativa</i> .....	64
6.5.4	Efecto de las fracciones de <i>B. conferta</i> sobre <i>L. multiflorum</i> .....	65
6.6	Placas bioautográficas.....	80
6.6.1	Efecto de las fracciones de <i>B. salicifolia</i> en placas bioautográficas.....	81
6.6.2	Efecto de las fracciones de <i>B. conferta</i> en placas bioautográficas.....	82
VII.	CONCLUSIONES.....	88
VIII.	PERSPECTIVAS.....	89
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	90

## ABREVIATURAS

*B. salicifolia*

*B. conferta*

*L. multiflorum*

*L. sativa*

*T. pratense*

*P. ixocarpa*

*A. hypochondriacus*

*E. crusgalli*

ppm

μL

mL

mg

g

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

MeOH

AcOEt

n-Hex

*Baccharis salicifolia*

*Baccharis conferta*

*Lolium multiflorum*

*Lactuca sativa*

*Trifolium pratense*

*Physalis ixocarpa*

*Amarantus hypochondriacus*

*Echinochloa crusgalli*

Partes por millón

microlitros

mililitros

miligramos

gramos

diclorometano

Metanol

Acetato de etilo

n-hexano



---

## Comparación de la actividad herbicida de dos especies de la familia Asteraceae; *Baccharis salicifolia* y *Baccharis conferta*

### RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se realizó el estudio comparativo de la actividad herbicida de los extractos en MeOH y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de dos especies de la familia Asteraceae: *Baccharis salicifolia* y *Baccharis conferta*. Los extractos fueron estudiados midiendo el grado de inhibición que presentaron sobre la germinación de semillas monocotiledóneas (*Lolium multiflorum*) y dicotiledóneas (*Lactuca sativa*) así como la elongación de raíz y tallo de las plántulas a concentraciones de 50, 100, 500 y 1000 ppm para detectar el extracto más activo de cada una de las especies; posteriormente se realizó el fraccionamiento de los extractos y las fracciones reunidas se probaron en las mismas semillas a una concentración de 1000 ppm midiendo los mismos parámetros, con las fracciones más activas se llevó a cabo la misma prueba en este caso a 50, 250, 500, 750 y 1000 ppm midiendo los mismos efectos sobre las semillas y las plántulas, de estas fracciones se realizaron ensayos bioautográficos y las cromatográficas necesarias para separar y obtener las subfracciones que presentaron mayor actividad.

Los resultados mostraron que el extracto de *B. salicifolia* con mayor actividad fue el obtenido en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, del cual se obtuvo un porcentaje menor de germinación de las semillas y la elongación tanto de la raíz como del tallo de las plántulas de las especies *L. sativa* y *L. multiflorum* de con respecto al control. De este extracto se obtuvieron dos fracciones con actividad inhibitoria significativa.

Con respecto a los extractos de *B. conferta* el extracto que presentó mayor actividad fue el extraído en metanol del cual se obtuvieron tres fracciones con actividad significativa, sin la identificación de los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad.

## **I.- Introducción**

La diversidad biológica de una región puede ser apreciada por el número de especies endémicas distribuidas en dicha área; por esta razón México ocupa el tercer lugar mundial en biodiversidad después de Brasil y Colombia debido a la gran abundancia de las especies biológicas presentes en nuestro país (Bye et al., 1995).

Entre estas especies biológicas se encuentra su rica flora derivada de la gran variabilidad de zonas geográficas, es decir, desde selvas hasta desiertos, donde se han integrado elementos de la flora meridional y boreal, las cuales se han establecido y diversificado en múltiples ambientes y tipos de vegetación. Como resultado de lo anterior, México posee una flora que es considerada entre una de las más diversas del mundo. Las fanerógamas mexicanas están representadas por 220 familias y aproximadamente 2410 géneros con 22 mil especies (Rzedowski 1972). De esto que en los últimos años se ha dado un avance notable en el estudio de muchas especies, en especial de plantas que son empleadas en las prácticas medicas populares, de las cuales tan sólo un reducido número de compuestos (metabolitos secundarios) aislados e identificados han sido evaluados para determinar sus propiedades biológicas (Bye et al., 1995; Mata et al., 1996).

Debido a lo anterior surge el interés por el potencial que ofrecen las plantas como fuente de nuevos principios activos, los que aún no se han explotado adecuadamente, incluyendo aquellos con propiedades herbicidas.

Las técnicas agrícolas modernas exigen la utilización de defensas agrícolas que favorezcan la productividad. Los plaguicidas son productos agroquímicos diseñados para combatir diversos tipos de malezas pestes o plagas que atacan y/o compiten fuertemente con los cultivos agrícolas. La incorporación de compuestos alelopáticos dentro de la agricultura puede reducir el uso de herbicidas, fungicidas e insecticidas sintéticos, ya que los aleloquímicos causan menos contaminación por ser biodegradables (Putman y Duke, 1978).

De acuerdo al tema de tesis a realizar a continuación se da una breve introducción de los conceptos básicos que están involucrados.

### 1.1 Metabolitos Secundarios

En la naturaleza, las plantas están expuestas a factores bióticos y abióticos con los cuales han co-evolucionado. La presión de selección ejercida por estos factores a lo largo del proceso evolutivo provocó el desarrollo de numerosas rutas de biosíntesis a través de las cuales sintetizan y acumulan una gran variedad de metabolitos secundarios. Estos juegan un papel importante en las complejas interacciones entre organismos vivos y el entorno natural. Entre ellos existen sustancias que producen las plantas y que les proporcionan beneficios al provocar determinados efectos sobre otras plantas o animales. Estas sustancias se denominan *aleloquímicos* y el fenómeno en el cual están involucradas se designa con el nombre de *aleloquimia*. Los compuestos que desencadenan este proceso se denominan *compuestos, agentes o sustancias alelopáticas* (Anaya y Cruz-Ortega 2001).

La síntesis de metabolitos secundarios comprende una serie de procesos metabólicos mediante los cuales los seres vivos sintetizan un gran número de compuestos orgánicos que aparentemente no le son indispensables para vivir. Estos compuestos se forman a partir de los metabolitos primarios y los procesos que conllevan a su formación pueden diferir en los diferentes organismos. Los productos del metabolismo secundario se forman a través de diferentes rutas biosintéticas como son la ruta del acetato-malonato, ruta del ácido siquímico, ruta del acetato-mevalonato y ruta 1-desoxilulosa-5-fosfato (DOXP) y se denominan metabolitos secundarios, mismos que presentan una distribución taxonómica restringida en ocasiones característico de un género o especie (Bruneton, 1984; Buchanan, 2000; Gros, 1985).

Existe cada vez un mayor número de evidencias que indican que los metabolitos secundarios cumplen con una función específica en el organismo que los produce. De manera general los principios activos y los agentes responsables del aroma y el color de numerosas plantas son metabolitos secundarios (Harborne, 1988).

## 1.2 Alelopatía

La alelopatía es un término creado por el fisiólogo de plantas Molisch (1937) a partir de las palabras griegas *allelon* (mutuo, recíproco) y *pathos* (perjuicio, desventaja, sufrimiento). Tomado en sentido literal, significa el efecto perjudicial entre dos plantas. Sin embargo Molisch, con gran visión, definió la alelopatía como la interacción bioquímica, dañina o benéfica, entre todo tipo de plantas, e incluye en ellas a los microorganismos (Anaya y Cruz-Ortega, 2001). Whittaker (1971) propuso que el término incluyera todas las interferencias entre los seres vivos que ocurren en el reino vegetal provocadas por sustancias químicas elaboradas por ellos, (Almeida, 1988). La transferencia de compuestos aleloquímicos producidos en las hojas, tallo, corteza y raíces de una planta superior a otra en una comunidad terrestre puede entrar en contacto por varios caminos por ejemplo, volatilización, lixiviados acuosos de hojas y tallos, exudados de las raíces o bien por descomposición de residuos, alternativamente estos compuestos son absorbidos en el suelo y solubilizados en el mismo (Einhellig, 1995). Es a través de fenómenos de alelopatía que algunas especies de plantas interfieren en el desarrollo de los cultivos, un ejemplo de esto es el sorgo que inhibe el crecimiento del maíz; o la alfalfa que al ser adicionada al suelo de los cultivos de pepino, tomate y lechuga estimula su crecimiento (Einhellig, 1985; Rice, 1987).

Por otro lado un compuesto que es tóxico para una especie puede ser inocuo para otra (Putnam y Duke, 1978). Se sabe que una planta puede producir diversas sustancias con efectos alelopáticos y que entre ellas se desencadenan

una serie de interacciones. La producción de sustancias alelopáticas se establece como consecuencia de una verdadera guerra química entre los individuos en donde cada uno pelea por su integridad y supervivencia. Las plantas no pueden escapar al ataque de sus enemigos, se cree que por tales factores utilizan una gran cantidad de metabolitos con mayor intensidad que los demás seres vivos; siendo esta una estrategia química como parte de sus diversas funciones bioquímicas. (Rice, 1985)

De acuerdo a las investigaciones realizadas en la búsqueda de diferentes metabolitos secundarios se considera que los aleloquímicos con mayor potencial herbicida son los terpenos (monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos) lactonas sesquiterpénicas y ácidos grasos con un rango de actividad de 25 ppm (Macías, 1995). En el cuadro I se muestran algunos ejemplos de compuestos alelopáticos presentes en algunas especies de plantas.

Cuadro I. Ejemplos de compuestos alelopáticos presentes en algunas especies de plantas.

Tipo de estructura		Compuestos	Especie
Lípidos y ácidos grasos		Ácido 9S, 12S, 13S-trihydroxyoctadeca-10E,15Z-dienoico	<i>Helianthus heterophyllus</i> (Macías, 1999(a))
Terpenos	monoterpenos	1-8 cineol, alcanfor limoneno, p-cimeno	<i>Artemisia californica</i> Less. (Halligan, 1975). <i>Ceratiola aurantium</i> L. (AlSaadawi et al., 1985)
	triterpenos	Azadiractina Ácido betulínico, Ácido betulónico	<i>Azadirachta indica</i> (Reibold et al., 1989) <i>Mellilotus messanensis</i> (Macías y Galindo, 2001)
	sesquiterpenos	Cacalol $\gamma$ -bisaboleno, chamazuelo, $\beta$ -ariofileno	<i>Psacalium decompositum</i> (Anaya et al., 1996) <i>Artemisia absinthium</i> L. (Grümer, 1961)

Continuación...

Cuadro I. Ejemplos de compuestos alelopáticos (metabolitos secundarios) presentes en algunas especies de platas.

Lactonas	Tricolorin A	<i>Ipomea tricolor</i> (Pereda-Miranda et al., 1993)
Lactonas sesquiterpénicas	Isoalloalantolactona Elemenodienolido	<i>Ratibida mexicana</i> (Anaya, 1995)
Tetranortriterpenoides (limonoides)	Humilínolidos A, B, C y D	<i>Swietenia humilis</i> (Anaya, 1995)
Flavonoides	Floridzina Bolibetina y amentoflavona	<i>Malus</i> <i>Claenodendrom mexicanum</i> (Anaya, 1995)
Alcaloides	Fisostigmina	<i>Physostigma venenosum</i> (Crooks et al., 1976)
Cumarinas	Escopoletina y escopolina	<i>Helianthus spp</i> (Macías, 1999 (a)).
Esteroides	Brassinólidas $\beta$ -sistosterol; (20S)- metilenofenol; estigmastan-4-3,6 diona	<i>Brassica sp</i> <i>Thypha latifolia</i> (Macías y Galindo, 2001)

Previo a la determinación de los metabolitos secundarios con actividad alelopática en diversos trabajos de investigación se han reportados bioensayos con los extractos crudos frente a diferentes semillas de los cuales las  $CI_{50}$  se muestran en el cuadro II.

Cuadro II.  
Ejemplo de  $CI_{50}$  de diferentes extractos y fracciones de especies de plantas en solventes orgánicos

Especie	Extracto	Efecto en	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Especie
<i>Malmea deppresa</i> (Annonaceae)	MeOH	Elongación radicular	41.18 213.73	<i>E. crusgalli</i> <i>A. hypochondriacus</i> (Mata, 1996)
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Elongación radicular	457.7 mg/mL 134 mg/mL	<i>E. crusgalli</i> <i>A. hypochondriacus</i> (Anaya, 2001)
<i>Ipomoea tricolor</i> (Convolvulaceae)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Elongación radicular	40.0	<i>E. crusgalli</i> (Mata, 1996)
<i>Swietenia humilis</i> (Meliaceae)	MeOH	Elongación radicular	171.5 275.9	<i>E. crusgalli</i> <i>A. hypochondriacus</i> (Anaya, 1995)
<i>Parmotrema tinctorum</i> (Parmeliaceae)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 1:1	Germinación	150.6 102.3	<i>E. crusgalli</i> <i>A. hypochondriacus</i> (Rojas, 2002)
		Elongación radicular	151.4 135.0	<i>E. crusgalli</i> <i>A. hypochondriacus</i> (Rojas, 2002)
<i>Leucophyllum ambiguum</i> (Scrophulariaceae)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 1:1	Germinación	525.3 312.3	<i>E. crusgalli</i> <i>A. hypochondriacus</i> (Rojas, 2002)
		Elongación radicular	638.1 214.3	<i>E. crusgalli</i> <i>A. hypochondriacus</i> (Rojas, 2002)

Continuación...

Ejemplo de  $CI_{50}$  de diferentes extractos y fracciones de especies de plantas en solventes orgánicos

<i>Podantus mitiqui</i> (Asteraceae)	$CH_2Cl_2$	Germinación	25.2 21.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2001)
		Elongación de raíz	32.1 12.3	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2001)
		Elongación de tallo	27.5 23.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2001)
<i>Baccharis linnearis</i> (Asteraceae)	$CH_2Cl_2$	Germinación	25.2 21.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2002)
	MeOH	Germinación	119.0 125.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2002)
<i>Baccharis magellanica</i> (Asteraceae)	$CH_2Cl_2$	Germinación	28.5 23.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2002)
	MeOH	Germinación	135.2 125.9	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2002)
<i>Baccharis umbelliformis</i> (Asteraceae)	$CH_2Cl_2$	Germinación	27.2 20.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2002)
	MeOH	Germinación	121.0 120.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2002)
<i>Cedrela ciliolata</i> (Meliaceae)	$CH_2Cl_2$	Germinación	27.2 20.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 1999)



Continuación...

Ejemplo de  $CI_{50}$  de diferentes extractos y fracciones de especies de plantas en solventes orgánicos

<i>Podantus mitiqui</i> (Asteraceae)	Fracciones	Germinación F <sub>o</sub> -1	25.2 21.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2001)
		Germinación F <sub>o</sub> -2	321 12.3	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2001)
		Germinación F <sub>o</sub> -3	27.5 23.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2001)
		Germinación F <sub>o</sub> -4	25.2 21.0	<i>L. multiflorum</i> <i>P. ixocarpa</i> (Céspedes et al., 2001)

### 1.3 Malezas

Algunas plantas nocivas o perjudiciales para la agricultura ocupan un micro hábitat sin importancia en la tierra de cultivo y causan poco daño. Otras entran en encarnizada competencia con las plantas cultivadas y limitan la producción en forma grave. Las plantas nocivas son indeseables. Una planta es nociva sólo si el hombre así lo determina. Se considera que las plantas son nocivas cuando obstaculizan la utilización de la tierra y los recursos hidráulicos o, también si se interponen en forma adversa al bienestar humano, las plantas nocivas compiten con vegetación más beneficiosa, disminuyendo el rendimiento y la calidad de los productos del campo. Una maleza es una planta que *crece donde no se desea; o una planta fuera de lugar*. Las malezas abarcan todo tipo de plantas nocivas como árboles, plantas de hojas anchas, pastos, juncos, junquillos, plantas acuáticas, etc. La práctica de control de las malezas es tan antigua como la agricultura misma. A pesar de que en nuestra forma de vida hemos aprendido a controlar casi cualquier cosa, el hecho de que se conozca aún muy poco sobre los modos y sitios de acción de las malezas, hacen de este problema un renovado campo de investigación científica.

Debido a que en la agricultura se requieren grandes cantidades de energía en términos de equipo, combustible y fuerza humana, y existiendo la necesidad de incrementar la producción alimentaria, es necesario crear y usar mejores métodos para el control de las malezas (National Academy of Sciences, 1978).

## **1.4 Semillas**

Las semillas constituyen, dentro del ciclo de la vida de las plantas, la unidad de dispersión y el medio de perpetuación de la especie. Una semilla madura está compuesta básicamente de tres partes: embrión, sustancias nutritivas de reserva y testa. Las semillas pueden clasificarse en monocotiledóneas y dicotiledóneas en base a algunos de los siguientes criterios.

### **1.4.1 Semillas Monocotiledóneas.**

Se caracterizan porque sus plántulas poseen un solo cotiledón llamado scutelum, cuya función es principalmente la movilización y absorción de nutrientes del medio en el proceso de germinación. Sus hojas con frecuencia son largas, estrechas y con nervaduras paralelas, su raíz es fibrosa. El tejido vascular es arreglado en yemas más o menos dispersas (Hopkins, 1995). Ejemplos de ellas son *Lolium multiflorum* (pasto), *Triticum vulgare* (trigo)

### **1.4.2 Semillas Dicotiledóneas.**

Se caracterizan porque sus plántulas poseen dos cotiledones que suministran los nutrientes a la semilla durante la germinación. Las hojas verdaderas suelen ser anchas y con nervaduras con un eje central, su raíz es típica, con una guía central y radicular a sus costados (Hopkins, W. 1995). Ejemplos de ellas son *Lactuca sativa* (lechuga), *Physalis ixocarpa* (tomate) y *Trifolium pratense* (trébol).

## 1.5 Germinación

La germinación comienza cuando en la semilla aletargada o en reposo se activa la maquinaria bioquímica y se desencadenan los procesos metabólicos. La culminación de la germinación coincide con la iniciación de la actividad fotosintética, lo que altera totalmente el metabolismo de la plántula nacida de la semilla (Besnier, 1989).

En el lenguaje común agronómico se dice que una semilla ha germinado cuando todas las partes de la plántula emergen viables y sanas, pero es la ruptura de la testa por la radícula lo que en botánica se denomina germinación. Sin embargo, desde un punto de vista estrictamente fisiológico, la emergencia de la radícula o del hipocófito a través de la cubierta seminal sólo representa la fase final de la germinación, la elongación radicular involucra únicamente la extensión celular y no involucra la división celular (Koller y Hadas, 1982). En un sentido estricto, la germinación comienza con la entrada de agua a la semilla, que le permite reasumir la actividad metabólica (respiración, síntesis de proteínas y otros) y termina con el crecimiento de la radícula que emerge al exterior. Para esto utiliza parte de sus nutrimentos de reserva y desarrolla gradualmente sistemas enzimáticos que le permitirán asumir luego su existencia autotrófica. La hidratación de la semilla corresponde a un aumento de volumen, debido a los coloides presentes en ella, e involucra los procesos de imbibición y ósmosis. Uno de los primeros procesos que se activan es la respiración, destinada a entregar la energía necesaria para la ruptura y movilización de reservas que serán utilizadas en el eje embrionario para crecer (Fernández, 1986).

## **1.6 Herbicidas**

Los herbicidas son elementos clave en la agricultura moderna, pues su uso coadyuva a obtener altos rendimientos de manera continua en los cultivos de importancia económica. Estos agentes, cuando son utilizados correctamente, pueden evitar pérdidas en las cosechas hasta de un 40%; sin embargo, cuando se aplican incorrectamente o de forma excesiva, las consecuencias sobre el medio ambiente y la salud pública pueden ser fatales. La Organización de las Naciones Unidas (ONU) ha publicado una lista de sustancias químicas cuyo uso se encuentra prohibido o restringido debido al grave riesgo que representan y muchas de ellas corresponden a agentes herbicidas, de los cuales, la gran mayoría son productos sintéticos (Richardson, 1998). Entre los herbicidas sintéticos de mayor uso que ocasionan daños agudos y crónicos severos tanto en animales como en el hombre, se encuentran el ácido 2,4-diclorofenoxy acético (2,4-D), el dicamba, el linuron, la atrazina y la prometona. Algunas de estas sustancias han demostrado incluso propiedades carcinogénicas importantes (Barnard et al., 1997).

### **1.6.1 Sitios de acción de herbicidas**

Al hablar del metabolismo de las plantas se hace referencia a numerosas reacciones bioquímicas, que se efectúan en el protoplasma de las células vegetales. A pesar de que numerosas reacciones tienen lugar en casi todas las células de la planta como por ejemplo - la respiración -, algunas se efectúan sólo en células especializadas, por ejemplo - la fotosíntesis -, que se lleva a cabo en células que contienen clorofila.

Las reacciones bioquímicas están interconectadas y frecuentemente cuando una reacción es alterada por un herbicida, también las otras se ven rápidamente afectadas.

Si se interrumpe cualquiera de estas se puede afectar el metabolismo de la planta y por lo tanto dañarla o matarla, ejemplo de estas reacciones se mencionan a continuación: la fotosíntesis (CF1 ATPasa), la respiración (cadena redox en mitocondrias), el metabolismo de los carbohidratos, el metabolismo de los lípidos (3-oxoacil-ACP sintetasa, ceramida sintetasa), metabolismo de ácidos nucleicos (RNA polimerasa, adenilsuccinato sintetasa, AMP deaminasa, isoleucil-t-RNA sintetasa), metabolismo de amino ácidos (glutamino sintetasa, aspartato amino transferasa, ornitina carbamoil transferasa,  $\beta$ -cystathionasa) y el metabolismo de las proteínas. (Dayan, 1999; Hoagland, 1991 y Gauvrit, 1992).

### **1.6.2 Herbicidas de origen natural**

Los productos naturales tiene gran potencial para ser empleados como herbicidas, esto es de mucho interés ya que permitirá descubrir herbicidas efectivos y económicos que sean benignos y no tóxicos (Duke y Abbas, 1995). Varios trabajos publicados en fitoquímica informan de acciones herbicidas de sustancias extraídas de plantas (Harborne, 1995). Sus acciones son muy específicas, pudiendo una misma sustancia desempeñar varias funciones dependiendo de la concentración.

Se han identificado en años recientes nuevos aleloquímicos y ha sido claro que la acción de estos es importante para caracterizar en un futuro la interrelación entre organismos. Estos compuestos influyen en las comunidades vegetales, sucesión de plantas, preservación de semillas, germinación de esporas de hongos, el ciclo del nitrógeno, asociación mutualista, productividad de cosechas y defensa de plantas. Otras metas son adaptar aleloquímicos como herbicidas, pesticidas, y estimuladores del crecimiento, modificar genomas de cultivos para manipular la producción de aleloquímicos, y mejorar la elucidación de la comunicación química que genera la asociación entre microorganismos y plantas mayores. (Einhellung, 1995).

Se han encontrado productos naturales como modelos de sustancias de defensa contra los depredadores, ya sean insectos, hongos y bacterias, o como sustancias de ataque contra otras plantas (Crombie, 1999). Los insecticidas y herbicidas de origen vegetal pueden ofrecer un recurso de agentes para el control de plagas (Berembaum, 1989; Castillo et al., 1998; Crowley et al., 1998; Miyazawa et al., 1998) y pueden ser una alternativa eficiente frente a los pesticidas sintéticos (Kubo et al., 1997). Las características que se toman en cuenta para el uso exitoso de metabolitos secundarios como insecticidas y herbicidas naturales son que, la mayoría de ellos tienen una baja toxicidad para los mamíferos ya que carecen de una actividad neurotóxica, presentando una baja persistencia en el ambiente debido a que son biodegradables, lo cual los hace menos agresivos para el ambiente que los sintéticos (Camps, 1988; Berembaum, 1989; Castillo et al, 1998).

## II.- ANTECEDENTES

### 2.1 Las asteráceas

En México existe un número importante de especies pertenecientes a la familia de las asteráceas de las cuales se conoce una gran variedad de metabolitos secundarios, en la actualidad más de 50 especies han sido estudiadas. Su distribución es cosmopolita, pero esta mejor representada en las regiones templadas y subtropicales que no están densamente forestadas.

La familia Asteraceae es una de las familias con mayor número de especies y amplia distribución geográfica. Está presente por todo el territorio nacional, debido a una gran diversidad morfológica, poder de adaptación climática y condiciones ecológicas. El número de géneros y especies varía según el criterio del autor, México cuenta con 2700 especies distribuidas entre 323 géneros y de estos, probablemente 2600 son nativas (Ortiz, 1995).

La familia de las asteráceas se divide en 1100 géneros, 20000 especies. Por ejemplo, en orden decreciente se puede mencionar a los géneros *Senecio* (1500), *Vernonia* (900), *Hieracium* (800), *Eupatorium* (600), *Centaurea* (600), *Coussinia* (600), *Cynareae* (500), *Helichrysum* (500), *Baccharis* (400) y *Artemisia* (400), entre otros.



## **Taxonomía**

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (dicotiledoneas)

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae (Compositae)

Género: *Baccharis*

Especies: *Baccharis salicifolia* y  
*Baccharis conferta*

## **2.2 Antecedentes de la especie *Baccharis salicifolia*.**

### **2.2.1 Antecedentes botánicos**

#### ***Baccharis salicifolia* (Ruíz et Pavón) Pers.**

##### **Sinonimias:**

*Baccharis glutinosa* Pers.

##### **Nombres comunes:**

Azumiate, Bachomo, Batamote, Chamiso, Chamizo del rio, Cucamoarisha (cora), Cuerepillo, Guatamote, Guatarote, Hierba del pasmo, Jara amarilla, Jara mexicana, Jaral, Jarilla, Togzten.

##### **Descripción:**

Arbusto de 80 cm a 2 m de altura.

##### **Usos:**

Medicinal: La planta completa es usada para la bilis y se aplica en el estómago la planta molida ya sea fresca o hervida, en forma de emplastos con un poco de

alcohol. Además se usa contra infecciones de la piel, para detener hemorragias y controlar la tos; en enfermedades culturales como: mal de aire, susto y fuerte aire. El follaje en aguardiente alivia la dismenorrea, menorragia, esterilidad, evitar el aborto, salpullido y varicela, antes de aplicar se añade un puño de bicarbonato. Las hojas machacadas con alcohol para tumores y llagas, Infecciones de la piel, contra el resfriado y la tos. El cocimiento con carbonato se usa para curar salpullido y varicela. No se tiene definida la parte de la planta que se usa para tratar la obesidad, pies inflamados, y fiebre.

**Hábitat:**

Especie de hábito terrestre, ruderal, crece en bosque de encino, pino, pino-encino y otras coníferas de los 2100 a los 2500 msnm.

**Manejo:**

Esta especie no tiene un manejo específico para su propagación.

**Recolecta:**

El aprovechamiento de la planta es de tipo doméstico.

**Comercialización:**

La mayor parte de lo que se colecta es de autoconsumo y no tiene valor comercial.

**Distribución:**

Chihuahua: La especie se reporta para el estado pero no se tiene el registro municipal.

Durango: Canatlan, Mezquital, Suchil.

Guerrero: Alcozauca de Guerrero.

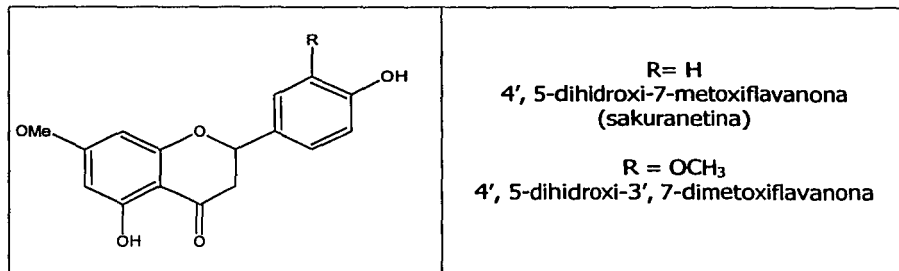
Jalisco: Casimiro Castillo, Cuautitlan, Jocotepec.

Michoacan: Tzintzuntzan, Zitacuaro, Charo, Churintzio, Alvaro Obregón, Jiménez, Morelia, Nuevo Urecho, Patzcuaro, Puruandiro, Tlazazalca.

Oaxaca: La especie esta reportada para el estado pero se desconoce el registro por municipio (<http://www.semarnat.gob.mx>).

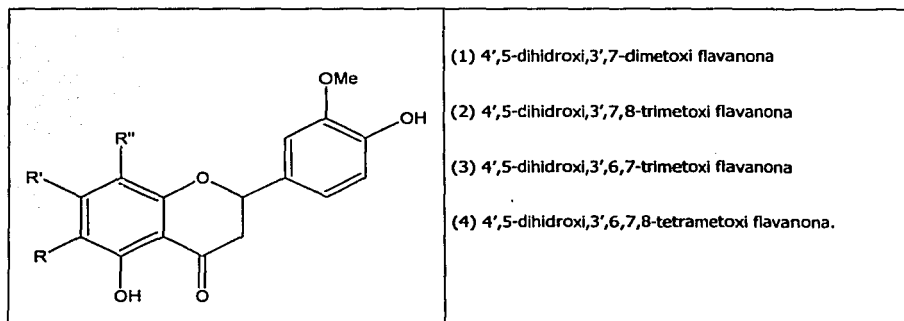
## 2.2.2 Antecedentes químicos.

Se han aislado dos flavanonas en el extracto obtenido con cloruro de metileno (Romo, 1972) identificadas como:



Otros estudios fitoquímicos muestran el aislamiento de otras cuatro flavanonas (Kavka et, al. 1973):

	1	2	3	4
R	H	H	OMe	OMe
R'	OMe	OMe	OMe	OMe
R''	H	OMe	H	OMe



## **2.3 Antecedentes de la especie *Baccharis conferta*.**

### **2.3.1 Antecedentes botánicos**

#### ***Baccharis conferta* HBK.**

**Sinonimias:**

No hay reportadas.

**Nombres comunes:**

Azoyate, Escoba, Escoba ancha, Escoba cabezona, Escoba del monte, Escobilla y Hierba del carbonero.

**Descripción:**

Arbusto de 2 m de altura.

**Usos:**

Medicinal: El follaje cura las siguientes afecciones calambres en las piernas, catarro, enfriamiento, rinitis, diarrea, vómito, para el dolor de muelas se hacen buches, se usa en el posparto. Para el dolor de estómago se mastican los cogollos.

**Hábitat:**

Especie de hábito terrestre, crece en bosque de encino, pino, pino-encino, otras coníferas y otras latifoliadas, se desarrolla de los 2850 a los 3025 msnm.

**Manejo:**

Esta especie no tiene un manejo específico en el bosque. En forma natural esta especie no se considera comercial y generalmente no se sigue alguna práctica agrosilvícola para asegurar su reproducción ya que es una planta muy agresiva y se establece en lugares perturbados y deforestados.

**Aprovechamiento:**

En el bosque se colecta esta especie para elaborar hornos de carbón.

**Comercialización:**

Esta especie es de autoconsumo y no tiene un valor comercial.

**Distribución:**

Durango: La especie se encuentra reportada para el estado pero no se tiene registro por municipio.

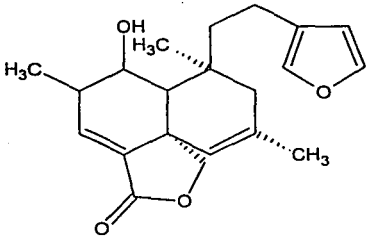
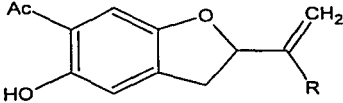
Guerrero: Coahuayutla de José Ma. Izazaga, Coyuca de Benitez, Coyuca de Catalan, Chilpancingo de los Bravo, Ajuchitlan del Progreso, General Heliodoro Castillo, Alcozauca de Guerrero, Leonardo Bravo, Metlatonoc, Petatlan, San Miguel Totolapan, Tecpan de Galeana.

Michoacan: Uruapan, Zinapecuaro, Zitacuaro, Charo, Erongaricuaro, Hidalgo, Huiramba, Anganguero, Morelia, Ocampo, Patzcuaro, Ario.

Oaxaca: San Juan Bautista Tuxtepec (<http://www.semarnat.gob.mx>).

**2.3.2 Antecedentes químicos.**

Se ha descrito el aislamiento de un diterpeno, bacchofertina (Guerrero y Romo de Vivar et al., 1973) y dos cumarinas (Bohlmann et al., 1976).

	<p style="text-align: center;">bacchofertina</p>
	<p style="text-align: center;">R= CHO 6-acetil-2-(1-formamilvinil)-5-hidroxicumaran.</p> <p style="text-align: center;">R= CH<sub>2</sub>OAc 2-[(1-acetoximetil) vinil]-6-acetil-5-hidroxicumaran</p>

### III.- JUSTIFICACIÓN

La selección de las especies *B. salicifolia* y *B. conferta*, se realizó debido a que en observaciones de campo muestran un alto grado de competencia y adaptación a condiciones ambientales extremas, hechos que las hacen muy buenas candidatas en la búsqueda de nuevas fuentes naturales de extractos, fracciones o compuestos con fuertes características alelopáticas. Además tomando en cuenta dos de los criterios más empleados para la detección de fuentes potenciales de principios activos: el etnobotánico y el quimiotaxonómico. El primero, se basa en el hecho de que las plantas medicinales utilizadas en la medicina popular de diversas regiones del mundo han constituido el punto de partida para el aislamiento de compuestos activos de interés medicinal y agroquímico (Duke y Abbas, 1995; Benner, 1993; Hamburger y Hostettman, 1991; Pillmoor et al., 1993). El segundo, se fundamenta en los antecedentes de la familia Asteraceae como una fuente valiosa de compuestos bioactivos (Proksch y Rodríguez, 1983; Duke, 1991; Fischer, 1991; Duke y Abbas, 1995).

## IV.- OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Realizar el estudio fitoquímico biodirigido de dos especies de la familia Asteraceae, *Baccharis salicifolia* y *Baccharis conferta* mediante la obtención y elección de diferentes extractos para determinar cuál de éstos presenta actividad alelopática, tomando como modelo de selección su efecto en la germinación de semillas y el desarrollo de la raíz y el tallo de las plántulas de una especie monocotiledónea (*Lolium multiflorum*) y otra dicotiledónea (*Lactuca sativa*); y así determinar los extractos y fracciones con actividad reguladora o inhibidora del crecimiento.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos.

### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener de los extractos en diclorometano y metanol de las especies *Baccharis salicifolia* y *Baccharis conferta*.
- Determinar los extractos de ambas especies de asteráceas que presenten mayor actividad inhibitoria en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las especies a prueba.
- Obtener de fracciones parciales del extracto activo.
- Determinar las fracciones que presentan mayor actividad reguladora o inhibitoria de los parámetros medidos.
- Mediante ensayos bioautográficos elucidar que compuesto o compuestos de las fracciones presentan actividad inhibitoria en la germinación de las semillas y elongación de la raíz y del tallo de las plántulas.
- Aislar los compuestos que presenten actividad biológica mediante el empleo de técnicas cromatográficas convencionales.

## V.- PARTE EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se siguió la estrategia general que se describe a continuación. En primer lugar se llevó a cabo la preselección de las especies objeto de estudio mismas que se realizaron de acuerdo a consideraciones ecológicas, etnobotánicas y quimiotaxonómicas. A continuación se evaluó la actividad herbicida de los extractos orgánicos que se prepararon a partir de las fuentes naturales preseleccionadas. En estas evaluaciones se determinó principalmente el efecto de los extractos crudos sobre la germinación de semillas y la elongación de raíz y tallo de las plántulas de las especies *L. multiflorum* y *L. sativa* (Anaya et al., 1990; Pereda-Miranda et al., 1993; Macías et al., 1999). Posteriormente se realizó el fraccionamiento de los extractos que presentaron actividad herbicida significativa tomando como criterio los valores mostrados en el cuadro II. De las fracciones obtenidas se realizó un fraccionamiento biodirigido en el cual se utilizó un método bioautográfico sobre cromatografía de capa fina para monitorear la actividad biológica (Inoue et al., 1992).

### 5.1. MATERIAL VEGETAL

*Baccharis salicifolia* (1.340 Kg) colectada en Hidalgo. Junio de 1996.

*Baccharis conferta* (1.426 Kg) colectada en la carretera federal México-Cuernavaca. Octubre de 2000.

Las plantas en estudio se secaron a temperatura ambiente, para deshidratarlas, ya que así se facilita la extracción de los compuestos. Posteriormente se trituraron con ayuda de un molino.



## 5.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES

### 5.2.1 Preparación de los extractos orgánicos de *B. salicifolia* y *B. conferta*.

Como primer tratamiento se obtuvo por maceración un extracto con diclorometano para la obtención de compuestos de naturaleza medianamente polar, y otra maceración con metanol para obtener compuestos de naturaleza polar. Cada extracto obtenido se concentró en un rotavapor a la temperatura adecuada para cada disolvente; metanol 60 °C con vacío y diclorometano a 40 °C sin vacío.

### 5.2.2 Ensayo Biológico Primario: Inhibición de la germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas

La determinación de la actividad herbicida de los extractos y fracciones fue evaluada con uno de los ensayos biológicos más empleados para el estudio de aleloquímicos el cual comprendió la evaluación de la germinación de semillas y la elongación de raíz y tallo de las plántulas de las especies *L. multiflorum* y *L. sativa* (Vyvyan, 2002; Dornbos y Spencer, 1990). Para lo cual se realizó la técnica que a continuación se describe:

El bioensayo se realizó en cajas petri de vidrio de 10 cm de diámetro a las que se les coloca en el fondo un papel filtro esterilizándose previamente. Se lavaron las semillas de *L. multiflorum* y de *L. sativa* con una solución al 10 % de hipoclorito de sodio. Se preparó una solución stock de los extractos a 10000 ppm en el disolvente adecuado, de la cual se tomaron los volúmenes apropiados para obtener concentraciones de 250, 500, 750 y 1000 ppm estos se colocaron sobre el papel filtro de las cajas petri y se permitió la evaporación completa del disolvente

antes de agregar 10 mL de agua destilada previamente esterilizada. A continuación se inició la germinación de 25 semillas por caja, en todos los casos se efectuaron dos réplicas una con agua y los disolventes utilizados para la preparación de las soluciones como controles negativos y 2,4-D como control positivo. Lo anterior se realizó dentro de una campana de flujo laminar para evitar la contaminación microbiana. Posteriormente las cajas petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 28 °C. El tiempo de incubación fue de aproximadamente de 36 h para germinación y de 72 horas para elongación; con un fotoperiodo de 12 de luz y 12 de obscuridad. Transcurrido el periodo de germinación se contaron las semillas tomado como criterio de germinación el surgimiento de por lo menos 1-2 mm de radícula, cada caja se observó bajo una lupa, a las 72 h se eliminó el agua de cada una de las cajas y se midió la longitud tanto de la raíz como del tallo de las plántulas (técnica tomada de Macías et al., 2000).

Los datos obtenidos de este ensayo se utilizaron como criterio para determinar que extracto es el que presentó mayor actividad biológica, es decir, en cual se observó menor germinación de las semillas y posterior elongación de la raíz y del tallo de las plántulas. Estos datos se analizaron estadísticamente.

El extracto que presentó mayor actividad biológica se fraccionó empleando una cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice y las fracciones se sometieron a un estudio biológico en condiciones similares.

### **5.2.3 Ensayo biológico secundario: Inhibición de la germinación de semillas y desarrollo de plántulas**

Al finalizar la columna y unir las fracciones con compuestos en común monitoreadas a través de cromatografía en capa fina se prosiguió a realizar el mismo bioensayo descrito anteriormente para cada grupo de fracciones unidas, en este caso únicamente a 1000 ppm, se utilizaron las fracciones que presentaron mayor actividad biológica y se descartaron las fracciones que no la presentaron.

Las fracciones que resultaron ser más activas a 1000 ppm se evaluaron mediante otro ensayo de germinación y elongación de la misma manera que el descrito, pero en este caso a concentraciones de 50, 100, 250, 500, 750, y 1000 ppm, si la fracción resulta ser activa a estas concentraciones se realizó un ensayo bioautográfico, con la finalidad de localizar el Rf sobre la placa los compuestos o mezcla de compuestos que le confieren la actividad a la fracción.

### **5.2.4 Ensayo biodirigido (placas bioautográficas)**

La investigación en plantas puede realizarse de forma fitoquímica enfocada al descubrimiento de principios biodinámicos. Los métodos biodirigidos permiten el aislamiento de sustancias activas, ya que desde la obtención de los extractos se descartan aquellos que son inocuos en el sistema de prueba posteriormente se realiza el mismo procedimiento con las fracciones del extracto activo y los que muestran actividad se separan y se realiza la obtención de principios activos.

El cernimiento biológico es un proceso selectivo que implica probar en un sistema de experimentación adecuado gran número de plantas con objeto de determinar si tiene o no una actividad biológica determinada. También puede realizarse utilizando grupos de prueba para evaluar algunos tipos concretos de actividad. Para este tipo de estudio la selección de plantas a probar puede

efectuarse mediante diversos criterios, ya sea mediante la selección completamente al azar, en función del contenido de tipos de compuestos químicos, o bien, con base en el uso reportado en la medicina tradicional (Navarrete, 1992; Inoue et al., 1992).

Para monitorear la actividad herbicida de las fracciones se utilizó el método bioautográfico (Inoue et al., 1992). Este ensayo se realizó para determinar que compuesto o compuestos son los responsables de que las fracciones presenten actividad inhibitoria en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas consistió en lo siguiente:

Se sembraron las fracciones a evaluar en placas recubiertas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> en soporte de vidrio de 5 x 10 cm y se eluyó con una mezcla de solventes adecuado, una placa se empleó como referencia visualizada en UV y revelada con sulfato cérico y la otra como superficie para colocar las semillas, también se utilizó una placa como control, se dejó evaporar el solvente y posteriormente las placas se cubrieron con una solución de agar-agar al 1% dejando un espesor de aproximadamente 3 mm, al solidificar el agar se colocaron líneas de semillas de *Trifolium pratense* en forma vertical separadas aproximadamente 5 mm, se dejó germinar 36 h a 28 °C en una cámara para mantener la humedad, transcurrido el tiempo se observó si hubo inhibición en algún lugar de la placa.

Si se observó una inhibición significativa en el desarrollo de las semillas se midió el *R<sub>f</sub>* y se comparó con las placas de referencia para separar el compuesto o mezcla de compuestos que presentaron dicha actividad mediante técnicas cromatográficas convencionales.

Este ensayo se realizó previamente empleando especies de semillas de *Lolium multiflorum*, *Lactuca sativa*, *Trifolium pratense* y *Physalis ixocarpa* realizando el experimento en las condiciones mencionadas anteriormente. De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió emplear semillas de *Trifolium pratense*, ya que fueron las que necesitaron menor tiempo para que su germinación fuera apreciablemente significativa.

## 5.3 PARTE QUÍMICA

### 5.3.1. Análisis cromatográfico

En la cromatografía en columna se empleo gel de sílice 60, tamaño de partícula 0.063 - 0.2 mm (Merk), como fase estacionaria, en columnas de vidrio de diferentes capacidades, siguiendo las técnicas convencionales (Gailliot, 1998).

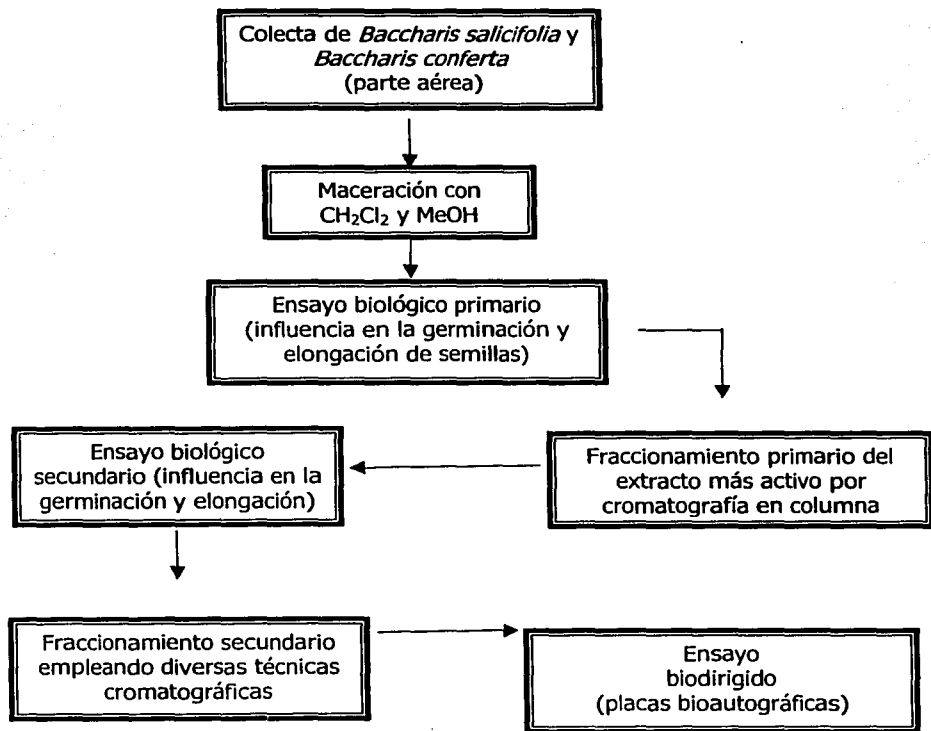
Para el aislamiento de compuestos se emplearon cromatoplasas preparativas (CCP) de 20 x 20 cm silica gel 60 F<sub>254</sub>, 1 mm y cromatoplasas analíticas (CCF) de 20 x 20 cm silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.25 mm.

Para realizar el seguimiento de las columnas y comprobar la pureza de los compuestos aislados se emplearon placas de aluminio sílica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.2 mm y empleando los agentes cromógenos que se muestran en el cuadro III.

Cuadro III. Agentes cromógenos empleados para los análisis de cromatografía en capa fina.

AGENTE CROMÓGENO	REACTIVOS
Sulfato cérico	12 g de sulfato cérico 22 mL de ácido sulfúrico 350 g de hielo
Yodo	Yodo elemental
Luz ultravioleta	Lámpara de luz ultravioleta Upland modelo UVLS-26 (254 – 365 nm)

## SECUENCIA DE TRABAJO



## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Obtención de los extractos orgánicos de las partes aéreas de *B. salicifolia* y *B. conferta*.

Se realizó la obtención de los extractos y sus características se encuentran reportadas en el cuadro IV.

Cuadro IV. Características principales de los diferentes extractos de las especies *B. salicifolia* y *B. conferta*

Especie	Pesos seco Kg	Solvente	Peso seco del extracto (g)	Características
<i>B. salicifolia</i>	1.340	diclorometano	23.6	Color verde opaco de olor característico.
<i>B. salicifolia</i>		metanol	37.13	Color verde opaco de olor característico.
<i>B. conferta</i>	1.426	diclorometano	28.43	Color verde opaco de olor característico.
<i>B. conferta</i>		metanol	32.87	Color verde opaco de olor característico.

Posteriormente se realizó el ensayo biológico primario de germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las especies a prueba con cada uno de los extractos.

### 6.2 Pruebas biológicas: Inhibición de la germinación de semillas y desarrollo de plántulas.

En estos estudios se evaluaron tres parámetros principales como son: germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum*. Estos parámetros son aceptados como medidas indirectas para evaluar el efecto de los extractos, fracciones y compuestos aleloquímicos probados. (Putman, 1985; Anaya, et al., 1995; Einghelling 1995; Shilling y Yoshikawa, 1987; Tang y Young, 1982; Wolf, 1986).

Los resultados reportados son los promedios de los ensayos realizados por duplicado y se encuentran reportados en porcentajes de germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas con respecto al control, es decir, un porcentaje cercano a cero representa una inhibición del crecimiento, mientras que valores mayores a cien representan un aumento en el desarrollo de las semillas (Macías et al., 1999; Macías et al., 2000(a); Macías et al., 2000(b)).

El error estándar se encuentra incluido en las tablas correspondientes con  $P = 0.05$  calculado en el programa Microsoft-Origin versión 5.0.

### **6.3 Ensayo biológico primario de los extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* a 250, 500, 750 y 1000 ppm**

Comparación de la actividad herbicida de los extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* en MeOH y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> evaluando su efecto sobre la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de las especies *L. sativa* y *L. multiflorum*.

#### Germinación *L. sativa* (extractos)

En ambas gráficas se observó que el extracto que presentó mayor actividad inhibitoria en la germinación de las semillas de *L. sativa* fue el extracto en diclorometano de *B. salicifolia*, presentando una CI<sub>50</sub> de 881 ppm, seguido por el extracto de *B. conferta* en metanol, con una CI<sub>50</sub> de 983 ppm.

En cuanto a los otros extractos la germinación observada no fue menor al 50% y por lo tanto no se obtuvo una CI<sub>50</sub>. (Cuadro V, tabla y gráfica 1).

#### Elongación de raíz y tallo de *L. sativa* (extractos)

La elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa*, se vio claramente afectada en su desarrollo, en presencia de ambos extractos de *B. salicifolia*, se presentó el mayor el efecto inhibitorio con el extracto en diclorometano teniendo un desarrollo menor al 10% con respecto al control a 1000 ppm y con una CI<sub>50</sub> de 289 en comparación al extracto en metanol que fue de 322 ppm, en cuanto a los extractos de *B. conferta*, estos incrementaron el desarrollo de la raíz, presentando



un mayor efecto a 250 ppm, observándose un incremento de más de 130 % con el extracto en metanol y de 105% con el extracto diclorometano, este efecto disminuye a 1000 ppm, pero se mantuvo cercano al 100% de desarrollo. (Cuadro V, tabla 2 y gráfica 2).

En cuanto al desarrollo de los tallos de las plántulas de *L. sativa* se observó un ligero efecto con los extractos de *B. salicifolia* a 1000 ppm, siendo el efecto más significativo con el extracto en diclorometano con una  $CI_{50}$  de 687 ppm, y el extracto en metanol una  $CI_{50}$  de 744 ppm, en cuanto al efecto de *B. conferta* ambos extractos presentaron un efecto similar a 1000 ppm y no se determinó la  $CI_{50}$ . (Cuadro V, tabla 3 y gráfica 3).

#### Germinación *L. multiflorum* (extractos)

En cuanto a la germinación de *L. multiflorum* el extracto que presentó mayor efecto fue el de *B. salicifolia* en diclorometano con un  $CI_{50}$  de 739 ppm, seguido por el de *B. conferta* en metanol con una  $CI_{50}$  de 838 ppm, los demás extractos no presentaron un efecto significativo (Cuadro V, tabla 4 y gráfica 4).

#### Elongación de raíz y tallo de *L. multiflorum* (extractos)

En el efecto sobre el desarrollo de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum* la inhibición fue marcada con el extracto de *B. salicifolia* en diclorometano, ya que éste presentó una elongación del 3% a 1000 ppm con respecto al control y una  $IC_{50}$  de 269 ppm, seguido por el extracto en metanol con una  $CI_{50}$  624 ppm, con los extractos de *B. conferta* las plántulas presentaron un desarrollo a 1000 ppm ligeramente menor al 50%, teniendo el extracto en metanol una  $CI_{50}$  de 828 ppm y con diclorometano una de 894 ppm (Cuadro V, tabla 5 y gráfica 5).

El desarrollo del tallo de las plántulas de *L. multiflorum* se vio principalmente afectado con el extracto en diclorometano de *B. salicifolia* con una  $CI_{50}$  de 471 ppm y un desarrollo del 19% a 1000 ppm, seguido por los extractos de *B. conferta* con una  $CI_{50}$  de 801 ppm con el extracto en metanol y de 843 ppm con el de diclorometano. (Cuadro V, tabla 6 y gráfica 6).

Por los resultados obtenidos se observó que el extracto con mayor actividad de inhibición en la germinación de semillas y elongación de raíz y del tallo de las plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum* fue el de *B. salicifolia* en diclorometano seguido por el extracto de *B. conferta* en metanol.

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de las especies a prueba con los extractos obtenidos se observó que las  $CI_{50}$  fueron altas (cuadro V), pero de acuerdo a los valores reportados (cuadro II) se observaron diferentes concentraciones que van de valores muy pequeños como 41  $\mu\text{g/mL}$  hasta 525  $\mu\text{g/mL}$  incluso 450  $\text{mg/mL}$ , para extractos por lo que se prosiguió con el fraccionamiento. Es importante mencionar que entre el extracto en metanol y diclorometano de *B. conferta* los resultados obtenidos no tuvieron mucha diferencia, pero el objetivo era realizar un estudio comparativo de dos especies diferentes; por lo que se prosiguió a fraccionar los extractos de *B. salicifolia* en diclorometano y *B. conferta* en metanol.

Cuadro V.  $CI_{50}$  en ppm de los extracto de *B. salicifolia* y *B. conferta* en la germinación de las semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de las especies de *L. sativa* y *L. multiflorum*.

	<i>B. salicifolia</i> MeOH	<i>B. salicifolia</i> $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	<i>B. conferta</i> MeOH	<i>B. conferta</i> $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
Germinación de <i>L. sativa</i>	-	881	983	-
Elongación la raíz de <i>L. sativa</i>	322	289	-	-
Elongación de tallo de <i>L. sativa</i>	744	687	-	-
Germinación de <i>L. multiflorum</i>	1000	739	838	-
Elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i>	624	269	828	894
Elongación del tallo de <i>L. multiflorum</i>	-	471	801	843

Cuadro VI. Fracciones obtenidas del extracto en diclorometano de *B. salicifolia*, en diferentes mezclas de solventes y las fracciones reunidas

No. de fracción	Proporción de la solución empleada para su extracción	Fracciones reunidas
1 - 9	10 Hexano	1 - 11
10 - 17	9 : 1 Hexano: AcOEt	12 - 27
17 - 24	8 : 2 Hexano: AcOEt	28 - 34
24 - 30	7 : 3 Hexano: AcOEt	35 - 43
31 - 37	6 : 4 Hexano: AcOEt	44 - 60
38 - 45	5 : 5 Hexano: AcOEt	61 - 68
46 - 52	4 : 6 Hexano: AcOEt	69 - 74
53 - 61	3 : 7 Hexano: AcOEt	75 - 78
52 - 70	2 : 8 Hexano: AcOEt	79 - 86
71 - 76	1 : 9 Hexano: AcOEt	87 - 88
77 - 85	10 AcOEt	89 - 116
86 - 93	9 : 1 AcOEt : MeOH	117 - 131
93 - 99	8 : 2 AcOEt : MeOH	
100 - 108	6 : 4 AcOEt : MeOH	
109 - 115	4 : 6 AcOEt : MeOH	
116 - 121	2 : 8 AcOEt : MeOH	
122 - 126	10 MeOH	
126 - 131	10 MeOH	

Cuadro VII. Fracciones obtenidas del extracto en metanol de *B. conferta* en diferentes mezclas de solventes y las fracciones reunidas

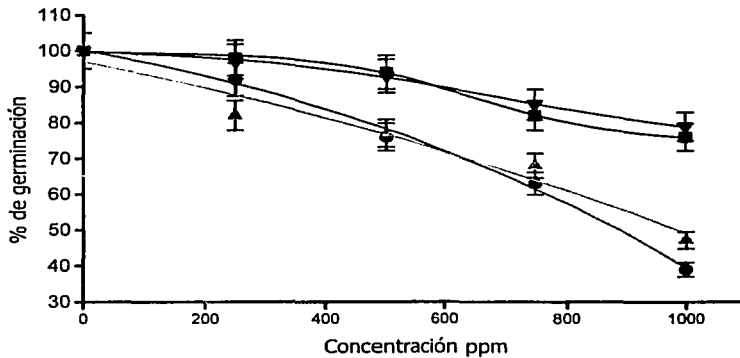
No. de fracción	Proporción de la solución empleada para su extracción	Fracciones reunidas
1 - 9	10 Hexano	1 - 8
10 - 17	9 : 1 Hexano: AcOEt	9 - 20
17 - 24	8 : 2 Hexano: AcOEt	21 - 26
24 - 30	7 : 3 Hexano: AcOEt	27 - 30
31 - 37	6 : 4 Hexano: AcOEt	31 - 34
38 - 45	5 : 5 Hexano: AcOEt	35 - 44
46 - 52	4 : 6 Hexano: AcOEt	45 - 54
53 - 61	3 : 7 Hexano: AcOEt	55 - 59
52 - 70	2 : 8 Hexano: AcOEt	60 - 69
71 - 76	1 : 9 Hexano: AcOEt	70 - 78
77 - 85	10 AcOEt	79 - 84
86 - 93	9 : 1 AcOEt : MeOH	85 - 87
93 - 99	8 : 2 AcOEt : MeOH	88 - 99
100 - 108	6 : 4 AcOEt : MeOH	100 - 113
109 - 115	4 : 6 AcOEt : MeOH	
116 - 121	2 : 8 AcOEt : MeOH	
122 - 126	10 MeOH	
126 - 131	10 MeOH	

Tabla 1.

Porcentaje de germinación de las semillas de *L. sativa* con los diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. sativa</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	98	4.9	92	4.6
500	94	4.7	76	3.8
750	82	4.1	63	3.15
1000	76	3.8	39	1.95

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. sativa</i> con los extractos de <i>B. conferta</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	82	4.1	97	4.85
500	77	3.85	93	4.65
750	68	3.4	85	4.25
1000	47	2.35	79	3.95



Gráfica 1. Efecto de diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* en la germinación de semillas de *L. sativa*.

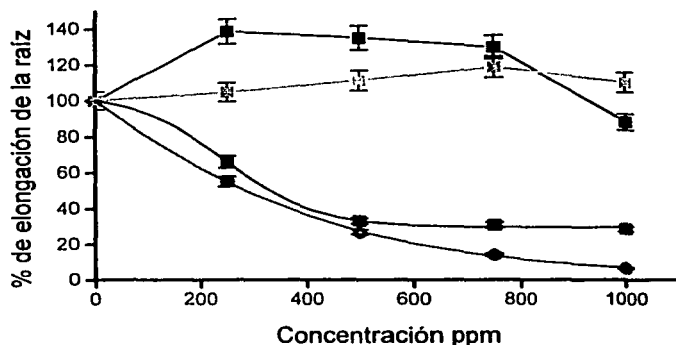
■ *B. salicifolia* MeOH ● *B. salicifolia* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ▲ *B. conferta* MeOH ▼ *B. conferta* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tabla 2.

Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa* con los diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. sativa</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	66.07	3.3035	55.06	2.753
500	33.03	1.6515	26.87	1.3435
750	30.83	1.5415	14.09	0.7045
1000	28.63	1.4315	6.6	0.33

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. sativa</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	138.7	6.935	104.8	5.24
500	135.2	6.76	111.4	5.57
750	130	6.5	118.9	5.945
1000	88.1	4.405	110.1	5.505



Gráfica 2. Efecto de diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* en la elongación de la raíz de semillas de *L. sativa*.

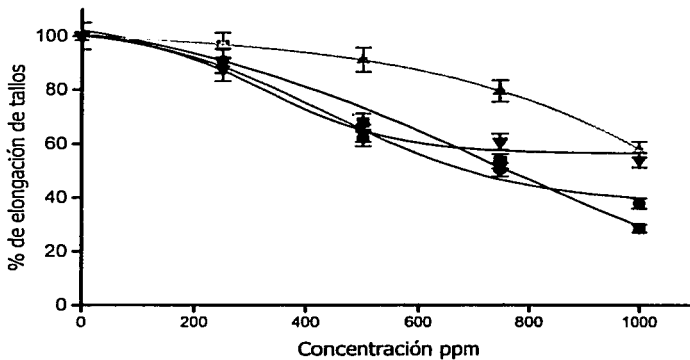
■ *B. salicifolia* MeOH ● *B. salicifolia* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> —■— *B. conferta* MeOH —■— *B. conferta* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tabla 3.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa* con los diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i>			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	96.4	4.82	90.71	4.5355
500	67.8	3.39	62.14	3.107
750	53.5	2.675	50.35	2.5175
1000	28.5	1.425	37.85	1.8925

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i> con los extractos de <i>B. conferta</i>			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	96.42	4.821	87.5	4.375
500	91.07	4.5535	63.92	3.196
750	79.42	3.971	60.71	3.0355
1000	57.85	2.8925	53.92	2.696



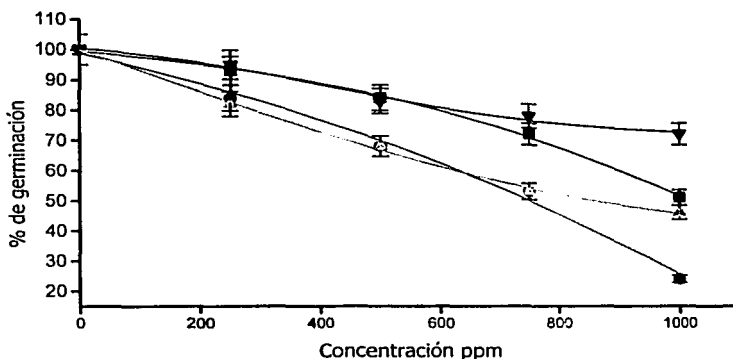
Gráfica 3. Efecto de diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* en la elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa*.

■ *B. salicifolia* MeOH ● *B. salicifolia* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ▲ *B. conferta* MeOH ▼ *B. conferta* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tabla 4.  
Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum* con los diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta*

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de semillas de <i>L. multiflorum</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	93	4.65	84	4.2
500	84	4.2	68	3.4
750	72	3.6	53	2.65
1000	51	2.55	24	1.2

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de semillas de <i>L. multiflorum</i> con los extractos de <i>B. conferta</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	82	4.1	95	4.75
500	68	3.4	83	4.15
750	53	2.65	78	3.9
1000	46	2.3	72	3.6



Gráfica 4. Efecto de diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* en la germinación de semillas de *L. multiflorum*.

■ *B. salicifolia* MeOH   ● *B. salicifolia* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>   ▲ *B. conferta* MeOH   ▼ *B. conferta* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

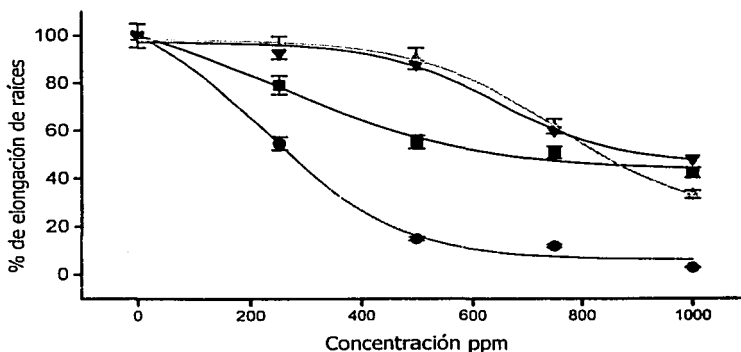


Tabla 5.

Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum* con los diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i> en Metanol Diclorometano			
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	79.23	3.9615	54.61	2.7305
500	55.19	2.7595	15	0.75
750	50.76	2.538	12	0.6
1000	42.3	2.115	3	0.15

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> con los extractos de <i>B. conferta</i> en Metanol Diclorometano			
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	95	4.75	92.69	4.6345
500	90.3	4.515	87.88	4.394
750	61.73	3.0865	60	3
1000	33.26	1.663	48	2.4



Gráfica 5. Efecto de diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* en la elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum*

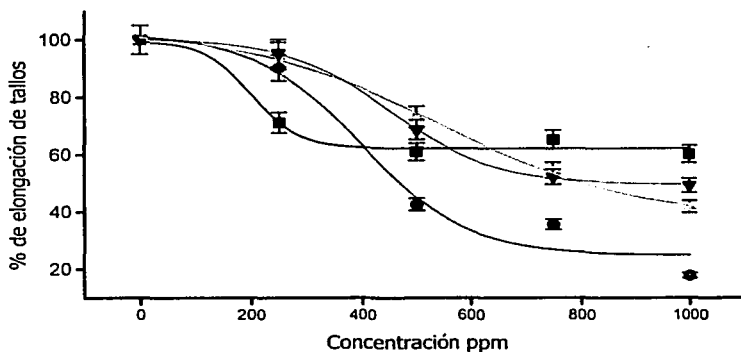
■ *B. salicifolia* MeOH ● *B. salicifolia* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ▲ *B. conferta* MeOH ▼ *B. conferta* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Tabla 6.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. multiflorum* con los diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. multiflorum</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	71.21	3.5605	90.2	4.51
500	61.12	3.056	42.72	2.136
750	65.28	3.264	35.6	1.78
1000	60.23	3.0115	17.8	0.89

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. multiflorum</i> con los extractos de <i>B. salicifolia</i> en			
	Metanol		Diclorometano	
	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5
250	94.36	4.718	95.25	4.7625
500	73.29	3.6645	68.84	3.442
750	54.59	2.7295	52.22	2.611
1000	41.83	2.0915	49.25	2.4625



Gráfica 6. Efecto de diferentes extractos de *B. salicifolia* y *B. conferta* en la elongación del tallo de las plántulas de *L. multiflorum*

■ *B. salicifolia* MeOH ● *B. salicifolia* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ▲ *B. conferta* MeOH ▼ *B. conferta* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

## **6.4 Ensayo biológico a 1000 ppm con las fracciones obtenidas de *B. salicifolia* en diclorometano y *B. conferta* en metanol.**

Con cada una de las fracciones mostradas en los cuadros VI y VII se realizó el ensayo biológico mencionado anteriormente, pero en este caso solamente a la concentración de 1000 ppm, para descartar fracciones que no mostraron actividad inhibitoria significativa; es decir, un desarrollo menor al 50 % con respecto al control. Es importante mencionar que también se consideraron para el posterior ensayo las fracciones que presentaron un desarrollo aproximado del 50 al 65%.

### **6.4.1 Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* a 1000 ppm sobre la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. sativa*.**

#### Germinación *L. sativa*.

Se observó que las semillas puestas en contacto con las fracciones 69 – 74 y 87 – 88, presentaron una germinación menor al 50% seguidas en orden decreciente, por las fracciones 61 – 68 y 79 – 86 en las cuales se presentó una germinación entre el 50 y 60% (Tabla 7 y gráfica 7).

#### Elongación de raíz y tallo de *L. sativa*.

En el desarrollo de la elongación de la raíz se vio un desarrollo menor al 50%, al exponerse a la fracción 87-88, seguidas por 69 – 74 (51%), 44 – 60 (61%) y 79 – 86 (63%). (Tabla 8 y gráfica 8).

En la elongación del tallo las fracciones 69 – 74 y 87 - 88 presentaron un efecto del 49 % seguidas por las fracciones 61 – 68 (52%) y 44 – 60 (59%) (Tabla 9 y gráfica 9).

#### **6.4.2 Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. multiflorum*.**

##### Germinación *L. multiflorum*.

En la germinación de semillas de *L. multiflorum*, con las fracciones 69 – 74 y 87 – 88, se observó un desarrollo del 47% seguida por las fracciones 79 – 86 con un 56%, 61 – 68 con un 62% y 44 – 60 con un desarrollo del 63% (Tabla 10 y gráfica 10).

##### Elongación raíz y tallo *L. multiflorum*.

En la elongación de la raíz se vio que la fracción 69 – 74 presentó efecto menor en el desarrollo, con un 39% de elongación, seguida por las fracciones 79 – 86 y 44 – 60 con un 48%, 87 – 88 con un 53% y la 28 – 34 con un 54% de elongación (Tabla 11 y gráfica 11).

En la elongación del tallo la fracción que presentó mayor efecto fue la 87 – 88 con un desarrollo del 37% seguida por las fracciones 69 – 74 (48%), la 61 – 68 (52%), la 79 – 86 (57%) y la 44 – 60 con un 58% de elongación. (Tabla 12 y gráfica 12).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la inhibición de la germinación y elongación de raíz y tallo de las dos semillas empleadas como modelo de semillas monocotiledóneas y dicotiledóneas, se decidió analizar las fracciones 44 – 60, 61 – 68, 69 – 74, 79 – 86 y 87 – 88 por medio del análisis biológico secundario a 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm, para determinar a partir de estas fracciones el o los compuesto que le confieren esa actividad inhibitoria.

### **6.4.3 Efecto de las fracciones de *B. conferta* en metanol en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. sativa*.**

#### Germinación *L. sativa*.

Se observó que la fracción que presentó mayor efecto fue la 31 – 34, con una germinación del 29%, seguida en orden decreciente por las fracciones 55 – 59 (43%), 60 – 69 (47%), 21 – 26 (54%) y por último la 88 – 89 con un 56% de desarrollo. (Tabla 13 y gráfica 13).

#### Elongación raíz y tallo *L. sativa*.

En la elongación de la raíz de *L. sativa* se observó que las fracciones que presentaron mayor efecto fueron la 88 – 89 y 55 – 59 con un desarrollo del 41% y de 42% respectivamente, seguidas por las fracciones 31 – 34 (49%), 21 – 26 (53%), 60 – 69 (59%) y por último la 34 – 44 con un 64% de desarrollo (Tabla 14 y gráfica 14).

En la elongación del tallo se observó que la fracción que presentó mayor efecto fue la 31 – 34 (37%) seguida por la 55- 59 (46%) y en orden creciente la 21 – 26 (49%), 88 – 89 (52%), 35 – 44 (54%) y por último la 60 – 69 (56% de elongación) (Tabla 15 y gráfica 15).

### **6.4.4 Efecto de las fracciones de *B. conferta* en metanol en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. multiflorum*.**

#### Germinación *L. multiflorum*.

En la germinación de las semillas de pasto se observó que hay un mayor número de fracciones que tuvieron un efecto significativo, en orden creciente de germinación se observó que la fracción que presentó mayor efecto fue la 31 – 34

(23%), seguida por las fracciones 60 – 69 (47%), 21 – 26 (50%), 88 – 89 (51%), 55 – 59 (63 %) y por último la fracción 27 – 30, y 85 – 87 presentando las dos últimas el mismo porcentaje de germinación (65%) (Tabla 16 y gráfica 16)

#### Elongación de raíz y tallo de *L. multiflorum*.

Con respecto al desarrollo de la raíz en orden decreciente de elongación la fracción que tuvo mayor efecto fue la 31 – 34 (39%) seguida por las 55 – 59 (41%), 88 – 89 (42%), 21 – 26 (47%), 60 – 69 (57%), 79 – 84 (59%), 85 – 87 (60%) y 35 – 44 (61%) (Tabla 17 y gráfica 17).

En la elongación del tallo se observó que la fracción que presentó mayor efecto fue la 31 – 34 con 28% seguida por las fracciones 88 – 99 ( 39%), la 55 – 59 (48%) y la 35 – 44 con un 53% de elongación. (Tabla 18 y gráfica 18)

De acuerdo a los resultados obtenidos en la inhibición de la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas se decidió analizar las fracciones 21 – 26, 31 – 34, 35 – 44, 55 – 59, 60 – 69 y 88 – 89 de *B. conferta* por medio del análisis biológico secundario a 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm, para determinar a partir de estas fracciones la subfracción o subfracciones y el o los compuesto que le confieren esa actividad inhibitoria, se eligieron las fracciones que presentaron una inhibición que dosis respuesta creciente.

Cuadro VIII. Fracciones seleccionadas de la especie *B. salicifolia* en extracto de diclorometano

Fracciones de <i>B. salicifolia</i> en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
44 – 60
61 – 68
69 – 74
79 – 86
87 – 88

Cuadro IX. Fracciones seleccionadas de la especie *B. conferta* en extracto de metanol

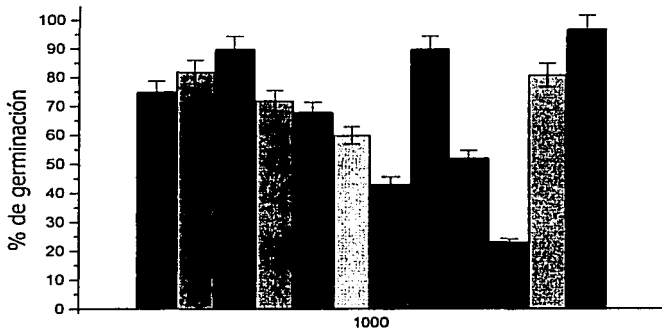
Fracciones de <i>B. conferta</i> en MeOH
21 – 26
31 – 34
35 – 44
55 – 59
60 – 69
88 – 89

Tabla 7.

Porcentaje de germinación de las semillas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano a 1000 ppm.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. sativa</i> fracciones											
	1-11		12-27		28-34		35-43		44-60		61-68	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	75	3.75	82	4.1	90	4.5	72	3.6	68	3.4	60	3

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. sativa</i> fracciones											
	69-74		75-78		79-86		87-88		89-116		117-131	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	43	2.65	90	4.5	52	2.6	23	1.15	81	4.05	97	4.85



Gráfica 7. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la germinación de las semillas de *L. sativa*

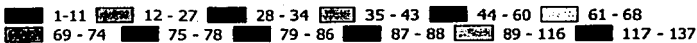


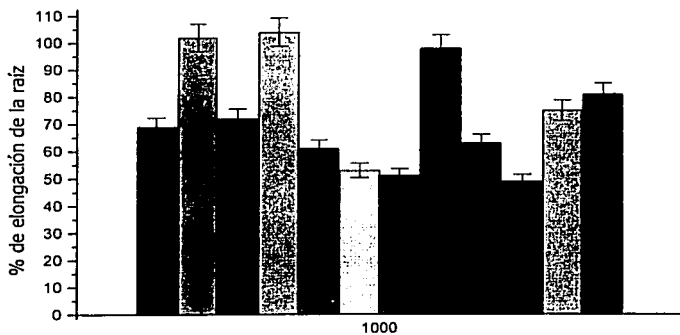


Tabla 8.

Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano a 1000 ppm.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. sativa</i> fracciones											
	1-11		12-27		28-34		35-43		44-60		61-68	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	69	3.45	102	5.1	72	3.6	104	5.2	61	3.05	53	2.65

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. sativa</i> Fracciones											
	69-74		75-78		79-86		87-88		89-116		117-131	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	51	2.55	98	4.9	63	3.15	49	2.45	75	3.75	81	4.05



Gráfica 8. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación de la raíz de las plántulas de de *L. sativa*

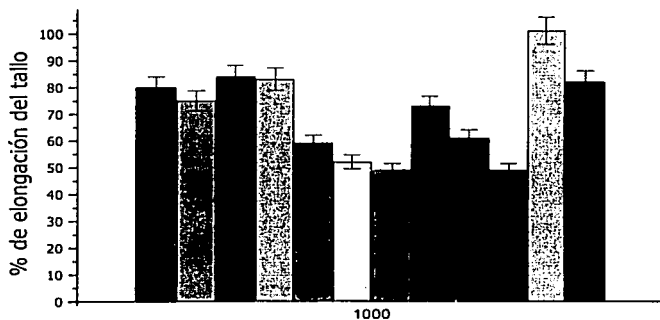
1-11  
  12-27  
  28-34  
  35-43  
  44-60  
  61-68  
 69-74  
 75-78  
 79-86  
 87-88  
 89-116  
 117-131

Tabla 9.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano a 1000 ppm.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i> fracciones											
	1-11		12-27		28-34		35-43		44-60		61-68	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	80	4	75	3.75	84	4.2	83	4.15	59	2.95	52	2.6

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i> fracciones											
	69-74		75-78		79-86		87-88		89-116		117-131	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	49	2.45	73	3.65	61	3.05	49	2.45	101	5.05	82	4.1



Gráfica 9. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa*

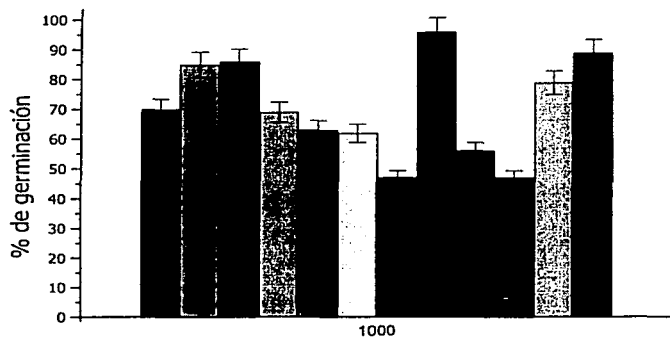
1-11
  12-27
  28-34
  35-43
  44-60
  61-68

69-74
  75-78
  79-86
  87-88
  89-116
  117-131

Tabla 10.  
Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano a 1000 ppm.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	1-11		12-27		28-34		35-43		44-60		61-68	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	70	3.5	85	4.25	86	4.3	69	3.45	63	3.15	62	3.1

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	69-74		75-78		79-86		87-88		89-116		117-131	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	47	2.35	96	4.8	56	2.8	47	2.35	79	3.95	89	4.45



Gráfica 10. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la germinación de las semillas de *L. multiflorum*

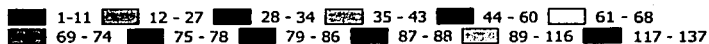
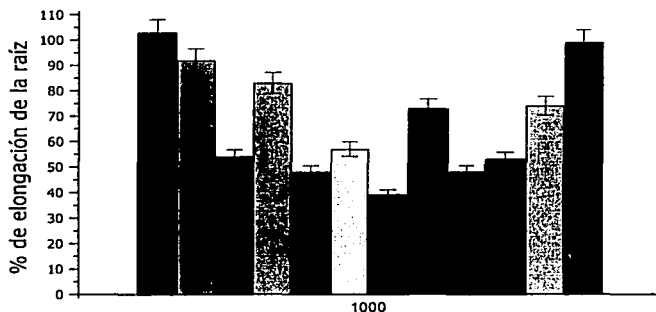


Tabla 11.

Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano a 1000 ppm.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	1-11		12-27		28-34		35-43		44-60		61-68	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	103	5.15	92	4.6	54	2.7	83	4.15	48	2.4	57	2.85

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	69-74		75-78		79-86		87-88		89-116		117-131	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	39	1.95	73	3.65	48	2.4	53	2.65	74	3.7	99	4.95



Gráfica 11. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum*

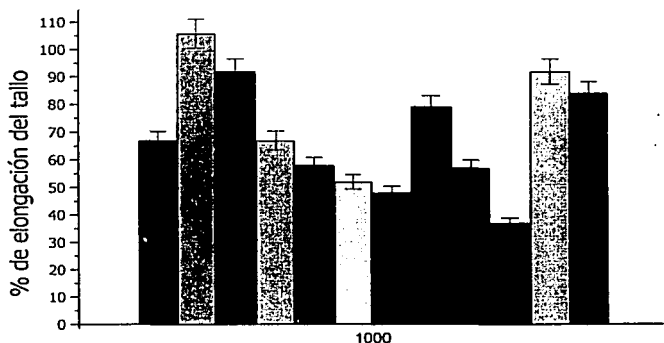
1-11
  12-27
  28-34
  35-43
  44-60
  61-68
  69-74
  75-78
  79-86
  87-88
  89-116
  117-137

Tabla 12.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano a 1000 ppm.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	1-11		12-27		28-34		35-43		44-60		61-68	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	67	3.35	106	5.3	92	4.6	67	3.35	58	2.9	52	2.6

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	69-74		75-78		79-86		87-88		89-116		117-131	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	48	2.4	79	3.95	57	2.85	37	1.85	92	4.6	84	4.2



Gráfica 12. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación del tallo de las plántulas de *L. multiflorum*

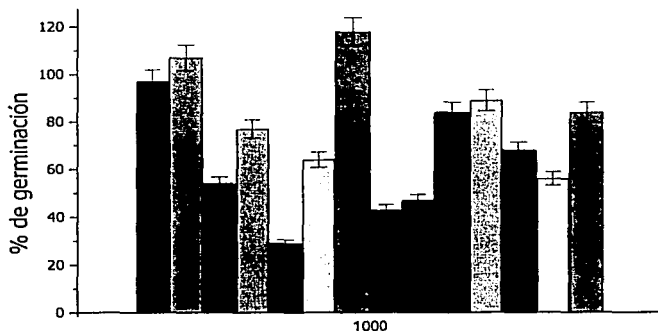
1-11  
  12-27  
  28-34  
  35-43  
  44-60  
  61-68  
 69-74  
 75-78  
 79-86  
 87-88  
 89-116  
 117-131

Tabla 13.

Porcentaje de germinación de las semillas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en metanol a 1000 ppm.

Conc. ppm	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> fracciones													
	1 - 8		9 - 20		21 - 26		27 - 30		31 - 34		35 - 44		45 - 54	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	97	4.85	107	5.35	54	2.7	77	3.85	29	1.45	64	3.2	118	5.9

Conc. ppm	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> fracciones													
	55 - 59		60 - 69		70 - 78		79 - 84		85 - 87		88 - 99		100-113	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	43	2.15	47	2.35	84	4.2	89	4.45	68	3.4	56	2.8	84	4.2



Gráfica 13. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. conferta* del extracto en MeOH en la germinación de las semillas de *L. sativa*

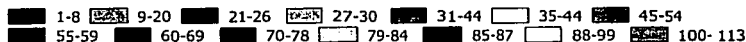
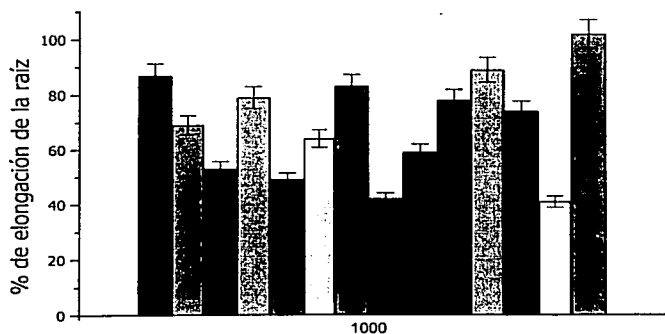


Tabla 14.  
 Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en metanol a 1000 ppm.

Conc. ppm	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. sativa</i>													
	Fracciones													
	1 - 8		9 - 20		21 - 26		27 - 30		31 - 34		35 - 44		45 - 54	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	87	4.35	69	3.45	53	2.65	79	3.95	49	2.45	64	3.2	83	4.15

Conc. ppm	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. sativa</i>													
	Fracciones													
	55 - 59		60 - 69		70 - 78		79 - 84		85 - 87		88 - 99		100-113	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	42	2.1	59	2.95	78	3.9	89	4.45	74	3.7	41	2.05	102	5.1



Gráfica 14. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa*

1-8
  9-14
  21-26
  27-30
  31-44
  35-44
  45-54

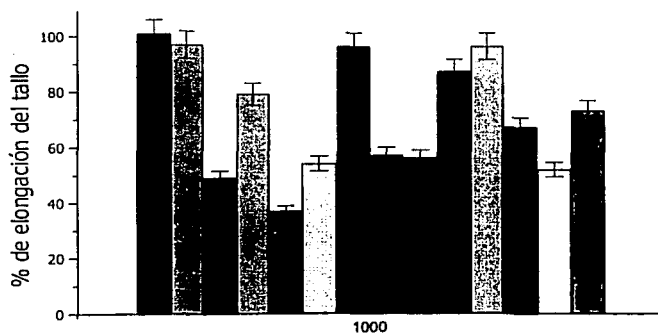
55-59
  60-69
  70-78
  79-84
  85-87
  88-99
  100-113

Tabla 15.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en metanol a 1000 ppm.

Conc. ppm	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i>													
	Fracciones													
	1 - 8		9 - 20		21 - 26		27 - 30		31 - 34		35 - 44		45 - 54	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	101	5.05	97	4.85	49	2.45	79	3.95	37	1.85	54	2.7	96	4.8

Conc. ppm	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i>													
	Fracciones													
	55 - 59		60 - 69		70 - 78		79 - 84		85 - 87		88 - 99		100-113	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	46	2.3	56	2.8	87	4.35	96	4.8	67	3.35	52	2.6	73	3.65



Gráfica 15. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa*

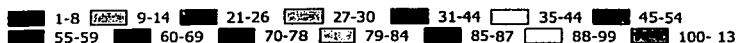




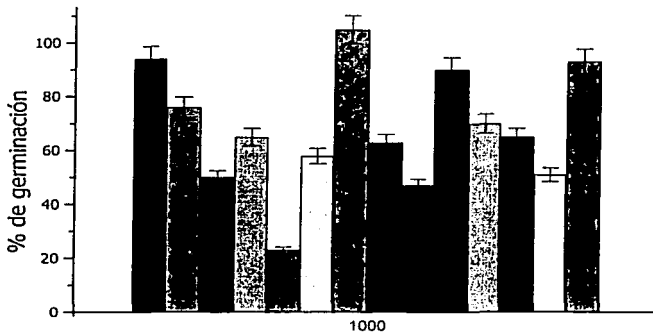
Tabla 16.

Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en metanol a 1000 ppm.

Conc. ppm	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> .													
	Fracciones													
	1 - 8		9 - 20		21 - 26		27 - 30		31 - 34		35 - 44		45 - 54	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	94	4.7	76	3.8	50	2.5	65	3.25	23	1.15	58	2.9	105	5.25

Conc. ppm	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> .													
	Fracciones													
	55 - 59		60 - 69		70 - 78		79 - 84		85 - 87		88 - 99		100-113	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	63	3.15	47	2.35	90	4.5	70	3.5	65	3.25	51	2.55	93	4.65



Gráfica 16. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. conferta* del extracto en MeOH en la germinación de las semillas de *L. multiflorum*

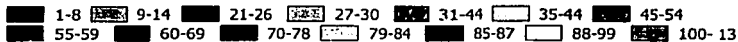
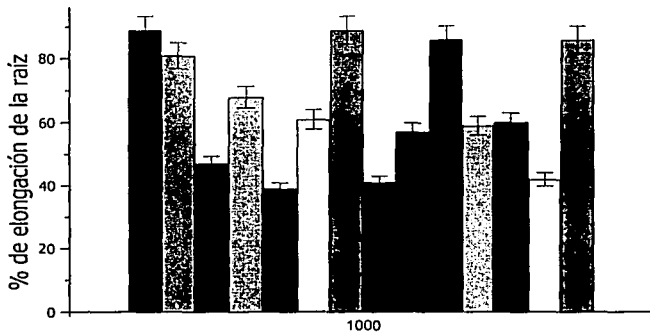


Tabla 17.

Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en metanol a 1000 ppm.

Conc. ppm	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones													
	1 - 8		9 - 20		21 - 26		27 - 30		31 - 34		35 - 44		45 - 54	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	89	4.45	81	4.05	47	2.35	68	3.4	39	1.95	61	3.05	89	4.45

Conc. ppm	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones													
	55 - 59		60 - 69		70 - 78		79 - 84		85 - 87		88 - 99		100-113	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	41	2.05	57	2.85	86	4.3	59	2.95	60	3	42	2.1	86	4.3



Gráfica 17. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum*

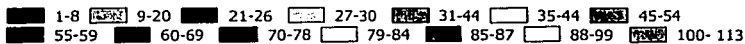
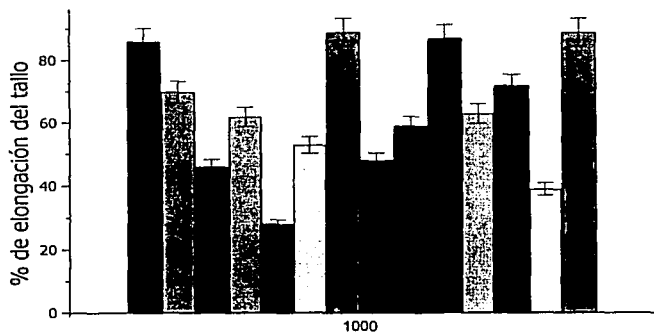


Tabla 18.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en metanol a 1000 ppm.

Conc. ppm	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones													
	1 - 8		9 - 20		21 - 26		27 - 30		31 - 34		35 - 44		45 - 54	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	86	4.3	70	3.5	46	2.3	62	3.1	28	1.4	53	2.65	89	4.45

Conc. ppm	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones													
	55 - 59		60 - 69		70 - 78		79 - 84		85 - 87		88 - 99		100-113	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
1000	48	2.4	59	2.95	87	4.35	63	3.15	72	3.6	39	1.95	89	4.45



Gráfica 18. Efecto de las fracciones a 1000 ppm de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación del tallo de las plántulas de *L. multiflorum*

■ 1-8 ■ 9-20 ■ 21-26 ■ 27-30 ■ 31-34 □ 35-44 ■ 45-54  
 ■ 55-59 ■ 60-69 ■ 70-78 ■ 79-84 ■ 85-87 □ 88-99 ■ 100-113

## **6.5 Ensayo biológico secundario (50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm) de las fracciones mostradas en el cuadro VIII de *B. salicifolia* en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y el cuadro IX de *B. conferta* en MeOH.**

Con cada una de las fracciones mostradas en los cuadros VIII y IX que se consideraron activas se realizó el ensayo biológico midiendo su efecto sobre la germinación de semillas y desarrollo de raíz y tallo de plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum* respectivamente. Se optó por tomar las que presentaron un efecto gradual de dosis respuesta, es decir, conforme aumenta la concentración aumenta el efecto, este criterio se tomo de acuerdo a los resultados observados en diversos estudios de actividad alelopática frente a la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas. (Céspedes et al., 2001; Macías et al., 1999 (b), Macías et al., 2000).

### **6.5.1 Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. sativa*.**

#### Germinación *L. sativa* (fracciones).

Se observó en la germinación de *L. sativa* que la fracción 87 – 88 presentó un efecto gradual llegando a una inhibición del 30% a 1000 ppm, con una CI<sub>50</sub> de 638 ppm, seguida por la fracción 69-74 con una CI<sub>50</sub> de 753 ppm y un porcentaje de germinación del 38 % a 1000 ppm, la fracción 79 – 86 presentó una CI<sub>50</sub> de 942 ppm, las otras fracciones estudiadas no presentaron un desarrollo menor al 50%. (Cuadro IX, tabla 19 y gráfica 19).

#### Elongación de raíz y tallo *L. sativa* (fracciones).

En cuanto a la elongación de la raíz la única fracción de la que se obtuvo una CI<sub>50</sub> es 87–88 con un valor de 920 ppm y un porcentaje de elongación del 48

% a 1000 ppm, con respecto a la fracción 69 – 74 la cual presentó un incremento en la elongación a 100 ppm al igual que la fracción 44- 60, con respecto a la fracción 79 - 86 esta presentó un decremento en el desarrollo a 100 y 250 ppm y aumentando ligeramente a las siguientes concentraciones. (Cuadro IX, tabla 20 y gráfica 20)

En la elongación del tallo la fracción que siguió presentando un efecto gradual fue la 87 – 88 con una  $CI_{50}$  de 508 ppm y un porcentaje de elongación del 38 % a 1000 ppm, le siguió la fracción 69 – 74 con una  $CI_{50}$  de 836 ppm, en cuanto a la fracción 44 – 60 ésta presentó una estimulación en el desarrollo de la raíz a 250 ppm observando un porcentaje de elongación del 106%, en cuanto a las demás fracciones no se obtuvo una  $CI_{50}$ . (Cuadro IX, tabla 21 y gráfica 21).

### **6.5.2 Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. multiflorum*.**

#### Germinación *L. multiflorum* (fracciones).

En la germinación de las semillas de *L. multiflorum* con la fracción 87 – 88 se obtuvo una  $CI_{50}$  de 774 ppm y un porcentaje de germinación del 42 % a 1000 ppm, seguida por la fracción 69 – 74 con un porcentaje de germinación del 43 % y una  $CI_{50}$  de 831 ppm, en cuanto a las demás fracciones, estas presentaron un efecto irregular sin presentarse una germinación menor al 50% con respecto al control. (Cuadro IX, tabla 22 y gráfica 22)

#### Elongación raíz y tallo *L. multiflorum* (fracciones).

En la elongación de raíz de las plántulas con la fracción que se obtuvo una  $CI_{50}$  menor fue con la 69 – 74 con una  $CI_{50}$  de 706 y un porcentaje de elongación del 45% a 1000 ppm, seguida de la fracción 87 – 88 con una  $CI_{50}$  de 740 ppm y

un porcentaje de desarrollo de 42 % a 1000 ppm. (Cuadro IX, tabla 23 y gráfica 23).

En cuanto al desarrollo de los tallos de las plántulas la fracción 87 – 88 siguió presentando mayor efecto inhibitorio, el cual aumenta con respecto a la concentración observándose una  $CI_{50}$  592 ppm y una elongación del tallo menor al 50% a 750 ppm, seguida de nuevo por la fracción 69 – 74 con una  $IC_{50}$  de 910 ppm y un porcentaje de elongación del 45% a 1000 ppm, las demás fracciones presentaron en este caso un efecto gradual, pero sin ser menor al 50% de elongación. (Cuadro IX, tabla 24 y gráfica 24).

### **6.5.3 Efecto de las fracciones de *B. conferta* en metanol en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. sativa*.**

#### Germinación *L. sativa* (fracciones).

En la germinación de las semillas de *L. sativa* se observó que la fracción 31 – 34 presentó el efecto más significativo, con una inhibición gradual y un porcentaje de germinación del 32% a 1000 ppm con una  $CI_{50}$  de 672 ppm, en cuanto a la fracción 88 – 89 y 60 – 69 estas presentaron una germinación similar a 1000 ppm (32%), pero la fracción 88 – 89 mostró una mayor inhibición a menores concentraciones. (Cuadro X, tabla 25 y gráfica 25).

#### Elongación de raíz y tallo *L. sativa* (fracciones).

En este caso la fracción que presentó mayor efecto fue la 88 – 89, ya que se observó un porcentaje de elongación radicular del 68% a 50 ppm y se mantuvo con pocos cambios hasta 500 ppm con un 65% de elongación obteniéndose una elongación del 46% a 1000 ppm y con una  $CI_{50}$  de 905 ppm, con la fracción 55 – 59 se observó un efecto insignificante con un aumento del 117% en la elongación de la raíz a 50 ppm, con respecto a las fracciones 21 – 26, 31 – 34, 34 – 44 y la 60

– 69 se presentó un efecto muy similar sin que se observara una elongación menor al 50%. (Cuadro X, tabla 26 y gráfica 26).

En la elongación del tallo de las plántulas se observó que la fracción que tuvo mayor efecto fue la 31 – 34 con la cual se presentó un efecto gradual y un porcentaje de elongación de 32% a 1000 ppm y una  $CI_{50}$  de 580 ppm, la siguiente fracción que presentó una  $CI_{50}$  fue la 88 – 89 con un valor de 864 ppm y un porcentaje de germinación de 42% a 1000 ppm, en cuanto a las demás fracciones estas presentaron un efecto gradual, pero sin llegar a una elongación menor al 50%. (Cuadro X, tabla 27 y gráfica 27).

#### **6.5.4 Efecto de las fracciones de *B. conferta* en metanol en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas *L. multiflorum*.**

##### Germinación *L. multiflorum* (fracciones)

En la germinación de las semillas de *L. multiflorum* la fracción que presentó un efecto más significativo fue la 31 – 34 con una  $CI_{50}$  de 590 ppm y un porcentaje de germinación de 27% a 1000 ppm, las fracciones de las que también se obtuvo una  $CI_{50}$  fueron la 21 – 26 con un valor de 809 ppm, 55 – 59 con un valor de 780 ppm y 88 – 89 con un valor de 960 ppm, en el caso de la fracción 35 – 44 esta presentó una estimulación en la germinación a 50 ppm con un porcentaje del 105%. (Cuadro X, tabla 28 y gráfica 28).

##### Elongación raíz y tallo *L. multiflorum* (fracciones).

En la elongación de la raíz de la fracción que presentó el efecto más significativo fue la 88 – 89 con una  $CI_{50}$  de 796 ppm y un porcentaje de elongación del 42% a 1000 ppm seguida por la fracción 31 – 34 con una  $CI_{50}$  de 998 ppm y un desarrollo del 49% a 1000 ppm, en cuanto a las demás fracciones estas presentaron un efecto similar sin alcanzar un desarrollo menor al 50%, con

respecto a la fracción 55 – 59 ésta presentó un efecto estimulante a 50 ppm con un valor de 127% observando este mismo efecto a 500 ppm con una estimulación del 104% con respecto al control. (Cuadro X, tabla 29 y gráfica 29).

En cuanto a la elongación del tallo la fracción que presentó un efecto más significativo fue la 21 – 26 con un porcentaje de desarrollo del 15 % a 1000 ppm y una  $CI_{50}$  de 745 ppm, la fracción 31 – 34 presentó una  $CI_{50}$  de 711 ppm, 35 – 44 con un valor de 660 ppm, y 88 – 89 con un valor de 641 ppm. (Cuadro X, tabla 30 y gráfica 30).

Cuadro X.  $CI_{50}$  de las fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano sobre la germinación de semillas y elongación de plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum*.

Fracción	$CI_{50}$ en ppm					
	<i>L. sativa</i>			<i>L. multiflorum</i>		
	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo
44 – 60	-	-	-	-	-	-
61 – 68	-	-	-	-	-	-
69 – 74	753	-	836	831	706	910
79 – 86	942	-	-	-	-	-
87 – 88	638	920	508	774.34	740	592

Cuadro XI.  $CI_{50}$  de las fracciones de *B. conferta* en metanol sobre la germinación de semillas y elongación de plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum*.

Fracción	$CI_{50}$ en ppm					
	<i>L. sativa</i>			<i>L. multiflorum</i>		
	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo
21 – 26	-	-	-	809	1000	745
31 – 34	672	-	580	590	998	711
35 – 44	-	-	-	-	-	660
55 – 59	-	-	-	-	-	1000
60 – 69	-	-	-	780	-	-
88 – 89	1000	905	864	964	796	641



Al comparar las  $CI_{50}$  de los efectos de algunas fracciones reportadas para otras especies (cuadro II) y con las obtenidas experimentalmente sobre la germinación de las semillas y la elongación de raíces y tallos de las plántulas de *L. multiflorum* y *L. sativa* (cuadro IX y X), se observó que estas últimas fueron altas; pero, tomando en consideración que las  $CI_{50}$  obtenidos de los extractos también fueron altas (cuadro V), se prosiguió con el ensayo de las placas bioautográficas (pág. 79) de las fracciones que mostraron mayor actividad (cuadro XII).

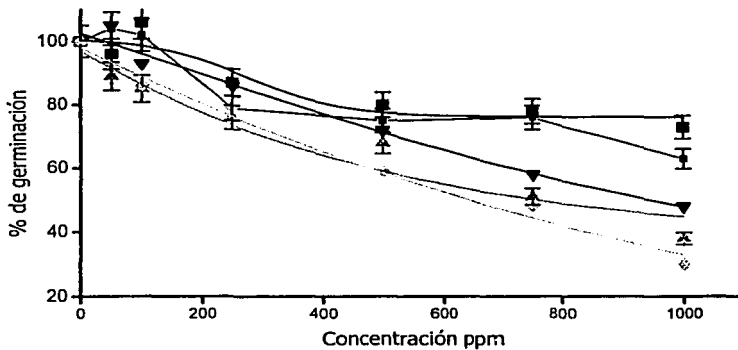
Cuadro XII. Fracciones que presentaron mayor efecto sobre la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. multiflorum* y *L. sativa*.

<i>B. salicifolia</i>	<i>B. conferta</i>
fracciones	fracciones
44 - 60	21 - 26
69 - 74	31 - 34
87 - 88	88 - 89

Tabla 19.

Porcentaje de germinación de las semillas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. sativa</i> fracciones									
	44 - 60		61 - 68		69 - 74		79 - 86		87-88	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	96	4.8	104	5.2	89	4.45	105	5.25	93	4.65
100	106	5.3	102	5.1	85	4.25	93	4.65	86	4.3
250	87	4.35	79	3.95	76	3.8	86	4.3	79	3.95
500	80	4	75	3.75	68	3.4	72	3.6	59	2.95
750	78	3.9	76	3.8	51	2.55	58	2.9	48	2.4
1000	73	3.65	63	3.15	38	1.9	48	2.4	30	1.5

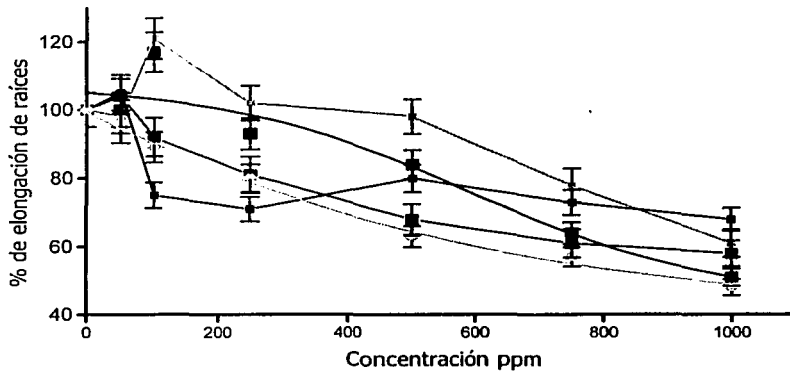


Gráfica 19. Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la germinación de las semillas de *L. sativa*

Fraciones: ■ 44 - 60 —■— 61 - 68 ▲ 69 - 74 ▼ 79 - 86 ◆ 87 - 88

Tabla 20.  
Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa* con diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. sativa</i> fracciones									
	44 - 60		61 - 68		69 - 74		79 - 86		87-88	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	100	5	104	5.2	98	4.9	105	5.25	95	4.75
100	117	5.85	92	5.65	121	6.05	75	3.75	89	4.45
250	93	4.65	81	5.3	102	5.1	71	3.55	80	4
500	84	4.2	68	4.55	98	5.05	80	4	63	3.15
750	64	3.2	61	4.15	78	4.9	73	3.65	57	2.85
1000	51	2.55	58	3.8	61	4.05	68	3.4	48	2.4

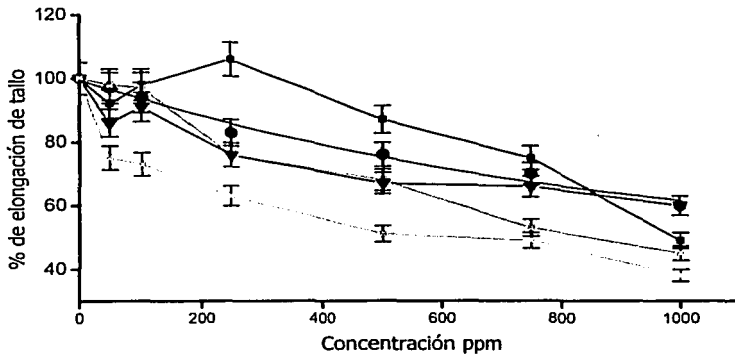


Gráfica 20. Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa*

Fracciones: ■ 44 - 60 —■— 61 - 68 —■— 69 - 74 —■— 79 - 86 —■— 87 - 88

Tabla 21.  
Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa* con diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i> fracciones									
	44 - 60		61 - 68		69 - 74		79 - 86		87-88	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	92	4.6	97	4.85	98	4.9	86	4.3	75	3.75
100	98	4.9	94	4.7	97	4.85	91	4.55	73	3.65
250	106	5.3	83	4.15	76	3.8	76	3.8	63	3.15
500	87	4.35	76	3.8	68	3.4	67	3.35	51	2.55
750	75	3.75	70	3.5	53	2.65	66	3.3	49	2.45
1000	49	2.45	60	3	45	1.3	60	3	38	1.9



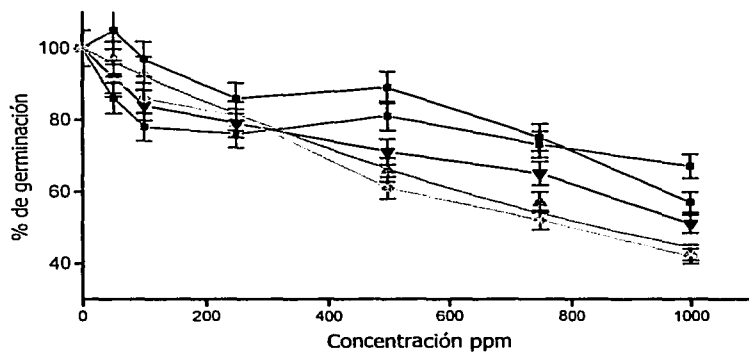
Gráfica 21. Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa*

Fracciones: —■— 44 - 60    ● 61 - 68    —■— 69 - 74    ▼ 79 - 86    - - - 87 - 88

Tabla 22.

Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> fracciones									
	44 - 60		61 - 68		69 - 74		79 - 86		87-88	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	105	5.25	86	4.3	97	4.85	92	4.6	91	4.55
100	97	4.85	78	3.9	93	4.65	84	4.2	86	4.3
250	86	4.3	76	3.8	79	3.95	79	3.95	81	4.05
500	89	4.45	81	4.05	66	3.3	71	3.55	61	3.05
750	75	3.75	73	3.65	57	2.85	65	3.25	52	2.6
1000	57	2.85	67	3.35	43	2.15	51	2.55	42	2.1

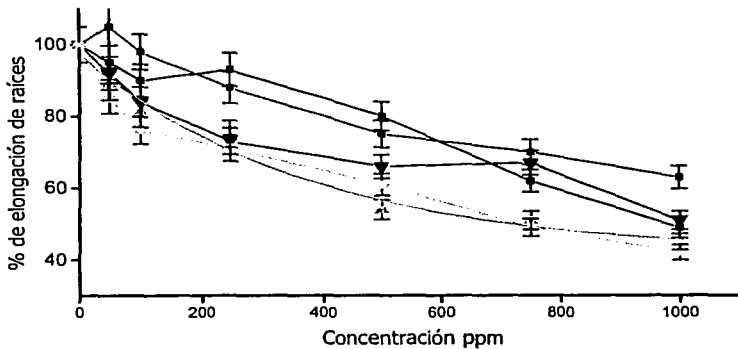


Gráfica 22. Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la germinación de las semillas de *L. multiflorum*

Fracciones: —■— 44 - 60 —■— 61 - 68 ▲ 69 - 74 —▼— 79 - 86 —◇— 87 - 88

Tabla 23.  
Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum* con diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones									
	44 - 60		61 - 68		69 - 74		79 - 86		87-88	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	95	4.75	105	5.25	89	4.45	92	4.6	85	4.25
100	90	4.5	98	4.9	81	4.05	84	4.2	76	3.8
250	93	4.65	88	4.4	75	3.75	73	3.65	71	3.55
500	80	4	75	3.75	54	2.7	66	3.3	61	3.05
750	62	3.1	70	3.5	51	2.55	67	3.35	49	2.45
1000	49	3	63	3.15	45	2.25	51	2.55	42	2.1



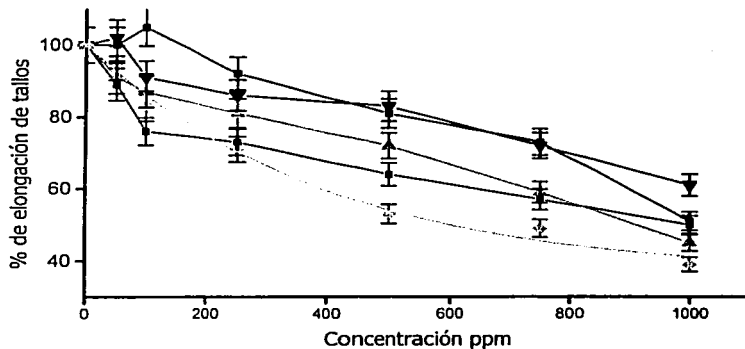
Gráfica 23. Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum*

Fracciones: —■— 44 - 60 —□— 61 - 68 ▲ 69 - 74 —▼— 79 - 86 —○— 87 - 88

Tabla 24.

Porcentaje de elongación del tallo de las plátulas de *L. multiflorum* con diferentes fracciones de *B. salicifolia* en diclorometano

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. multiflorum</i> fracciones									
	44 - 60		61 - 68		69 - 74		79 - 86		87-88	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	100	5	89	4.45	91	4.55	102	5.1	95	4.75
100	105	5.25	76	3.8	87	4.35	91	4.55	83	4.15
250	92	4.6	73	3.65	81	4.05	86	4.3	71	3.55
500	81	4.05	64	3.2	72	3.6	83	4.15	53	2.65
750	73	3.65	57	2.85	59	2.95	72	3.6	49	2.45
1000	51	2.55	50	2.5	45	2.25	61	3.05	39	1.95

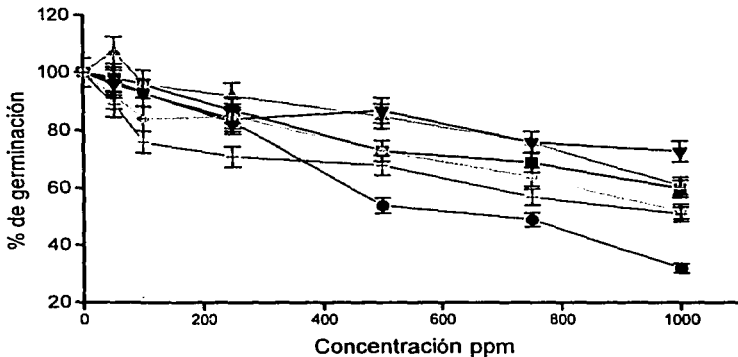


Gráfica 24. Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la elongación del tallo de las plátulas de *L. multiflorum*

Fracciones: —■— 44 - 60 —■— 61 - 68 —▲— 69 - 74 —▼— 69 - 74 —●— 79 - 86

Tabla 25.  
Porcentaje de germinación de las semillas de *L. sativa* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en metanol.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. sativa</i> fracciones											
	21 - 26		31 - 34		35 - 44		55 - 59		60 - 69		88 - 89	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	98	4.9	97	4.85	107	5.35	96	4.8	92	4.6	89	4.45
100	96	4.8	93	4.65	96	4.8	93	4.65	84	4.2	76	3.8
250	87	4.35	83	4.15	92	4.6	84	4.2	85	4.25	71	3.55
500	73	3.65	54	2.7	85	4.25	87	4.35	73	3.65	68	3.4
750	69	3.45	49	2.45	76	3.8	76	3.8	64	3.2	57	2.85
1000	60	3	32	1.6	61	3.05	73	3.65	52	2.6	51	2.55



Gráfica 25. Efecto de diferentes fracciones de *B. conferta* del extracto en MeOH en la germinación de las semillas de *L. sativa*

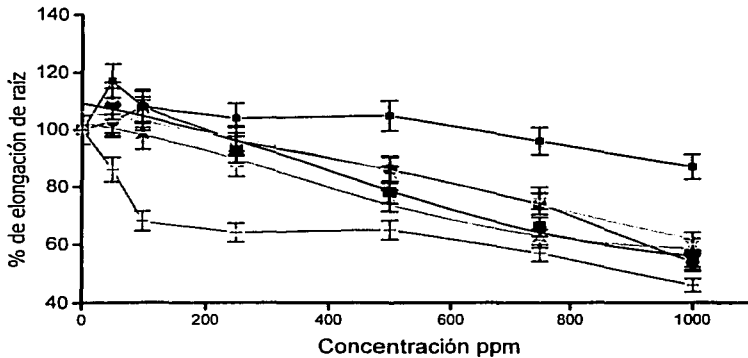
Fracciones: ■ - 21 ● - 31 - 34 ▲ - 35 - 44 ▼ - 55 - 59 ◊ - 60 - 69 +- - 91



Tabla 26.

Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa* con las fracciones de *B. conferta* en metanol

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación la raíz de <i>L. sativa</i> fracciones											
	21 - 26		31 - 34		35 - 44		55 - 59		60 - 69		88 - 89	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	109	5.43	103	5.15	104	5.2	117	5.85	111	5.55	86	4.3
100	106	5.3	108	5.4	98	4.9	108	5.4	105	5.25	68	3.4
250	93	4.65	96	4.8	88	4.4	104	5.2	96	4.8	64	3.2
500	78	3.9	86	4.3	75	3.75	105	5.25	83	4.15	65	3.25
750	66	3.3	74	3.7	62	3.1	96	4.8	76	3.8	57	2.85
1000	55	2.75	54	2.7	59	2.95	87	4.35	61	3.05	46	2.3



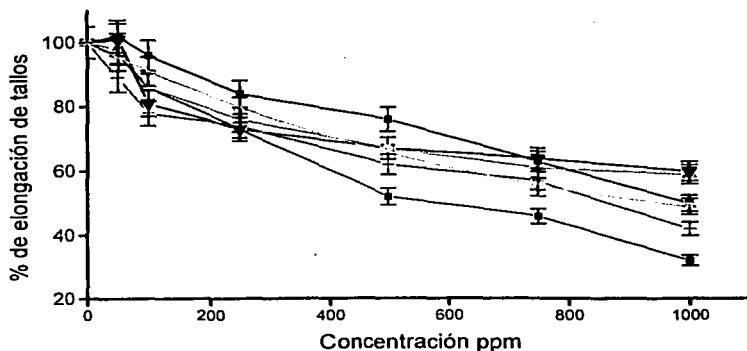
Gráfica 26. Efecto de diferentes fracciones de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación de la raíz de las plántulas de *L. sativa*

Fracciones: ■ 21 - 26 ● 31 - 34 ▲ 35 - 44 ■ 55 - 59 ◆ 60 - 69 +- 88 - 99

Tabla 27.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa* con las fracciones de *B. conferta* en metanol

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación del tallo de <i>L. sativa</i> fracciones											
	21 - 26		31 - 34		35 - 44		55 - 59		60 - 69		88 - 89	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	102	5.1	96	4.8	98	4.9	101	5.05	96	4.8	89	4.45
100	96	4.8	86	4.3	86	4.3	81	4.05	91	4.55	78	3.9
250	84	4.2	73	3.65	76	3.8	73	3.65	79	3.95	74	3.7
500	76	3.8	52	2.6	67	3.35	67	3.35	67	3.35	62	3.1
750	63	3.15	46	2.3	61	3.05	64	3.2	55	2.75	57	2.85
1000	50	2.5	32	1.6	59	2.95	60	3	49	2.45	42	2.1

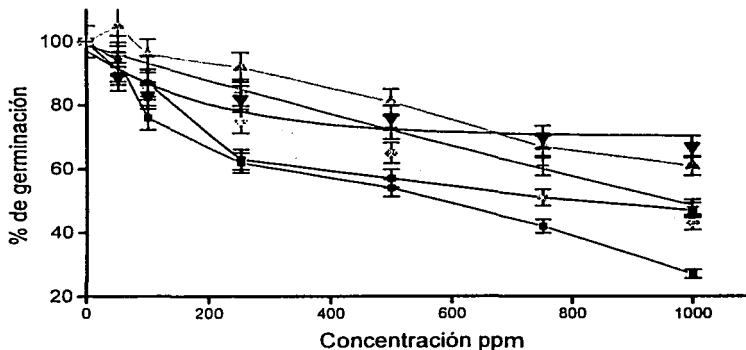


Gráfica 27. Efecto de diferentes fracciones de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación del tallo de las plántulas de *L. sativa*

Fracciones: —■— 21 —□— 31-34 —▲— 35-44 —▼— 55-59 ◆ 60-69 —+— 88-89

Tabla 28.  
Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum* con las diferentes fracciones de *B. conferta* en MeOH

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	21 - 26		31 - 34		35 - 44		55 - 59		60 - 69		88 - 89	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	91	4.55	94	4.7	105	5.25	89	4.45	92	4.6	97	4.85
100	87	4.35	76	3.8	96	4.8	83	4.15	86	4.3	91	4.55
250	63	3.15	62	3.1	92	4.6	82	4.1	75	3.75	84	4.2
500	57	2.85	54	2.7	81	4.05	76	3.8	65	3.25	73	3.65
750	51	2.55	42	2.1	67	3.35	70	3.5	51	2.55	61	3.05
1000	47	2.35	27	1.35	61	3.05	67	3.35	43	2.15	48	2.4

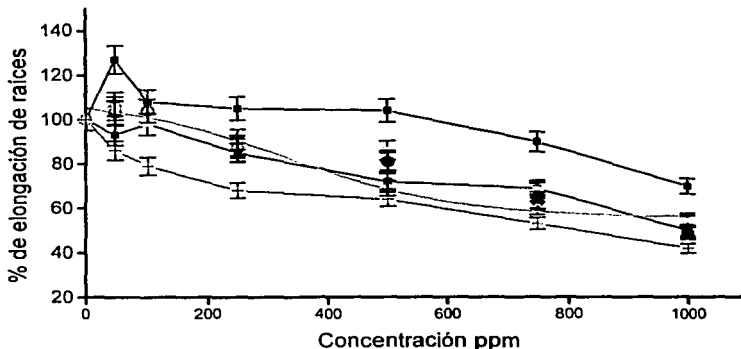


Gráfica 28. Efecto de diferentes fracciones de *B. conferta* del extracto en MeOH en la germinación de las semillas de *L. multiflorum*

Fracciones: ■ 21 - 30 ■ 31 - 34 ▲ 35 - 44 ▼ 55 - 59 ◆ 60 - 69 + 88 - 89

Tabla 29.  
Porcentaje de elongación de la raíz de las plántulas de *L. multiflorum* con las fracciones de *B. conferta* en metanol.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	21 - 26		31 - 34		35 - 44		55 - 59		60 - 69		88 - 89	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	93	4.65	103	5.15	107	5.35	127	6.35	105	5.25	86	4.3
100	98	4.9	104	5.2	104	5.2	108	5.4	98	4.9	79	3.95
250	85	4.25	87	4.35	88	4.4	105	5.25	91	4.55	68	3.4
500	72	3.6	81	4.05	69	3.45	104	5.2	86	4.3	64	3.2
750	69	3.45	63	3.15	60	3	90	4.5	68	3.4	53	2.65
1000	50	2.5	49	2.45	55	2.75	70	3.5	54	2.7	42	2.1



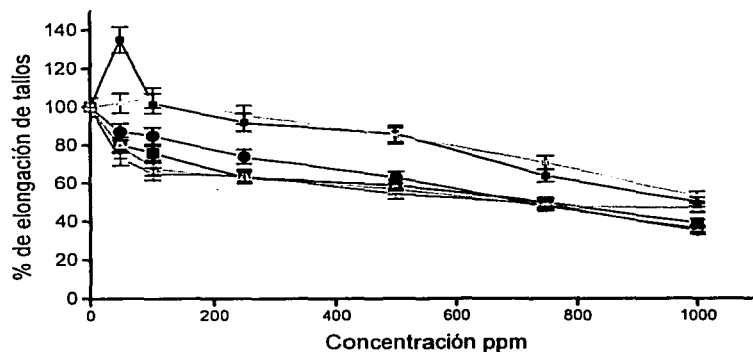
Gráfica 29. Efecto de diferentes fracciones de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación de la raíz de las semillas de *L. multiflorum*

Fracciones: —■— 21-26 ● 31-34 ▲ 35-44 —■— 55-59 ◆ 60-69 —+— 88-89

Tabla 30.

Porcentaje de elongación del tallo de las plántulas de *L. multiflorum* con las fracciones de *B. conferta* en metanol

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación la raíz de <i>L. multiflorum</i> fracciones											
	21 - 26		31 - 34		35 - 44		55 - 59		60 - 69		88 - 89	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
50	80	4	87	4.35	80	4	135	6.75	102	5.1	73	3.65
100	76	3.8	85	4.25	67.6	3.38	102	5.1	105	5.25	65	3.25
250	63	3.15	74	3.7	63	3.15	92	4.6	96	4.8	64	3.2
500	59	2.95	63	3.15	57	2.85	86	4.3	85	4.25	54.4	2.72
750	50	2.5	48	2.4	48	2.4	64	3.2	71	3.55	49	2.45
1000	15	0.75	36	1.8	47	2.35	50	2.5	53	2.65	35	1.75



Gráfica 30. Efecto de diferentes fracciones de *B. conferta* del extracto en MeOH en la elongación del tallo las semillas de *L. multiflorum*

Fracciones: —■— 21 - 26 —●— 31 - 34 —▲— 35 - 44 —■— 55 - 59 —■— 60 - 69 —+— 88 - 89

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## 6.6 PLACAS BIOAUTOGRÁFICAS

A continuación se muestran los resultados obtenidos de algunas de las placas bioautográficas obtenidas de las fracciones mostradas en la Tabla X.

Placas de la fracción 64 - 74 y 87 - 88 de *B. salicifolia*.



Control



*B. salicifolia*  
87 - 88



*B. salicifolia*  
69 - 74

Placas de las fracciones 31 - 34 y 88 - 89. *B. conferta*



Control



*B. conferta*  
88 - 89



*B. conferta*  
31 - 34

### **6.6.1 Efecto de las fracciones de *B. salicifolia* en placas bioautográficas**

#### Fracción 44 - 60

El ensayo realizado con esta fracción no se observaron zonas claras de inhibición, por lo cual se infiere que su efecto en el desarrollo de las semillas se debe a la mezcla de sus diferentes metabolitos secundarios impidiendo así el libre desarrollo de las semillas. De acuerdo a estos datos no se realizó el ensayo biológico sobre la germinación y elongación de la raíz y tallo de las plántulas de las especies prueba.

#### Fracción 69 – 74

En la placa bioautográfica correspondiente a esta fracción se observaron ligeras zonas de inhibición con respecto al control, infiriendo así que el efecto sobre la germinación de las semillas y elongación de la raíz y del tallo de las especies de prueba se debe la mezcla de los diferentes metabolitos que constituyen esta fracción. Para esta fracción también se realizó el ensayo biológico a las concentraciones mencionadas anteriormente sin que se presentara un efecto menor al 50% de cada uno de los parámetros medidos.

#### Fracción 87 – 88

De esta fracción se pudo identificar en la placa bioautográfica la zona donde se presentó una inhibición significativa en el desarrollo de las semillas de *Trifolium pratense* (semilla de trébol) y *Physalis ixocarpa* (semillas de tomate) y se midió el Rf de la fracción inhibitoria.

Se obtuvo la mezcla de compuestos correspondientes a los que se les dio la clave de subfracción BS-11 y con ellos se realizó una ensayo dosis respuesta a 10, 50, 100, 200 y 250 ppm midiendo el efecto sobre la germinación de semillas y la

elongación de la raíz y del tallo de las plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum*, obteniendo los siguientes resultados.

Cuadro XI.  $CI_{50}$  de la subfracción BS-11 sobre la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum*.

Fracción	$CI_{50}$ en ppm					
	<i>L. sativa</i>			<i>L. multiflorum</i>		
	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo
BS1	206.6	138.6	63.09	184.12	81.5	46.39

### 6.6.2 Efecto de las fracciones de *B. conferta* en placas bioautográficas

#### Fracción 31 -34

En este caso se observó una ligera inhibición del desarrollo de las semillas en una zona de la placa autobiográfica, con los compuestos correspondientes al Rf que presentó el efecto inhibitorio se realizó el ensayo a las concentraciones mostradas para la subfracción BS-11 sin que se observaran efectos significativos, es decir, desarrollo de la germinaron de las semillas y la elongación de la raíz y del tallo de las plántulas fue mayor al 50%, con lo que se puedo inferir que el efecto de la subfracción se debió a la mezcla de compuestos.

#### Fracción 21- 26

Esta fracción no presentó un efecto considerable en las placas bioautográficas sobre la germinación de las semillas y la elongación de la raíz y tallo de las plántulas de las especies prueba, esto se pudo deber a que las  $CI_{50}$  de la fracción fueron muy altas.



Fracción 88 – 89

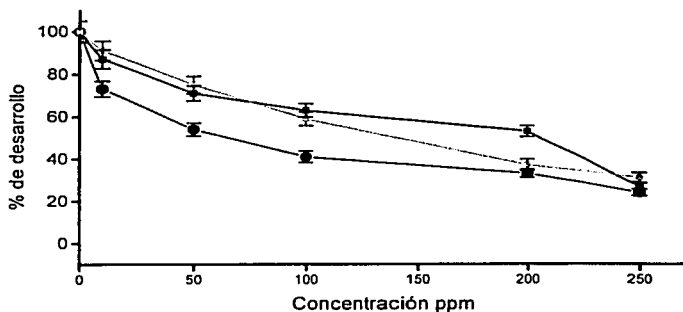
En la parte inferior de esta placa bioautográfica se observó claramente el efecto inhibitorio en el desarrollo de las semillas, esta zona perteneció a una mezcla de aproximadamente tres metabolitos secundario difíciles separar; a los que se les dio la clave de subfracción BC-1 con la cual se realizó el análisis de efecto sobre la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas a 10, 50, 100, 200 y 250 ppm obteniendo los siguientes resultados.

Cuadro XII.  $CI_{50}$  para la subfracción BC-1 sobre la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. sativa* y *L. multiflorum*

Fracción	$CI_{50}$ en ppm					
	<i>L. sativa</i>			<i>L. multiflorum</i>		
	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo	Germinación	Elongación de raíz	Elongación de tallo
BC-1	49.5	28.23	19.93	27.1	12.42	9.23

Tabla 33.  
Porcentaje de germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. sativa* con la subfracción de BS-11.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de <i>L. sativa</i> con la subfracción BS-11					
	Germinación		Elongación de raíz		Elongación de tallo	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5
10	87	4.35	73	3.65	91	4.55
50	71	3.55	54	3.05	75	4
100	63	3.15	41	2.7	59	3.25
200	53	2.65	33	1.85	37	2.7
250	27	1.35	24	1.55	31	2.3

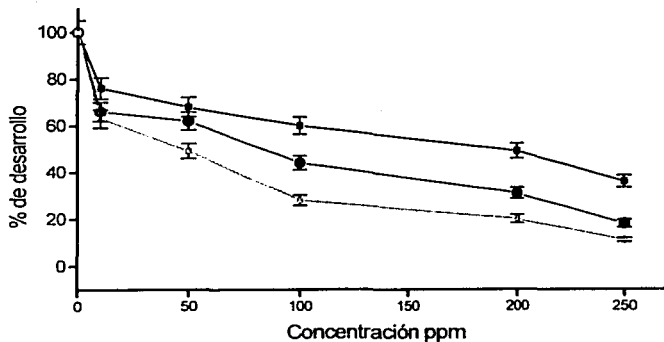


Gráfica 33. Efecto de la subfracción BS-11 de *B. salicifolia* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de plántulas de *L. sativa*

—■— germinación —●— elongación de raíz —▲— elongación de tallo

Tabla 34.  
Porcentaje de germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. multiflorum* con la subfracción de BS-11.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de <i>L. multiflorum</i> con la subfracción BS-11					
	Germinación		Elongación de raíz		Elongación de tallo	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5
10	76	4.55	66	4.05	63	3.9
50	68	4.15	62	3.85	49	3.2
100	60	3.75	44	2.95	28	2.15
200	49	3.2	31	2.3	20	1.75
250	36	2.55	18	1.65	11	0.8

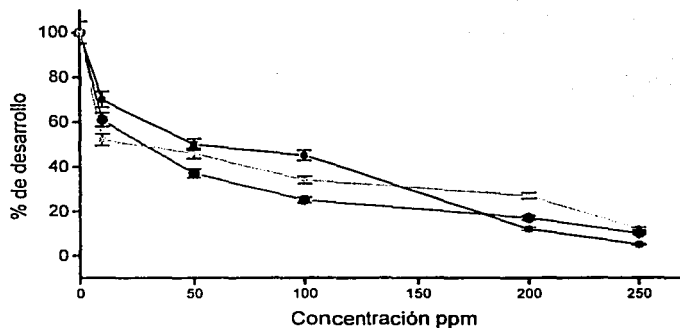


Gráfica 34. Efecto de la subfracción BS-11 de *B. conferta* del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en la germinación y elongación de raíz y tallo de semillas de *L. multiflorum*

—■— germinación —●— elongación raíz —▲— elongación tallo

Tabla 35  
 Porcentaje de germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. sativa* con la subfracción de BC-1.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas y elongación de raíz y tallo de semillas de <i>L. sativa</i> con la subfracción BC-1					
	Germinación		Elongación de raíz		Elongación de tallo	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5
10	70	3.5	61	3.05	52	2.6
50	50	2.5	37	1.85	46	2.3
100	45	2.25	25	1.25	34	1.7
200	12	0.6	17	0.85	27	1.35
250	5	0.25	10	0.5	12	0.6

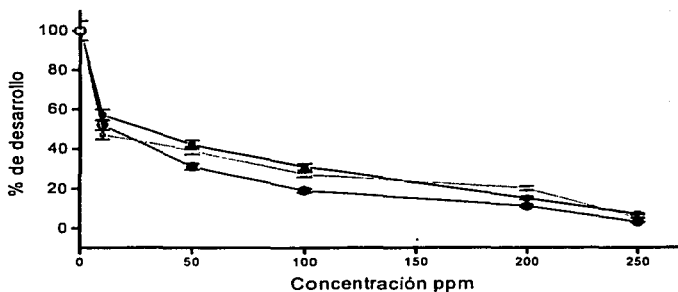


Gráfica 35. Efecto de la subfracción BC-1 de *B. conferta* del extracto en MeOH en la germinación y elongación de raíz y tallo las semillas de *L. sativa*

—■— germinación —●— elongación de raíz —▲— elongación de tallo

Tabla 36.  
Porcentaje de germinación de semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de *L. multiflorum* con la subfracción de BC-1.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las semillas y elongación de raíz y tallo de las plántulas de <i>L. multiflorum</i> con la subfracción BC-1					
	Germinación		Elongación de raíz		Elongación de tallo	
	%	Error +/-	%	Error +/-	%	Error +/-
0	100	5	100	5	100	5
10	57	2.85	52	2.6	47	2.35
50	42	2.1	31	1.55	39	1.95
100	31	1.55	19	0.95	27	1.35
200	15	0.75	11	0.55	20	1
250	7	0.35	3	0.15	5	0.25



Gráfica 36. Efecto de la subfracción BC-1 de *B. conferta* del extracto en MeOH en la germinación y elongación de raíz y tallo de semillas de *L. multiflorum*

—■— germinación —●— elongación raíz —▲— elongación tallo

## VII. CONCLUSIONES

1. Comparando los resultados obtenidos de las pruebas biológicas con ambas especies se determinó que el extracto en diclorometano de *B. salicifolia* presentó mayor actividad inhibitoria en las especies de prueba que el extracto en metanol de *B. conferta*.
2. Comparando los resultados obtenidos se determinó que a pesar que el extracto en diclorometano de *B. salicifolia* presentó mayor efecto sobre la germinación de las semillas y la elongación de raíz y tallo de las plántulas de las especies *L. sativa* y *L. multiflorum* que el extracto de *B. conferta* en metanol, éste extracto no tienen las características necesarias para ser empleado como herbicida ya que sus  $CI_{50}$  son muy elevadas.
3. Realizando una comparación de los resultados obtenidos de las  $CI_{50}$  de las subfracciones BS-11 de *B. salicifolia* en diclorometano y BC-1 de *B. conferta* en metanol, BC-1 presentó mayor efecto inhibitorio en la germinación de las semillas y la elongación de la raíz y del tallo de las plántulas de las especies prueba y es mejor candidato para que se realice la búsqueda de los aleloquímicos responsables de dicha actividad.

## VIII. – PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios con actividad herbicida frente a nuevos modelos de semillas dicotiledóneas y monocotiledóneas.
2. Realizar otras pruebas de actividad herbicida, como inhibición en el desarrollo de la elongación radicular en plántulas de semillas previamente germinadas.
3. Completar el aislamiento de los metabolitos secundarios de la subfracción BC-1 de *B. conferta* en metanol involucrados en las actividades inhibitorias observadas, para su identificación y posterior evaluación de la actividad herbicida en otros modelos.

## IX.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Abigaíl. **1994**. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México., pp. 40.
- Almeida, F. S. A. **1988**. Alelopatía e as plantas, Fundação Instituto Agronômico do Parná – Londrina., pp. 5-59.
- AlSaadawi, I., Arif, M., y AlRubeaa. **1985**. Allelopathic effects of *Ceratiola aurantium* L. II. Isolation, characterization, and biological activities of phytotoxins, *J. Chem. Ecol.* 11: 1527-1534.
- Anaya, A., Calera, M., Mata, R., Pereda-Miranda, R. **1990**. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* CAV (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* 16:2145-2152
- Anaya A., Cruz-Ortega, R. **2001**. La alelopatía: algunos estudios de caso y posibles aplicaciones. pp. 33 – 67. En: Anaya, A., Espinoza-García, F., Cruz-Ortega, R. (eds). *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Instituto de Ecología UNAM, México D. F.*
- Anaya, A., Hernández-Bautista, B., Pelayo-Benavides, H., Calera M., Fernández-Luiselli, E. **1995**. Allelopathy in Mexican Plants. pp. 224 – 239.. En: Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). *Allelopathy: organisms, processes and applications. ACS Symp. Ser. 582. Washington, DC.*
- Anaya, A., Hernández-Bautista, B., Torres-Barragán, A., León-Cantero, Jiménez-Estrada. **1996**. Phytotoxicity of cacalol an some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob & Brettel (Asteraceae), matarique or maturing. *J. Chem. Ecol.* 22:393-403.
- Barnard, G., Daberkow, S., Padgitt, M., Uri, N. **1997**. Alternative measures of pesticide use. *The Science of the Total Environment* 203, 229 – 244.
- Benner, J. **1993**. Pesticidal compounds from higer plants. *Pestic. Sci.* 39:95.
- Berenbaum M. R. **1989**. North American Ethnobotanicals as Sources of Novel Plant-Based Insecticides. In: Arnason J., Phylogene B. and Morand P. (eds.). *Insecticides of Plant Origin. ACS Symp. Ser. 387, Washington D. C., pp. 11 – 14.*
- Besnier, R. **1989**. Semillas biología y tecnología Ed. Penson, Madrid.



- Bohlmann, F., Zdero, Ch. **1976**. Further constituents from *B. conferta* H.B.K. Chemical Ber. 109(4), pp. 1450 – 2.
- Bruneton J. **1984**. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. ed. Acribia, S. A. España, Zaragoza. pp. 131 – 155.
- Buchanan B., Gruissem, W., Russell J., **2000**. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plants Physiologists USA. pp. 1250-1309.
- Bye R., Linares, E., Estrada, E. **1995**. Biological Diversity of Medicinal Plants in México. pp. 65 –82. En: Arnason, J., Mata, R., Romero, J. (eds.). En: *Recent advances in Phytochemistry, Phytochemistry of Medicinal Plants*. Vol. 29 Plenum Press, New York, USA.
- Camps F. **1998**. Relaciones Plants Insect, Insecticidas de origen vegetal. En: Bellés S. (ed.). *Insecticidas Bioracionales* CSIC, Madrid, pp. 69 – 86.
- Castillo M., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M. and Covillaud, F. **1998**. Biological activities of natural sesquiterpene lactones and effect of synthetic sesquiterpene derivatives on insect of synthetic sesquiterpene derivatives on insect juvenile hormone biosynthesis. J. Agric. Food Chem. 46, 2030-2035.
- Céspedes C., Calderón J., Salazar R., Lotina-Hennsen B., Segura R. **2001**. Plant-Growth inhibitory activity of cedrelanolide from *Cedrela salvadorensis*. J. Chem. Ecol. 27 (1), 137-149.
- Céspedes C., Calderón J., Salazar R., King-Díaz, Beatriz., Lotina-Hennsen B. **1999**. Allelopathic Activity of Photogendunins from *Cedrela ciliolata* (Meliaceae). Bol. Soc. Chil. Quim. 44: 173-183.
- Céspedes, C., Hoeneisen, M., Bittner, M., Becerra, M., y Silva, M. **2001**. Comparative Study of Ovatifolin Antioxidant and Growth Inhibitory Activities. J. Agric. Food Chem. 49: 4243 –4251.
- Céspedes, C., Uchoa, A., Salazar, J., Perich, F., Pardo, F. **2002**. Plant Growth Activity of *p*-Hydroxyacetophenones and Tremetones from Chilean Endemic *Baccharis* Species and Some Analogous: A Comparative Study. J. Agric. Food Chem. 50: 2283-2292.
- Crombie, L. **1999**. Natural product chemistry and its part in the defence against insects and fungi in agriculture. Pestic. Sci., 55 (8), pp. 761 – 774.

- Crooks, P., Robinson, B., Meth-Cohn, O. **1976**. The  $C^{13}$ NMR spectra of physostigmine and related compound. *Phytochemistry*. 15(16) 1092-1093.
- Crowley, P., Fisher, H., Devonshire, A. **1998**. Feed the World. *Chem. Br.* pp. 25 – 28.
- Dayan, F., Romagnoli, J., Tellez, M., Rimando, A., Duke, S., *Pest. Outlook*, 185 – 188.
- Dornbos, D. and Spencer, G. **1990**. Natural Products Phytotoxicity. A Bioassay Suitable for Small Quantities of Slightly Water-Soluble Compounds. *J. Chem. Ecol.* 16 (2): 339-352.
- Duke, S. 1991. Plant terpenoids as pesticides. En: Keeler R. y Marcel A. (eds.). *Handbook of Natural Toxins*. Vol. 6, Toxicology of plant and fungal compounds. Beaker Inc., pp. 269 – 296.
- Duke, S. and Abbas, H. **1995**. *Natural Products with Potential Use as Herbicides*. pp. 348-362. En: Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). *Allelopathy. Organisms, processes and applications*. ACS Symp. Ser. 582 Washington D.C.
- Einhellig, F. A. **1995**. Mechanisms and modes of action of allelochemicals in allelopathy. pp. 96 – 116, En: Inderjit, K., Dakshini, and F. A. Einhellig (eds.). *Allelopathy Organisms, Processes, and Application*, ACS Symp. Ser. 582, Washington, D.C.
- Especies con usos no maderables en bosques de encinos, pino y pino-encino. <http://beta.semarnat.gob.mx>
- Fernandez Gladys, Johnston Myrna. **1986**. Fisiología Vegetal Experimental. Servicio Editorial IICA. San José, Costa Rica.
- Fisher N., y Quijano L. **1985**. Allelopathic agents from weeds: *Amaranthus palmeri*, *Ambrosia artemisiifolia* and related weeds. ACS. Symp. Ser. 268, Washington D. C.
- Galliot, F. **1998**. Initial Extraction and Product Capture. En: Cannell. R. (ed.). *Natural Products Isolation*. Human Press. Totowz, New Jersey. pp. 53 -90.
- Galindo J., De Luque P., Jorin J., Macias F. **2002**. SAR Studies of Sesquiterpene Lactones as *Orobancha cumana* seed germination stimulants. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1911-1917.

- Gauvrit, C. **1992**. The mode of action of herbicides used in wheat crops. *Phytoma* 435, 38-42.
- Glenn C. Klingman, Floyd M. Ashton. **1980**. Estudio de las plantas nocivas. Principios y prácticas. Ed. Limusa . México.
- Guerrero, C., Romo de Vivar, A. **1973**. Structure and stereochemistry of bacchofertina a dierpene isolated from *B. conferta*. *Rev. Latinoamericana Quím.* 4(4), 178-84.
- González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Cabrera, R., Reina, M. **1997**. Silphinene Derivatives: Their Effects and Modes of Action on Colorado Potato Beetle. *J. Agric. Food Chem.* 45, 946 – 950.
- Gros, E., Pomillo A., Seldes A., Burton, G. **1985** Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D. C. pp. 1-11.
- Grümer, M., **1961**. The role of toxic substance in the interrelationships between higher plants. pp. 219 – 228. En: F.L. Milthorpe, (ed.). *Mechanisms in biological competition*. Academic Press, New York.
- Halligan, J., **1975**. Toxic terpenes form *Artemisa californica*. *Ecology* 56:999-1003.
- Hamburget, R., y Hostettmann, K. **1991**. Bioactive in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* 30:3864-3874.
- Harborne, J. **1988**. Introduction to Ecological biochemistry. Academic Prees, USA. pp 82 – 117.
- Hoagland, R. **1990**. Microbes and microbial products as herbicides, an overview. En: Hoagland, R. E. (ed.), *Microbial Products as Herbicides*, ACS Symposium Series 439, 1 – 52.
- Hopkins William G. **1995**. Intoduction to Plant Physiology John Wiley and Sons, Inc. USA.
- Inoue, M., Nishimura, H., Li, H., and Mizutani, J. **1992**. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr. Schm. (Polygonaceae). *J. Chem. Ecol.* 18 (10): 1833-1841.
- Kavka, J., Guerrero, E., Giordano, O., Romo, J. **1973**. Flavonoids of *B. salicifolia*. *Rev. Latinoamericana Quím.* 4(3), 101-104.

- Koller, D., and Hadas, A., **1982**. Water relation in the germination of seeds pp 401-403, In: Large, O., Novel, P., Osmond, C., and Ziegler, H., (eds). *Physiological Plant Ecology II*. Sprinyer- Verlag, Belin, Heidelberg.
- Kubo, I. **1997**. Tyrosinase inhibitors from plants. pp 310 – 326. En: Hedin, P. A., Hollingworth, F., Masler, E., Miyamoto, J., Thompson, D., (eds.). *Phytochemicals for pest control*. ACS Sym. Ser. 658. ACS. Symp. Ser. Washington, DC..
- Leather G. and Einhellig, F. **1988**. Bioassay of Naturally Occurring Allelochemicals for phytotoxicity. *J. Chem. Ecol.* 14,(10):1821-1828.
- Lecciones hipertextuales de botánica. Familia Asteraceae. <http://www.unex.es/botanica/asteraceae.htm>.
- Macías, F. **1995**. Allelopathy in the Search for Natural Herbicide Models. pp 310 – 329 En: Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. A., (eds). *Allelopathy: organisms, processes and applications*. ACS Symp. Ser. 582. Washington, DC..
- Macías, F., Molinillo, J., Varela, R., Torres, A. and Galindo J. (a) **1999**. Bioactive Compounds from the Genus *Helianthus*. pp 121 - 148 In: Macias, F., Galindo, J., Molinillo, J., and Cutler (eds.). *Recent Advances in Allelopathy Vol. I*. Servicio de Púlicaciones Universidad de Cadiz. Cadiz España.
- Macías, F., Galindo, J., Castellano D., Velasco R. (b) **1999**. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): trans, trans-Germacranolides. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5288-5296.
- Macías, F., Galindo, J., Castellano D., Velasco R. **2000** (a). Sesquiterpene lactones whit potential use as natural herbicide models (II): Guaianolides. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5288 – 5296.
- Macías, F., Varela, M., Torres, A. y Molinillo J. **2000** (b). Potential Allelopathic Activity of Natural Plant Heliannanes: A Proposal of Absolute Configuration and Nomenclature. *J. Chem. Ecol.* 2000.
- Macías, F., Galindo, J. **2001**. Terpenoides alelopáticos: estructuras, actividad y aplicaciones. pp 137 – 161. En: (Anaya, A., Espinoza-García, F., Cruz-Ortega, R. (eds). *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación* . Instituto de Ecología. UNAM, México D. F.

- Mata, R., Pereda-Miranda, R. and Lotina-Hennsen, B., **1996**. Natural products from Mexican plants as a source of potential herbicide agents. En: Rodríguez-Hann, R. (ed.). *Secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry an biological properties*. pp 59 – 68.
- Maximino Martínez. *Las plantas medicinales de México*. Ediciones Botas, 6<sup>o</sup> Ed. México **1996**. pp 165.
- Miyazawa, F., Yoshio, K., Ishidawa, Y., Dameoda, H. **1998**, Insecticidal Alkaloids against *Drosophyla melanogaster* from Nuphar japonicum DC. J. Agric. Food Chem. 46, 1059 – 1063.
- National Academy of Sciences Control de plagas, plantas y animales. **1978**. *Plantas nocivas y como combatirlas*. Vol. 2, ed. Limusa. México.
- Naverrete, C. **1992**. Evaluación Farmacológica de las Plantas Medicinales. En: Estrada, E. (ed.). *Las Plantas Medicinales de México. Introducción a su Estudio*. Universidad Autónoma de Chapingo. 255 – 268.
- Ortiz B., Enrique, **1995**. La familia Asteraceae en el Edo. de Nayarit. Tesis de Lic. Fac. Ciencias U.N.A.M. México, D.F.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A., Wickramaratne, D., Pezzuto, J., and Kinghorn, A. **1993**. Tricolorin A, Major Phyto growth Inhibitor from *Ipomea tricolor* A. J. Nat. Prod. 56:571-582.
- Pillmoor, J., Wright, K., and Terry, A. **1993**. Natural products as a source of agrochemicals an leads for chemical synthesis. Pestic. Sci. 39: 131 – 140.
- Proksch, P. and Rodríguez, E., **1983**. Chromenes and benzofurand of Asteraceae, their chemistry and biological significance. Phytochem. 22: 2335-3348.
- Putnam, A.R. and Duke W. P. **1978**. Allelopathy in agroecosystems. Annual Review of Phytopathology. 16:431-51.
- Putnam, A.R. and Thompson, A.C. **1985**. The chemistry of allelopathy. pp. 1-8. En: Thompson C. (ed.). *Biochemical interactions among plant*. ACS. Symp. Ser. 268 Washington D.C.
- Rembold, H. **1989**. The Azadirachtins their Potential for Insect Control. En: *Economic and Medicinal Plant Research*. Wagner, H., Hikino, H., and Farnsworth, N. (eds). Academic Pres, London 3: 57 – 72.

- Rice, E. **1984**. Allelopathy. 2º ed. Academic Press. USA. pp. 320 – 343.
- Rice, E. **1987**. Allelopathy: An Overview, pp. 8 – 22. En: Waller, G. (ed.). *Allelochemicals role in Agriculture and Forestry*. ACS. Symp. Ser. 330. Washington D. C.
- Ricahrdon, M. (1998). Pesticides Friend or Foe?. *Water Science Tecnology*. 37, 19-25
- Rojas, T. S. **2002**. Metabolitos fitotoxícos de *Parmotrema tinctorum* Ny. (Hale) y *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl. Como una fuente potencial de compuestos herbicidas con un efecto sobre la fotosíntesis y la proteína calmodulina. Tesis de Doctorado en Ciencia Químicas. UNAM. México.
- Romo J., **1972**. Sigmasterrol, friedooleanan-3-beta-ol on baccharis oxide from *Baccharis salicifolia*. *Phytochemistry* 11(8)-2628.
- Rzedowski, J. **1972**. Contribuciones a la fitogeografía florística e historia de México III. Algunas tendencias en la distribución geografía y ecología de las Compositae mexicanas. *Ciencia (México)* 27: 123-132.
- Rzedowski, J. **1991**. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3 –21.
- Shilling, D. y Yoshikawa, F. **1987**. *A rapid seedling bioassay for the study of allelopathy*. pp. 334-342. En: Forestry, Waller, G. R. (eds.). *Allelochemicas: Role in Agriculture*. ACS Symp. Ser. 330, Washington, D.C.
- Tang, C., y Young, C. **1982**. Collection and identification of allelopathic compounds form the undisturbed root system of bigalta limpogress (*Hemiarthria altissima*). *Plant Physiol*. 69:155-160.
- Vyvyan, J. **2002**. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*. 58:1631-1646.
- Warning U., Bohlmann F., Sanchez V., Del Rio S., Domínguez X. A. **1986**. New constituents of *B. salicifolia*. *Rev Latinoamericana Quím*. 17(3-4), 199-200.
- Wolf, R. **1986**. Effects of p-methoxycinnamaldehyde from sata anise and related cinnamid acid derivatives on velvetleaf germination. *J. Nat. Prod*. 49:156-158.