



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

---

**“Evaluación de la capacidad alelopática de las fracciones hidrosolubles del extracto etanólico de cuachalalate (*Amphiterygium adstringens Schiede ex Schlecht*).”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
NÚÑEZ LUNA ISBOSET GABRIEL

Asesor: Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez

Co asesor: Q.F.B. María Guadalupe Rebollar Barrera

Co asesor: Dra. Ana María Velázquez Sánchez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2013.



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.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Evaluación de la capacidad alelopática de las fracciones hidrosolubles del extracto etanólico de cuachalalate (*Amphytergium adstringens* Schiede ex Schlecht).**

Que presenta el pasante: Isboset Gabriel Núñez Luna  
Con número de cuenta: 408033790 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q. Mario Arturo Morales Delgado	
<b>VOCAL</b>	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Ma. del Rocío Ramírez Salgado	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Víctor Hugo Vázquez Valadez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## Agradecimientos

A **Dios**, por el regalo de vida y el tiempo que me ha permitido vivir con salud, física y mental, junto a la gente que amo y estimo.

A mis padres, **Francisco Gabriel Núñez Rodríguez y Clementina Luna Juarez**, por dotarme de las herramientas, el cariño y muchas bendiciones que me dan desinteresadamente para mi bienestar.

A mi hermano **César Iván Núñez Luna**, En verdad me llena de orgullo lo buen chico e inteligente que eres. Espero que nunca cometas los mismos errores que yo, pero también no hagas cosas que yo no haría.

A la **maestra Q.F.B. Brígida Camacho Enríquez y al profesor Q. Mario Arturo Morales Delgado** por compartir conmigo su amistad, alegrías, consejos, enseñanzas, conocimientos y experiencias de vida.

A la **maestra Q.F.B. Ma. Gpe. Rebollar Barrera y Dra. Ana María Velázquez Sánchez** por su valiosa asesoría durante el desarrollo de este proyecto. Sin Uds. no habría lo mismo.

A la **M. en C. Edith López Villafranco**, investigadora de la FES Iztacala, y al **Dr. Gabriel Sánchez Ken**, investigador del Instituto de Biología por su apoyo en la identificación de los especímenes botánicos utilizados en estos ensayos.

Al **T.A. Rodolfo Robles Gómez**, (Laboratorio de Microscopía Electrónica), por el apoyo que nos brindó en el uso de microscopio, así como en la toma de micrografías del mismo; a la **T.A. Flora Torres**, por su asesoría técnica en el uso del espectrofotómetro UV/VIS y al **T.A. Draucin Jiménez Celi**, (Titular B) Responsable del Taller de Soplado de Vidrio, por auxiliarnos en la renovación y/o reparación de material de vidrio.

A mi jurado de examen, **M. en C. María del Rocío Ramirez Salgado, Q. Lidia Ballesteros Hernández y M. en C. Víctor Hugo Vázquez Valadez**, por sus aportaciones, mejoras y perspectivas de este proyecto de tesis.

A los **chicos del Laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia** (Alejandra Sánchez, Miguel, Jannine, Luisa, Mary Carmen, Melissa Mario, Gerardo, Lizbeth, Lidia, Imelda). Aprendí mucho de Uds. y espero que haya podido enseñarles algo, por pequeño que esto sea. Atesoro con celo nuestras risas, travesuras, charlas y convivencias.

Chicos becarios UNAM-Coca Cola, **Ruth, Rodrigo Gama y Axell Pineda**, ¡GOYA! Amigos míos, fue un gran orgullo personal compartir con ustedes esta gran etapa que nos definió en más de un sentido.

A la coordinadora de carrera, **Q.F.B. Laura Gricelda Martínez** y a la **Lic. Maru López Castell** por su titánico esfuerzo y compromiso para que mi movilidad internacional se llevara a cabo sin cabos sueltos. Mil gracias.

A los amigos de la generación Q.F.B. 35 con los que he vivido gran parte de mis “mini aventuras” durante la carrera: **Paco D., Rodrigo G., Lu, Luis, Mauro, Ruth, Chris, Alex Z., Alhelí** y a otros miembros de esta vanguardista generación con los que compartí metas y objetivos.

A **Bere** por las geniales aventuras y aprendizaje que vivimos juntos y seguiremos y a **Spaguetti Opera** (David Chora, Pedro, Chema) por que el tiempo que hemos compartido hasta ahora es de lo más gratificante.

A mis amigos **Alan Rendón, Sonia y Karen**, por sus largos años de amistad y aventuras. Verlos y charlar sobre tantas cosas es un gran obsequio. Lo que cada uno me comparte de sí, me hace crecer un poco más.

A la **UNAM**, por ser una institución que siempre está a la vanguardia de los avances tecnológicos, sociales y culturales a nivel nacional e internacional; a la **FES Cuautitlán y a sus profesores** por la sólida formación académica, humana y personal que me dio durante 5 años.

Al proyecto **PAPIME PE201510 - Actualización y fortalecimiento de la enseñanza experimental de las asignaturas de farmacognosia y fitoquímica de la carrera de licenciado en farmacia** - por dotar de fondos al laboratorio para la ejecución de estos y otros ensayos que proveerán de herramientas prácticas a la asignatura.

A ti, **Isbo**, porque no te rendiste. Pudiste abdicar en muchas ocasiones, pero tu temple y fortaleza, así como el apoyo continuo de la gente que te estima, ayudo a cristalizar este proyecto. No olvides que casi todo suele tener un propósito, aunque no siempre lo entiendas.

Finalmente, a mis mascotas: **Willy, Gandalf, Charlotte y Briskeen**. Solo por estar ahí.

The tree which moves some to tears of joy  
Is in the eyes of others only a green thing  
That stands in the way.

Some see nature all ridicule and deformity...  
And some scarce see nature at all.  
But to the eyes of the man of imagination  
Nature is imagination itself.

*William Blake, poeta inglés*

## CONTENIDO

Índice de Apéndices.....	V
Índice de Diagramas .....	V
Índice de Esquemas .....	V
Índice de Figuras .....	V
Índice de Fotografías .....	V
Índice de Gráficos.....	VI
Índice de Tablas.....	VII
Lista de Abreviaturas y símbolos.....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	3
1. Investigación en productos naturales para el control de plagas.....	3
2. Alelopatía .....	4
Liberación de los agentes alelopáticos.....	5
Ensayos en alelopatía.....	7
3. Germinación .....	9
Proceso germinativo .....	9
4. Biosíntesis de los agentes alelopáticos .....	10
Naturaleza química de algunos agentes alelopáticos .....	11
Poliaminas .....	12
Brasinoesteroides.....	13
Compuestos fenólicos.....	14
5. Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	15
6. Cuachalalate .....	17
Compuestos químicos presentes en la corteza de cuachalalate.....	18
Uso etnobotánico y propiedades farmacológicas.....	19
III. Objetivo general .....	21
IV. Objetivos particulares.....	21
V. Método experimental .....	22
Identificación y proceso extractivo .....	22
Estandarización del extracto .....	24
Actividad biológica .....	27
VI. Resultados y Análisis de resultados .....	30

Características organolépticas del triturado .....	30
Identificación y proceso extractivo .....	30
Cuachalalate.....	30
Rendimiento de extracto seco .....	31
Estandarización química de los extractos.....	34
Determinación de materia soluble del extracto.....	34
Curva de calibración de ácido tánico .....	36
Cuantificación de polifenoles totales en solución de DMSO al 1% de la fracción hidrosoluble de cuachalalate .....	39
Tamiz fitoquímico.....	41
Actividad biológica .....	45
Identificación .....	45
Ensayos de germinación .....	45
VII. Conclusiones .....	60
VIII. Prospectivas.....	61
Apéndices .....	62
Referencias .....	81



## ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice A.....	63
Apéndice B.....	69
Apéndice C.....	72
Apéndice D.....	76
Apéndice E.....	77
Apéndice F.....	80

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Identificación y proceso extractivo.....	23
Diagrama 2. Estandarización de extracto.....	26
Diagrama 3. Actividad biológica.....	29

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo de acción de la extracción asistida con ultrasonido.....	17
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fosfinitricina, metabolito natural en el control de especies vegetales nocivas.....	4
Figura 2. Rutas biosintéticas de metabolitos secundarios.....	11
Figura 3. Poliaminas.....	12
Figura 4. Estructura química de brasinolida.....	13
Figura 5. Mono, di y trifenoles con actividad alelopática.....	14
Figura 6. Polifenoles y grupo químico al que pertenecen.....	15
Figura 7. Compuestos mayoritarios presentes en la corteza de cuachalalate.....	19

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 . Modos de dispersión de aleloquímicos.....	7
Fotografía 2. Corteza de cuachalalate.....	18
Fotografía 3. Corteza de cuachalalate triturada.....	30
Fotografía 4. Espécimen de cuachalalate registrado en el herbario IZTA de FES Iztacala (2012). .....	31

Fotografía 5. Micrografía de cuachalalate triturado con microscopia electrónica de barrido: antes del tratamiento [450x] .....	33
Fotografía 6. Micrografía de cuachalalate triturado con microscopia electrónica de barrido: tratamiento de maceración durante 30 minutos con agitación. [450x] .....	33
Fotografía 7. Micrografías de cuachalalate triturado con microscopia electrónica de barrido: después de tratamiento [450x] .....	34
Fotografía 8. Prueba de Baljet .....	42
Fotografía 9. Prueba de Benedict y cloruro férrico .....	42
Fotografía 10. Ensayo de Rosenthaler y Liebermann-Buchard .....	42
Fotografía 11. Prueba de ácido silicotúngstico y prueba de Mayer .....	43
Fotografía 12. Prueba Dragendorff, Wagner y Hager .....	43
Fotografía 13. Prueba de Benedict (fracción hidrosoluble .....	43
Fotografía 14. Prueba de cloruro férrico para fracción hidrosoluble .....	43
Fotografía 15. Prueba de Rosenthaler para fracción hidrosoluble .....	44
Fotografía 16. Prueba de espuma para fracción hidrosoluble .....	44
Fotografía 17. Desarrollo de la semilla de trigo en lapso de 5 días .....	46
Fotografía 18. Anatomía del germen de trigo .....	46
Fotografía 19. Desarrollo de lechuga en función del tiempo .....	53
Fotografía 20. Anatomía del germen de lechuga .....	54

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibración de ácido tánico.....	37
Gráfico 2. Porcentaje de germinación de semillas de trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ) con la fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones. ....	49
Gráfico 3. Longitud promedio de coléptilo y radícula en trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ) con fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones.....	50
Gráfico 4. Porcentaje de germinación de lechuga ( <i>Lactuca sativa l. var. Parris Island</i> ) con fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones.....	55
Gráfico 5. Longitud promedio de hipocótilo y radícula en lechuga ( <i>Lactuca sativa L. var. Parris Island</i> ) con fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas de laboratorio que pueden evidenciar el modo de acción de los aleloquímicos a nivel metabólico y funcional .....	7
Tabla 2. Estudios farmacológicos efectuados con cuachalalate .....	20
Tabla 3. Preparación de sistemas para curva de calibración de ácido tánico.....	25
Tabla 4. Rendimiento promedio del extracto obtenido por ultrasonificación .....	31
Tabla 5. Pruebas de disolución con DMSO al 1 % .....	34
Tabla 6. Datos generales de la curva de calibración de ácido tánico (Concentración del estándar y curva) ....	36
Tabla 7. Información estadística acerca de la curva de calibración de ácido tánico.....	37
Tabla 8. Límites de confianza para la curva de calibración de ácido tánico.....	38
Tabla 9. Primera cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en soluciones de trabajo de cuachalalate .....	39
Tabla 10. Segunda cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en soluciones de trabajo de cuachalalate .....	39
Tabla 11. Tercera cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en soluciones de trabajo de cuachalalate .....	40
Tabla 12. Datos totales de la cuantificación de polifenoles totales en solución acuosa de extracto etanólico de cuachalalate .....	40
Tabla 13. Tamiz fitoquímico de cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede</i> ) .....	41
Tabla 14. Primer ensayo de germinación de trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ): % de germinación, longitud de coléptilo y radícula promedio .....	48
Tabla 15. Segundo ensayo de germinación de trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ): % de germinación, longitud de coléptilo y radícula promedio .....	48
Tabla 16. Tercer ensayo de germinación de trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ): % de germinación, longitud de coléptilo y radícula promedio .....	48
Tabla 17. Resultados promedio de ensayos en trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ).....	49
Tabla 18. ANOVA para porcentaje de germinación en trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ).....	50
Tabla 19. ANOVA para longitud de coléptilo en trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ).....	51
Tabla 20. Datos para contrastes de significancia para longitud de coléptilo en trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ). 51	

Tabla 21. ANOVA para longitud de radícula en trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	52
Tabla 22. Datos para contrastes de significancia para longitud de radícula en trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.) ..	52
Tabla 23. Primer ensayo de germinación de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Parris Island</i> ): % de germinación, longitud de hipocótilo y radícula promedio.....	54
Tabla 24. Segundo ensayo de germinación de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Parris Island</i> ): % de germinación, longitud de hipocótilo y radícula promedio .....	54
Tabla 25. Tercer ensayo de germinación de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Parris Island</i> ): % de germinación, longitud de hipocótilo y radícula promedio.....	55
Tabla 26. Resultados promedio de ensayos en de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Parris Island</i> ) .....	55
Tabla 27. ANOVA para porcentaje de germinación en lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L var. <i>Parris Island</i> ).....	56
Tabla 28. Resumen de datos para contrastes de significancia en porcentaje de germinación para lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Parris Island</i> ) .....	56
Tabla 29. ANOVA para longitud de hipocótilo en lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Parris Island</i> ) .....	58
Tabla 30. ANOVA para longitud de radícula en lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Parris Island</i> ) .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AIA.- Ácido Indol-acético

ANOVA.- Análisis de varianza

EAU.- Extracción asistida por ultrasonido

DMSO.- Dimetilsulfóxido

GRAS .- Generally recognized as safe

Hz .- Hertz

MEB .- Microscopia electrónica de barrido

mg .- miligramo

mL . - mililitro

$\mu g$  .- Microgramo

ppm .- Partes por millón

UAE .- Ultrasound assisted extraction

Fe de erratas

Por error tipográfico, se omitió una letra “P” en la especie vegetal durante el registro de tesis. El nombre botánico completo del cuachalalate es: *Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht*

## I. INTRODUCCIÓN

Una de las áreas de mayor interés en la fitoquímica es el control de plagas mediante el uso de extractos vegetales o fracciones de los mismos. Existen relaciones simbióticas y de competencia entre numerosas especies vegetales que pueden ser aprovechadas para nuestro beneficio.

El uso de extractos vegetales para el control de organismos nocivos ofrece varias ventajas con respecto a moléculas sintéticas debido a que:

- a) Los extractos vegetales son matrices multicomponentes. Esto significa que en los sólidos secos se hallan más de 20 moléculas contenidas, cada una con receptores o sitios blanco diferentes. Al activarse o desactivarse dichos sitios en el organismo receptor, este puede entrar en un estrés fisiológico irreversible, al grado de inutilizar sus funciones metabólicas momentánea o permanentemente
- b) Los metabolitos secundarios hallados en muchas plantas son una respuesta evolutiva a la constante competencia por recursos en el ecosistema, haciendo evidente que algunas plantas tienen interacciones importantes con individuos de algún género o especie de su mismo o de diferente nicho ecológico. (Ej. La planta llamada Gobernadora (*Larrea tridentata* (DC.) Cav.) tiene actividad frente a hongos, plantas, bacterias y virus (Lira Saldivar & et al, 2007).

Pese a las ventajas descritas anteriormente, en ocasiones no se cuenta con un ensayo sencillo para apreciar estos fenómenos de manera más directa. Otra razón que complica el estudio de este fenómeno es la omisión de candidatos de estudio potenciales, ya sea por desconocimiento de sus interacciones con otros organismos o por que durante su estudio, quizá la respuesta que se buscaba no logro satisfacer los criterios experimentales (Ej. Un extracto vegetal que no genera una buena respuesta antimicrobiana, podría ser candidato de estudio para el control de plagas vegetales u otros organismos)

En el presente trabajo se estudió la viabilidad de los ensayos de germinación como pruebas presuntivas de actividad biológica. Se selecciona trigo y lechuga como especies receptoras. El trigo como representante de las plantas monocotiledóneas y por su robustez y la lechuga por ser un representante de las plantas dicotiledóneas y por su sensibilidad frente a moléculas sintéticas o aleloquímicos durante su etapa de germinación (Schonbeck, 2011).

También se evalúa un método de extracción discontinuo asistido por ultrasonido. Esta técnica ha sido reportada como una de las más versátiles en extracción de metabolitos de importancia farmacológica y alimentaria (Vilkhu, Mawson, & et al, 2008). Entre sus numerosas ventajas se hallan el uso de disolventes no tóxicos o menos contaminantes, mejora en los tiempos de proceso y rendimientos altos.

Finalmente, pero no menos importante, se postula una planta de la medicina tradicional mexicana para el control de especies vegetales, ya sea favoreciendo o inhibiendo su crecimiento. La corteza de cuachalalate posee numerosas características terapéuticas en la medicina tradicional: es capaz de remover lesiones provocadas por úlceras gástricas e incluso curar cáncer de estómago (UNAM, 2012).

Muchas de estas propiedades terapéuticas han sido asociadas al gran contenido de sustancias polifenólicas en la corteza (Soto Hernández, Olivera Ortega, & et al, 1999), haciendo a la planta, una candidata de estudio ideal. Los polifenoles son un grupo de metabolitos secundarios que, según la literatura, tienen efectos variados en el desarrollo y supervivencia de las plantas.

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en el Laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia 2012/2013.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES PARA EL CONTROL DE PLAGAS

Muchos principios activos, pese al desarrollo de la Química Farmacéutica, se siguen obteniendo de las plantas, ya sea porque no son fáciles de extraer o bien porque el precio de la síntesis química de algún análogo es prohibitivo (Villar del Fresno, 1999).

Sin embargo, la búsqueda de productos naturales para el control de las plagas de la agricultura ha sido la menos satisfactoria, a pesar de que ser un fenómeno común en la naturaleza. Históricamente, los productos botánicos han sido usados mucho antes que otra clase de pesticidas (Lira Saldivar & et al, 2007).

Ejemplo de ello son los numerosos tratados escritos por Teofrasto, Cato el monitor, Virgilio, Columela y Plinio el Viejo que nos hablan sobre el uso del aceite esencial de diferentes plantas para regular la presencia de plagas, así como, numerosas especies vegetales que tienen efectos favorecedores o de competencia con respecto a otras plantas.

Podemos mencionar al nogal (*Juglans nigra* L. /*Juglans regia* L.), descrito por Plinio. Este autor señala que la sombra de este árbol es “densa, causa dolor de cabeza en el hombre y daña a cualquier cosa plantada en su vecindad...” (Blanco, 2006). Algunos miembros de esta familia botánica (*Juglandaceae*) producen juglona (5-hidroxi-1,4-nafotquinona), sustancia que logra inhibir a un gran número de especies (maíz, jitomate, manzana, papa, sandía, pepino) en concentraciones tan bajas como 1  $\mu M$  (De Albuquerque & et al, 2010).

Además del anterior, existe sólo un puñado de ejemplos donde los productos naturales han sido utilizados efectivamente en el control de plagas, como la fosfinotricina (Figura 1), proveniente de *Streptomyces higrosocopis*.

El uso de metabolitos de origen natural en el control de diferentes malas hierbas ha resurgido, debido a la resistencia que presentan a herbicidas sintéticos. Otra ventaja que ha demostrado el uso de productos naturales es que muchos funcionan en sitios activos no explotados por sus contrapartes sintéticas (Dayan, Owens, & Duke, 2012).



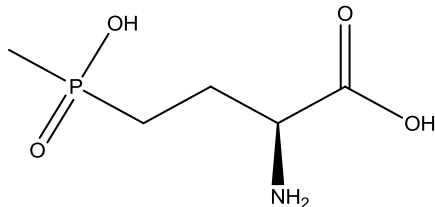


Figura 1. Fosfinitricina, metabolito natural en el control de especies vegetales nocivas

(Duke, 2010)

## 2. ALELOPATÍA

El término alelopatía (del griego *allelon* = uno al otro, del griego *pathos* = sufrir, efecto injurioso de uno sobre otro) fue utilizado por primera vez por Hans Molisch en los años setentas (Duke, 2010) y se refiere a cualquier proceso biológico adverso en el crecimiento o supervivencia de una planta que involucra metabolitos secundarios, producidos por plantas, bacterias, hongos u otros organismos; dentro sistemas biológicos, tanto naturales como controlados.

El descubrimiento y estudio de agentes alelopáticos se asemeja a la manera en que en la industria farmacéutica obtiene principios activos de fuentes naturales: se obtienen extractos de diferentes partes de la planta con diferentes solventes y son puestos a prueba en diferentes ensayos o modelos biológicos.

Aunque una planta o sus extractos puedan presentar actividad biológica de importancia, deben de establecerse 3 condiciones primordiales para poderse considerar como una especie con potencial alelopático:

- a) Nicho ecológico, que establece sí la interferencia existe en la naturaleza.
- b) Naturaleza química, que involucra la fase de aislamiento, identificación y síntesis.
- c) Mecanismos fisiológicos, pruebas bioquímicas, fisiológicas y/o moleculares que demuestren la interacción de la especie receptora (o blanco de acción) (Vyvyan, 2002).

El ensayo que se utiliza con más frecuencia es el porcentaje de germinación. Este se efectúa en cajas Petri o cajas de vidrio o plástico, sobre un soporte de papel o material absorbente y se permite que las semillas se desarrollen por un periodo de tiempo. Posteriormente, las semillas que brotaron se contabilizan y reportan en porcentajes para realizar comparaciones entre tratamientos.

Si los resultados son satisfactorios, se prosigue entonces con ensayos en campo y/o en invernadero, con los procesos de identificación, aislamiento, purificación y re-ensayo como cualquier molécula de interés proveniente de fuentes naturales.

Sin embargo, en ocasiones el uso de la prueba de germinación no genera datos concluyentes, dada la complejidad que existe en las relaciones de simbiosis/competencia entre dos o más especies vegetales a niveles metabólicos y químicos (Interjit, 1996).

Además, la liberación de los llamados “aleloquímicos” no se da únicamente en tejidos aislados ni en suelo, sino que también pueden dispersarse en otros medios como el aire o el agua.

### LIBERACIÓN DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS

La mayoría de los agentes alelopáticos son sintetizados y almacenados en forma libre o conjugada y son liberados al entorno en respuesta a las diferentes clases de estrés biótico (ataque de plagas, depredación o enfermedad) o abiótico (sequías, inundaciones, cantidad de nutrientes) que pueden existir. El modo de liberación del agente alelopático dependerá de su naturaleza química y de la concentración a la que se encuentre en un tejido vegetal específico (De Albuquerque & et al, 2010).

### VOLATIZACIÓN

Se presenta en plantas productoras de terpenos y terpenoides, como las halladas en las familias botánicas Lauráceas, Mirtáceas, Labiáceas; entre otras. Este tipo de liberación se halla frecuentemente en los ecosistemas mediterráneos y desérticos (Sampietro, 2001).

Muchas de las moléculas liberadas de este modo también han mostrado actividad insecticida y de disuasorio alimenticio.

### LIXIVIACIÓN

Se describe como la remoción de sustancias presentes en la planta por efecto de la lluvia, niebla o rocío. Entre las moléculas liberadas de este modo se encuentran compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides.

Este modo de liberación se ve afectado por factores como la edad de la planta, el tipo de tejido, la abundancia del metabolito y la naturaleza de la precipitación (Sampietro, 2001).

#### EXUDADOS RADICULARES

La mayoría de agentes alelopáticos conocidos son liberados mediante esta vía, donde la raíz libera numerosos compuestos en respuesta a diferentes estímulos. La liberación de estas sustancias depende de la humedad, la cantidad de luz y la edad del vegetal.

Las moléculas distribuidas por esta vía tienen una amplia gama de actividades biológicas. Entre las más importantes se destacan: reducción en el germinado de semillas, crecimiento de brotes y raíces y la incorporación de nutrientes del suelo (Sampietro, 2001).

#### DESCOMPOSICIÓN DE RESIDUOS VEGETALES

Las hojas marchitas, flores y otros tejidos vegetales en decadencia constituyen una buena fuente de agentes alelopáticos durante su descomposición. La liberación de estos últimos está determinada por el tipo de residuo y las condiciones de descomposición.

Los compuestos liberados por la planta al suelo sufren transformaciones, que frecuentemente pueden generar productos y subproductos con mayor actividad biológica que sus precursores (Sampietro, 2001).

En la Fotografía 1. se señalan los 4 mecanismos de dispersión de los agentes alelopáticos.



**Fotografía 1 . Modos de dispersión de aleloquímicos.**

Fotografía tomada en el Parque Bicentenario, México D.F. 2010

## ENSAYOS EN ALELOPATÍA

Además de los estudios de germinación, también existen pruebas, directas o indirectas, que determinan los efectos físicos, químicos y metabólicos que se generan de las relaciones espacio-temporales entre las diferentes especies vegetales.

Dichas consecuencias pueden ser estudiadas con diferentes modelos experimentales. En la Tabla 1 se mencionan algunos de los ensayos más utilizados a nivel de laboratorio y los datos que pueden ser obtenidos a través de su uso.

**Tabla 1. Pruebas de laboratorio que pueden evidenciar el modo de acción de los aleloquímicos a nivel metabólico y funcional**

<b>Prueba</b>	<b>Objetivo.</b>
Longitud de radícula	Determina si el aleloquímico o grupo de aleloquímicos impide el desarrollo de una semilla o planta.
Índice mitótico	Un ensayo más selectivo que el anterior, nos permite determinar si el aleloquímico está afectando la mitosis vegetal. Esta prueba se efectúa en raíz de cebolla.

Pruebas de conductividad membranal.	Determina si hay modificaciones en la estructura de pared y membrana celular a través de una diferencia de potencial generada por el equilibrio/desequilibrio inter e intracelular.
Eficiencia de fotosíntesis.	Estudia sí la capacidad de respiración se ha visto ralentizada o detenida y se realiza mediante la medición de la concentración de clorofilas (A y B) o mediante el intercambio de CO <sub>2</sub> .

Fuente: (Vyvyan, 2002)

Otras pruebas evalúan los efectos de los aleloquímicos a nivel ambiental, como en invernaderos o campos de prueba.

- Pruebas de competencia

La competencia biológica ocurre cuando dos o más individuos usan los mismos recursos y esos recursos son insuficientes para satisfacer sus demandas (individuos competidores) (Saenz Peña & et al, 2008).

Se estudia un número de especies blanco en presencia de otros individuos en un medio controlado. Los variables a controlar son la densidad poblacional de la planta de la que se sospecha actividad alelopática y la de la especie receptora. Se pueden realizar en invernadero, en laboratorio y en experimentos de campo (De Albuquerque & et al, 2010).

- Toxicidad residual en el suelo

En este ensayo se colecta el sustrato que rodea a la rizosfera de la especie estudiada y se utiliza directamente como medio de soporte y crecimiento, o se realizan lavados del mismo sustrato para realizar ensayos de germinación con la solución de enjuague.

- Detoxificación de sustrato

En esta variación experimental, se adiciona carbón activado al sustrato en el que se encuentra la planta. Posteriormente, se utiliza este medio para plantar a la especie inicial con respecto a otra y dilucidar sus relaciones de competencia, si es que estas existen. Este es uno de los experimentos más controversiales, ya que el carbón activado tiene efectos negativos al inhibir la captación de compuestos emanados por

una planta hacia la otra, compuestos que podrían tener impacto en el metabolismo de alguna de las especies involucradas (De Albuquerque & et al, 2010).

- Hidroponia

Uno de las técnicas que ha permitido estudios más especializados sobre la dispersión y captación de aleloquímicos y ventajoso desde el punto de vista de económico y técnico. Nos permite introducir los aleloquímicos o productos sintéticos a la especie blanco sin afectar la producción de otros metabolitos, evitando además la presencia de interferencias químicas ajenas a la planta (sustancias de la microflora, medio de soporte etc.), además de que la colecta de compuestos que emanan de las raíces para su identificación y caracterización es más sencilla (De Albuquerque & et al, 2010).

### 3. GERMINACIÓN

La germinación es una etapa de desarrollo de las semillas que se caracteriza por un metabolismo muy acelerado, que tiene como objetivo convertir el embrión contenido en una semilla, en una planta adulta que pueda valerse por sí misma (Garcia Brejo, Rosello Caselles, & Santamarina Siurana, 2006).

#### PROCESO GERMINATIVO

El entendimiento de este fenómeno nos permite comprender de manera más adecuada el desarrollo de las semillas y como se ven afectadas por diferentes factores ambientales y fisiológicos. La germinación se divide en 3 fases primordiales:

a) Fase de hidratación o imbibición

Consiste en la entrada de agua a los tejidos y esta es determinada por los diferentes potenciales hídricos presentes en el interior y exterior de la semilla. La actividad respiratoria se incrementa.

b) Fase de germinación

Se reduce la absorción de agua por parte de la semilla. En esta fase, se producen los cambios metabólicos necesarios para el desarrollo de la planta, como la activación de enzimas hidrolíticas y una activación temprana del metabolismo de la semilla (Grajalez Muñiz, 2010).

c) Fase de crecimiento o morfogénesis de la radícula

Es la última fase de la germinación. Se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase también se caracteriza porque la absorción de agua aumenta de nueva cuenta junto con la actividad respiratoria.

La duración de estas diferentes fases se ve gobernada por las características de las semillas, como la permeabilidad de su cubierta al agua o a gases. En las dos primeras fases de la germinación los procesos que ocurren son reversibles. A partir de la fase de crecimiento o morfogénesis, la semilla entra en una situación fisiológica irreversible (García Brejo, Rosello Caselles, & Santamarina Siurana, 2006) continuando así su desarrollo a plántula.

#### 4. BIOSÍNTESIS DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS

La mayoría de los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios derivados de las rutas del acetato-mevalonato, acetato-malonato o del ácido shikímico:

- De la ruta del acetato-mevalonato: los terpenos y esteroides.
- De la ruta del acetato-malonato: ácidos grasos insaturados libres, poliacetilenos, antraquinonas, quinonas complejas, alcoholes de cadena lineal y floroglucinol.
- De la ruta del ácido shikímico: los fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, el ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, sulfuros, glucósidos, alcaloides, cianohidrininas, taninos hidrolizables y no hidrolizables.

Existen, además, otros compuestos que provienen de rutas mixtas, como algunos flavonoides (Sampietro, 2001).

En la Figura 2, se muestra un resumen general del metabolismo vegetal, haciendo mención de las 3 rutas anteriores.

## NATURALEZA QUÍMICA DE ALGUNOS AGENTES ALELOPÁTICOS

Además del quinteto de hormonas vegetales (etileno, giberelinas, ácido abscísico y compuestos relacionados, auxinas y citocininas) que rige los ciclos vitales de las plantas, existen otros compuestos que han mostrado actividad regulatoria en el desarrollo y/o crecimiento.

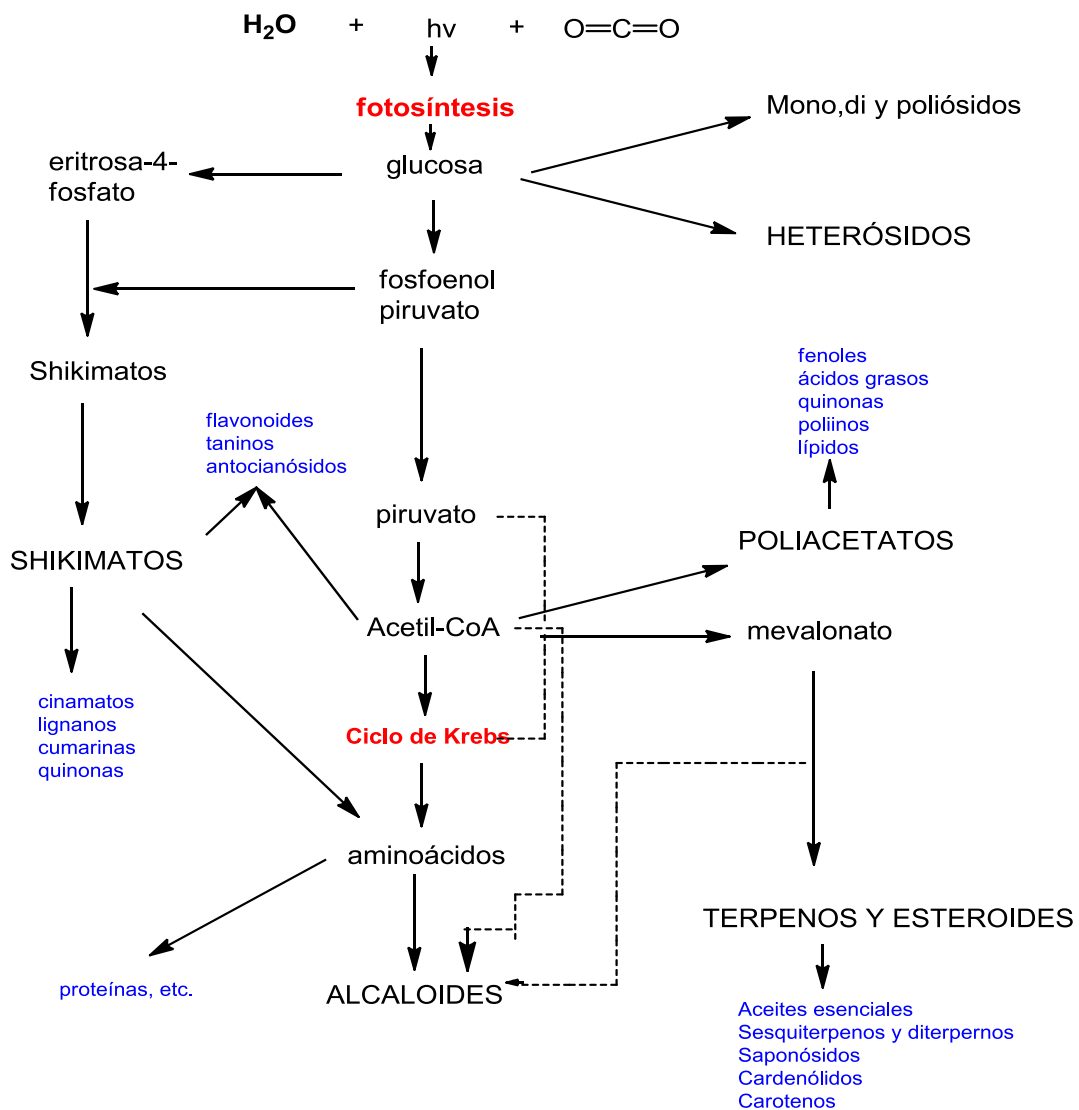


Figura 2. Rutas biosintéticas de metabolitos secundarios.

Fuente: (Bruneton, 2001)



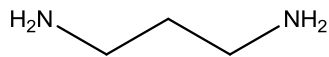
## POLIAMINAS

Las poliaminas son sustancias que se acumulan en la planta después de una actividad proliferativa abundante (desarrollo de las flores, “cuajo” del fruto, etc.). Entre los miembros representativos de este grupo, se encuentran la putrescina, la espermidina y el diaminopropano. Estas moléculas provienen del metabolismo de los aminoácidos arginina y ornitina.

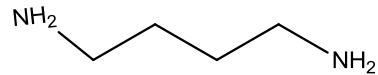
Su regulación positiva se efectúa mediante las auxinas, aunque formalmente no se considera a las poliaminas como fitohormonas. Su degradación se lleva a cabo mediante la enzima oxidativa de diaminas. El exceso o acumulación de estos metabolitos tiene efectos dañinos en las plantas.

Los efectos fisiológicos a destacar son:

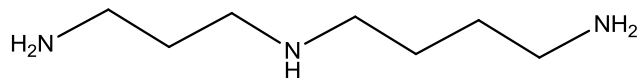
- Estabilizador de la síntesis de DNA y RNA.
- Crecimiento de los frutos después de la polinización.
- Estabilizador de membranas, principalmente bajo condiciones de estrés hídrico (Jankievics, 1989).



Diaminopropano



Putrescina



Espermidina

**Figura 3. Poliaminas**

Fuente: (Jankievics, 1989)

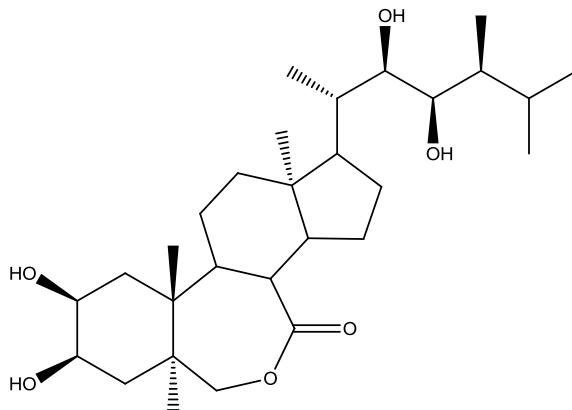
## BRASINOESTEROIDES

Estas sustancias ocurren naturalmente en el medio silvestre en diferentes órganos vegetales. La primera vez que se les aisló, fue en los años setentas en el polen de *Brassica napus* L. La síntesis de este tipo de moléculas de esta naturaleza se da a partir del pirofosfato de farnesilo:

- a) Pirofosfato de farnesilo → escualeno → cicloartenol → campesterol<sup>1</sup> → campestanol → brasinolidas/brasinosteroides

Estimulan el crecimiento de los tallos e hipocótilos, similar a las auxinas; pero en raíces, los brasinoesteroides o brasinolidas estimulan el crecimiento mientras que las auxinas los inhiben. Otra acción sinérgica que ocurre con las auxinas es la producción de etileno (Jankievics, 1989).

Un efecto único de estas moléculas es la resistencia que proveen a las plantas frente a diferentes efectos adversos, como las heladas, las sequías, la salinidad del suelo y del agua y la presencia de patógenos como bacterias (*Pseudomonas syringae*) y hongos (Jordan & Casaretto, 2006).



**Figura 4. Estructura química de brasinolida**

Fuente: (Jordan & Casaretto, 2006)

<sup>1</sup> Es el principal intermediario de donde derivan los brasinoesteroides. Otros compuestos relacionados son el colesterol, obtusifoliol y sitosterol.

## COMPUESTOS FENÓLICOS

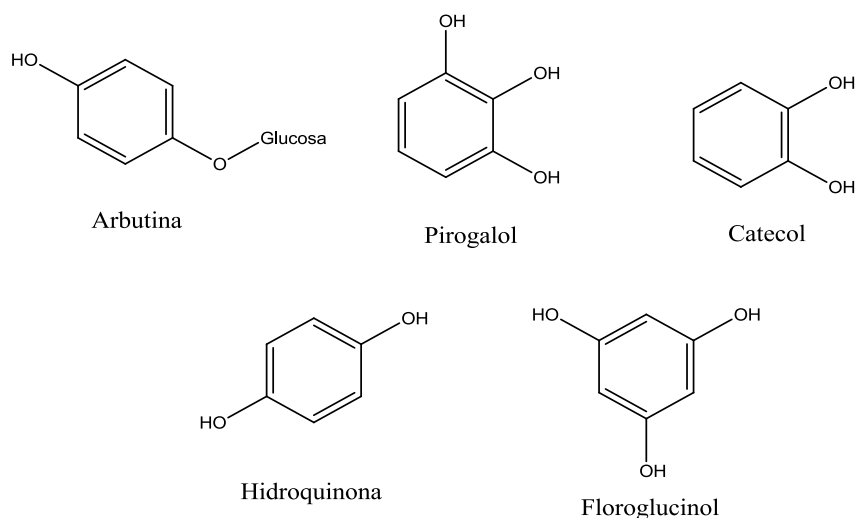
Dentro del contexto de productos naturales, el término “compuestos fenólicos” tiene un significado laxo, pero generalmente engloba compuestos que incluyen estructuras simples como: fenoles, ácido hidroxibenzoico y sus derivados, aldehídos, ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, taninos y algunos flavonoides.

Las principales rutas biosintéticas de estos compuestos son la ruta del shikimato o ácido shikímico y la de los policétidos (Hui-Li, Wang, & Ruan, 2010).

Dado el gran número de compuestos que abarca esta familia de moléculas, se pueden mencionar varios efectos, de los que cabe destacar:

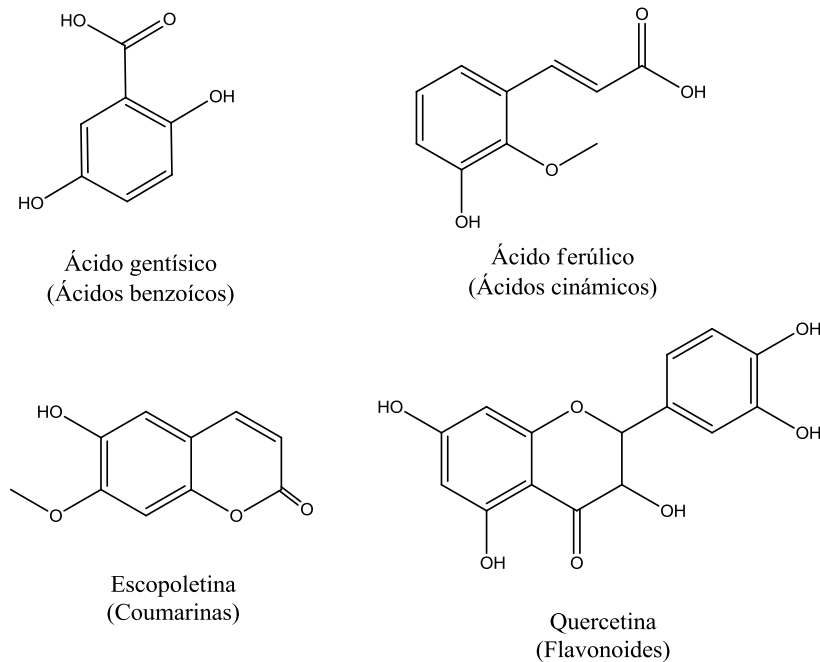
- Los fenoles simples favorecen el metabolismo acelerado de AIA (ácido indol acético) mediante la estimulación de la oxidasa de AIA.
- Los catecoles ralentizan el metabolismo de las auxinas.
- El ácido salicílico favorece la floración, mientras que el ácido tánico la inhibe.
- El ácido acetil salicílico bloquea los estomas, reduciendo la transpiración de las hojas (Jankievics, 1989).

En general, se ha observado que los compuestos fenólicos o polifenólicos afectan numerosas etapas del desarrollo de las plantas y su producción o depleción está asociada a numerosos factores bióticos y abióticos (Interjit, 1996).



**Figura 5. Mono, di y trifenoles con actividad alelopática**

Fuente: (Jankievics, 1989)



**Figura 6. Polifenoles y grupo químico al que pertenecen**

Fuente: (Jankievics, 1989)

## 5. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (UAE)

En los últimos años, la industria extractiva se ha inclinado hacia procesos más “verdes” (ecológicamente amigables), baratos y con rendimientos altos. Uno de estos es la extracción asistida por ultrasonido (UAE/ Ultrasound assisted extraction, por sus siglas en ingles).

El concepto de ultrasonido contempla a cualquier sonido con una frecuencia tan alta, que el oído humano no puede detectar, y se considera que este se halla arriba de los 20 kHz, pero menor que las microondas [Rango: 20 kHz- 100 MHz] (Chemat, Zill-e, & Khan, 2011).

Los tipos del ultrasonido pueden ser clasificados en dos áreas principales:

- a) Ultrasonido de poder. Es el sonido que se encuentra dentro del rango de frecuencias de 20-100 kHz y es capaz de influenciar la química de las moléculas y procesos extractivos.

b) Ultrasonido de diagnóstico. Es el sonido que abarca frecuencias por encima de los 5 MHz, no genera el fenómeno de cavitación y se utiliza para técnicas de monitoreo y diagnóstico (Leonelli & Mason, 2010).

La gran eficiencia de este método es atribuida a la propagación de ondas ultrasónicas a través del disolvente, presentándose el fenómeno denominado como cavitación (Vilkhu, Mawson, & et al, 2008).

En la cavitación, una onda sonora genera una presión variable sinusoidal en algunos espacios existentes en la solución. Como cualquier onda, esta es transmitida en ciclos de compresión y rarefacción (expansión).

Cuando la presión negativa de los ciclos de rarefacción excede las fuerzas atrayentes de entre las moléculas del líquido, se forma un vacío. Este vacío en la estructura toma un poco de vapor de la solución; permitiéndole no colapsar durante los ciclos de compresión, creciendo en tamaño en ciclos sucesivos que forman a la burbuja (Leonelli & Mason, 2010).

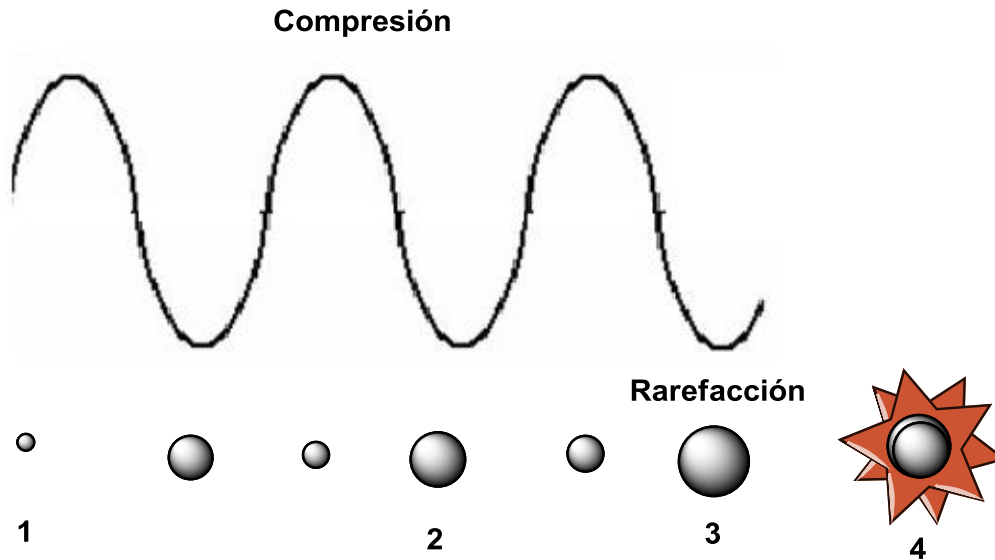
El número de burbujas producidas durante el ciclo de rarefacción es proporcional a la densidad de puntos débiles en el fluido. Los puntos débiles son definidos como las impurezas gaseosas que posee cada líquido (Leong, Ashokumar, & Kentish, 2011).

Eventualmente algunas de estas burbujas alcanzan un tamaño crítico, colapsando explosivamente. Se estima que se alcanzan temperaturas arriba de los 5000 K y presiones superiores a las 200 atm. Un resumen gráfico del proceso descrito se halla en el Esquema 1.

Cuando estas burbujas colapsan en la superficie de los materiales sólidos, la alta presión y temperatura generan microjets que van hacia dichas superficies. Estos microjets a su vez, destruyen el material de manera más completa, gracias al flujo turbulento que presentan (Chemat, Zill-e, & Khan, 2011).

Esta propiedad modificadora de materiales, implementada por primera vez en los Estados Unidos alrededor de los años 20's, además del tipo de solventes utilizados, han permitido que la extracción asistida por ultrasonido se perfila como una de las técnicas más novedosas en numerosas áreas de investigación y desarrollo.

Por ejemplo, actualmente el uso de este método ha sido generado resultados exitosos en la obtención de: vainillina, aceites de almendras, saponinas del ginseng, proteínas e isoflavonas de soya, polifenoles, aminoácidos y cafeína del té verde, piretrinas de las flores etc. (Shirsath, Sonawane, & Gogate, 2012).



**Esquema 1. Mecanismo de acción de la extracción asistida con ultrasonido.**

Cavitación: (1) una burbuja se genera dentro del medio de disolución, (2) durante ciclos de rarefacción y condensación la burbuja crece, (3) la burbuja alcanza un tamaño donde se vuelve altamente inestable y (4) finalmente la burbuja colapsa (Leong, Ashokumar, & Kentish, 2011).

Otra de las posibles aplicaciones que tiene en la industria es la transformación de desechos (cáscaras, bagazo, piel, etc.) en otros compuestos de importancia alimenticia o farmacológica (Vilkhu, Mawson, & et al, 2008), desinfección de dispositivos y superficies y en la mejora de propiedades organolépticas de los alimentos, entre otros.

## 6. CUACHALALATE

El cuachalalate es la corteza seca del árbol *Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede. Esta especie es nativa de México y pertenece a la familia *Julianaceae*. Otros nombres comunes con que se le conoce son: palo de rosa, cuachalala, maxiterán y volador.

Por lo general crece en selvas bajas caducifolias en los estados de Jalisco, Colima, Guerrero, México, Puebla, Nayarit, Morelos, Michoacán, Oaxaca y la Cuenca de Balsas. Regularmente, la especie existe en tierra caliente en los climas semitropicales y templados. El vocablo <<cuachalalate>> proviene del término náhuatl “cuauchachalatl” que significa árbol de la chachalaca.

El árbol llega alcanzar los 10 m de altura, es de tronco torcido, la parte lisa de la corteza moreno grisáceo o gris plomizo con grandes escamas y la interna tiene una coloración que va del crema rosado a rosado rojizo, las hojas están agrupadas en las puntas de las ramas en número de 3 a 5, en el anverso son verde opaco y en el reverso, verde grisáceo; el fruto consiste en nueces alargadas, abultadas, aladas de 2.5 a 5 cm de largo y color verde pálido (García González, 2006).

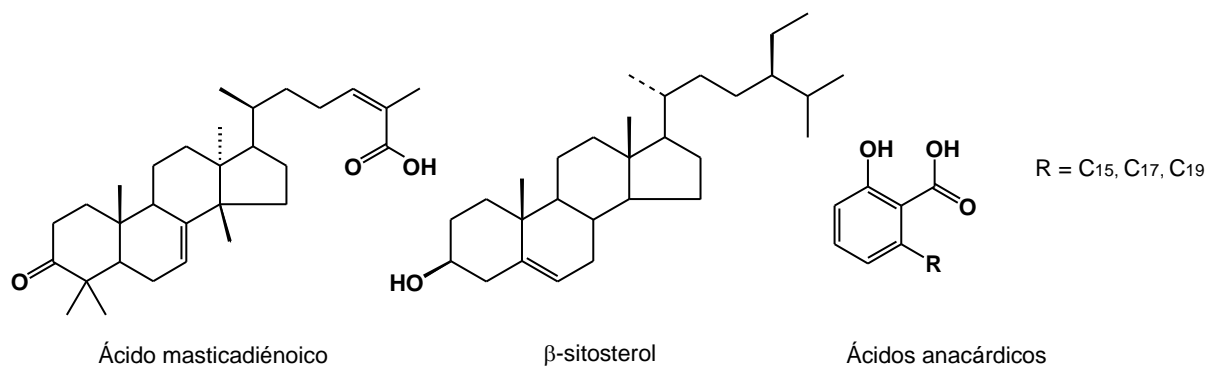


**Fotografía 2. Corteza de cuachalalate.**

Foto tomada en el Laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia de la FES Cuautitlán, 2012

#### COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN LA CORTEZA DE CUACHALALATE

La investigación efectuada en esta corteza ha permitido la identificación de diferentes triterpenoides como los ácidos 3- $\alpha$  y 3 epi-masticadiénoico: los compuestos bencílicos, también descritos como anacárdicos, ácidos 6-heptadecil, 6-nonadecil- y 6-pentadecil salicílico (UNAM, 2012); y el ácido 3-dodecil-1,8-dihidroxi-naftóico. (Castillo J., Rivero C., Celis, & Romero, 2007), así como el esteroide  $\beta$ -sitosterol y taninos hidrolizables y condensados (García González, 2006). En la Figura 7 se pueden observar las estructuras de algunos de los componentes mayoritarios de esta corteza.



**Figura 7. Compuestos mayoritarios presentes en la corteza de cuachalalate**

Fuente: (García González, 2006) (UNAM, 2012)

### USO ETNOBOTÁNICO Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

El uso etnobotánico es muy amplio; existen descripciones variadas de los malestares que alivia, así como la forma en que es administrada:

- El cocimiento de la corteza es capaz de aliviar las molestias respiratorias, las dolencias del riñón, infecciones y malestares estomacales, mordeduras o piquetes de animales venenosos, fiebre puerperal, caída de matriz, endurece las encías, etc.
- Aplicada en forma de fomentos o el polvo, alivia las heridas y logra acelerar la cicatrización.
- Macerada, esta planta es capaz de aliviar diferentes dolencias estomacales y tratamiento de úlceras.
- Entre otros nichos terapéuticos, se le otorga propiedades como antidiabético, contra la gangrena, contra el acné, la caída del cabello, entre otras (UNAM, 2012) .

En el ámbito farmacológico, muchas de estas propiedades han sido investigadas y aplicadas a diferentes modelos de estudio para verificar los atributos concedidos por la medicina tradicional. Los efectos mencionados se encuentran descritos en la Tabla 2.



**Tabla 2. Estudios farmacológicos efectuados con cuachalalate**

<b>Actividad farmacológica</b>	<b>Modelo de estudio</b>
Antimicrobiana	Estudios <i>in vitro</i> en <i>Helicobacter pylori</i> y como antituberculoso (Castillo J., Rivero C., Celis, & Romero, 2007).
Hipercolesteremiante	Estudios en ratas Wistar con la fracción hexánica (Mata, Calzada, & Navarrete, 1991).
Antiinflamatorio	La fracción acuosa y hexánica muestran una actividad antiinflamatoria importante (Oviedo Sánchez, Ramirez Apán, & et al., 2004).
Gastroprotector.	La fracción metanólica tiene efecto gastroprotector en ratas Wistar (Navarrete, Martínez Uribe, & Reyes, 1998).

Además de las virtudes descritas en la etnobotánica y en la investigación en productos naturales; algunas organizaciones e individuos han obtenido patentes que utilizan propiedades no exploradas de la corteza sola o en conjunción con otras especies botánicas como remedio para las hemorroides (Flores Garza, 1999), generando alivio de malestares intestinales (Niazi, 2002), tónico para el cabello débil (Hibino, 2004) , protector solar (Mas Oliva & Hurtado Bocanegra, 2012) entre otros.

### III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad alelopática de la fracción soluble del extracto etanólico de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede, obtenidos mediante la técnica denominada extracción asistida por ultrasonido (UAE), utilizando ensayos de germinación para determinar el posible uso de una planta de la medicina tradicional mexicana como promotor o inhibidor del crecimiento de otras plantas.

### IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la extracción de la corteza de cuachalalate mediante el uso de ultrasonido para determinar el rendimiento de dicha técnica.
- Evaluar la capacidad alelopática que pueden presentar diferentes concentraciones de la fracción hidrosoluble del extracto etanólico de cuachalalate en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *Paris Island*).
- Determinar el contenido de polifenoles presentes en las soluciones de trabajo mediante la técnica de Folin-Ciocalteu.
- Efectuar el tamizaje fitoquímico del extracto.

## V. MÉTODO EXPERIMENTAL

La siguiente sección será dividida en 3 partes: Identificación y proceso extractivo, estandarización de los extractos y ensayos de actividad biológica.

### IDENTIFICACIÓN Y PROCESO EXTRACTIVO

La corteza del árbol se compró en el Mercado Sonora, localizado en México D.F. en el mes de octubre del año 2011. La caracterización botánica se realizó en el Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

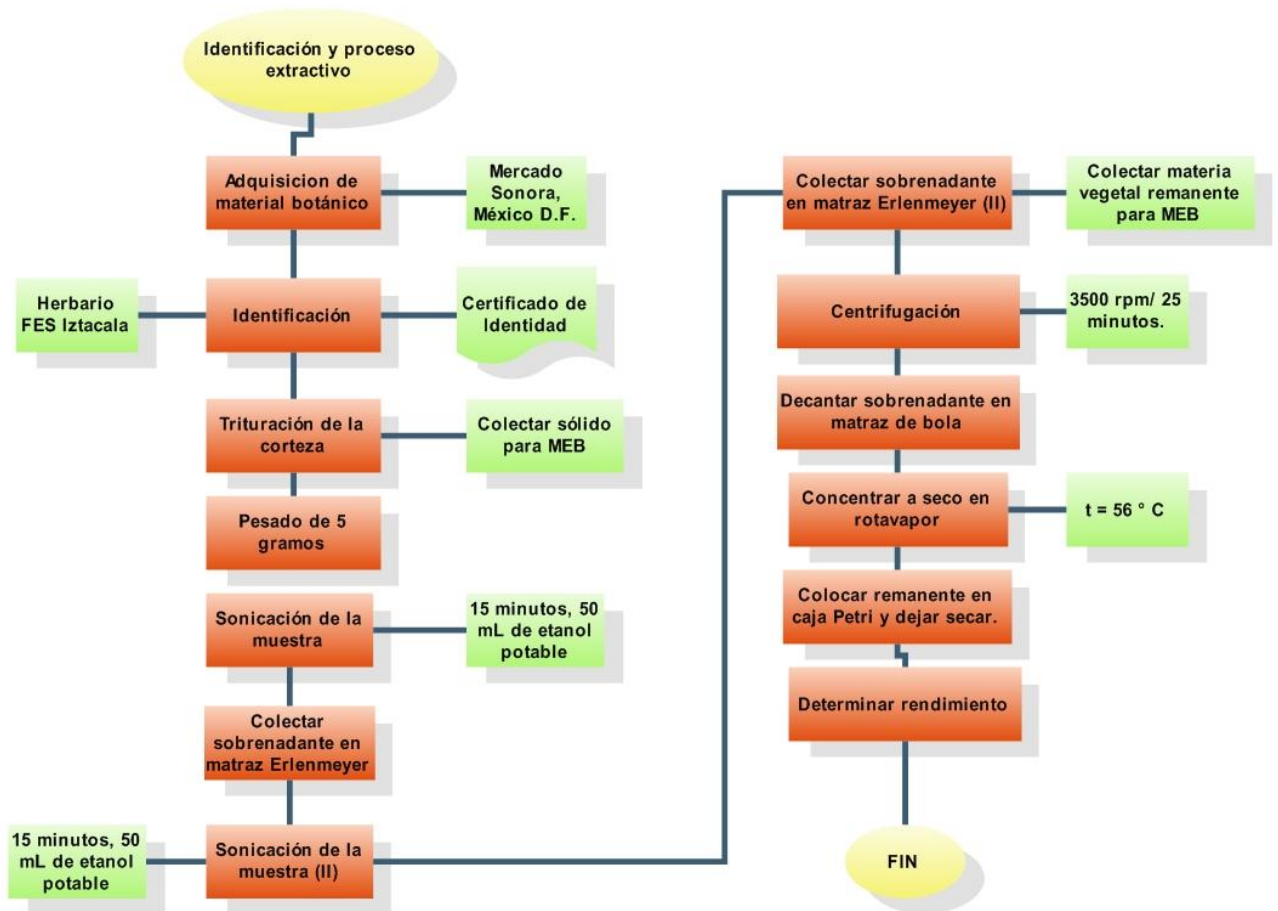
La corteza de cuachalalate es triturada con ayuda de un molino de grano. Una porción del polvo obtenido es guardada para su posterior estudio con MEB. Después se pesan aproximadamente 5 gramos del triturado en un frasco ámbar de 100 mL en una balanza digital.

Se adiciona 50 mL de etanol potable (96 ° G.L.) al frasco y se sónica la materia prima con ayuda del dispositivo de ultrasonido por 15 minutos. Pasado este tiempo se colecta el extracto líquido y se coloca en un matraz Erlenmeyer. El proceso extractivo continúa con la adición de otros 50 mL de etanol potable a la materia prima y se sonica nuevamente.

Durante la ejecución se debe observar que la temperatura no aumente a más de 35 ° C, ya que algunos componentes químicos de la materia prima pueden comenzar a descomponerse a esas temperaturas (Shirsath, Sonawane, & Gogate, 2012).

La solución obtenida es centrifugada a 3500 revoluciones durante 25 minutos para remover cualquier partícula insoluble o corteza que se haya obtenido durante el trasvase del extracto. Se decanta el sobrenadante en un matraz de bola de 250 mL.

Se concentra el extracto con ayuda del rotavapor a una temperatura de 56 ° C. El extracto remanente es evaporado en una caja Petri limpia. Una vez seca, se remueve de la caja con ayuda de una espátula y se determina el rendimiento. Para corroborar los efectos que tiene la sonicación sobre la materia prima, se realizaron micrografías con MEB para observar si existían modificaciones estructurales en la materia vegetal después de la sonicación. Las muestras a ser evaluadas son: antes del tratamiento, después del tratamiento y maceración con agitación por 30 minutos. El resumen del proceso se encuentra descrito en el Diagrama 1.



**Diagrama 1. Identificación y proceso extractivo**

## ESTANDARIZACIÓN DEL EXTRACTO

Inicialmente, se evaluaron diferentes agentes surfactantes y/o codisolventes para favorecer la solubilidad total del extracto. Se probaron los siguientes agentes surfactantes: Tween 80, Spam 80, y Triton X-100 en concentraciones de 1 y 2 %. Sin embargo, se descartó su uso porque dentro de sus atributos inherentes se halla la modificación de la tensión superficial del medio (Salager, 2002).

Al modificarse esta propiedad, el potencial hídrico se ve comprometido, sometiendo a la semilla a un estrés innecesario, modificando las condiciones de desarrollo y por tanto los resultados.

Se opta por el uso de DMSO (Dimetilsulfóxido) acuoso al 1%, ya que este disolvente es el más utilizado en los ensayos de herbicidas y alelopatía (Colegate & Molyneux, 2007).

Los ensayos de solubilidad se efectuaron con la máxima cantidad de extracto seco a utilizar (0.250 g) para preparar 50 mL de una solución de concentración 5 mg/mL y con la mínima (0.050 g) para una solución de 1 mg/mL, utilizando como disolvente una solución acuosa de DMSO al 1%.

Después de homogenizar la solución durante 1 hora mediante agitación magnética, se filtran las soluciones mediante gravedad. Posteriormente, se toman los papeles filtros previamente pesados y se introducen en una estufa toda la noche a 50° C para remover cualquier traza de disolvente. Al concluir, se calcula la masa de sólido no disuelto pesando los papeles secos.

En una balanza analítica digital se pesa la cantidad necesaria de extracto seco para el ensayo de acuerdo a los ensayos de solubilidad. Continúa el proceso con la adición de una solución acuosa de DMSO al 1% y con ayuda de un agitador magnético se homogeniza durante 1 hora.

La solución obtenida se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos. El sólido remanente es colectado y pesado en un vaso de precipitados limpio y seco para determinar la cantidad real de sólido disuelto. El sobrenadante es decantada en un matraz aforado de 50 mL y se aforan. Hasta su uso, las soluciones son refrigeradas.

Para llevar a cabo la cuantificación de polifenoles totales, se prepara una curva de calibración, utilizando ácido tánico como estándar (Rangma, 1986), mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). Se toma este metabolito (polifenol) como referencia por la literatura consultada (García González, 2006). En la Tabla 3 se encuentra el modo de preparación de los sistemas para la curva de calibración.

**Tabla 3. Preparación de sistemas para curva de calibración de ácido tánico**

<b>Sistema</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
STD de ácido tánico (1 mg/mL).	0	20 $\mu$ L	40 $\mu$ L	60 $\mu$ L	80 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Reactivo FC	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
<b>Reposar por 5 minutos</b>						
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20 %.	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
<b>Reposar por 2 horas; V.f.= 10 mL</b>						

Para realizar la cuantificación de polifenoles totales en las muestras, se toman 50 microlitros y se prosigue con la preparación de los sistemas siguiendo lo señalado en la Tabla 3.

El extracto de cuachalalate es sometido a un proceso de tamiz fitoquímico, para describir de manera cualitativa los componentes presentes en el mismo (Barba, 1997) (Lastra & Cuéllar, 1994).

Las pruebas se realizan en el extracto etanólico directamente y en la solución de 1 mg de extracto seco/mL de acuerdo al Apéndice C.

Los resultados obtenidos se registrarán como: abundante (+++), moderado (++) , escaso (+) y negativo (-) (Domínguez, 1988). El resumen de proceso se encuentra descrito en el Diagrama 2.

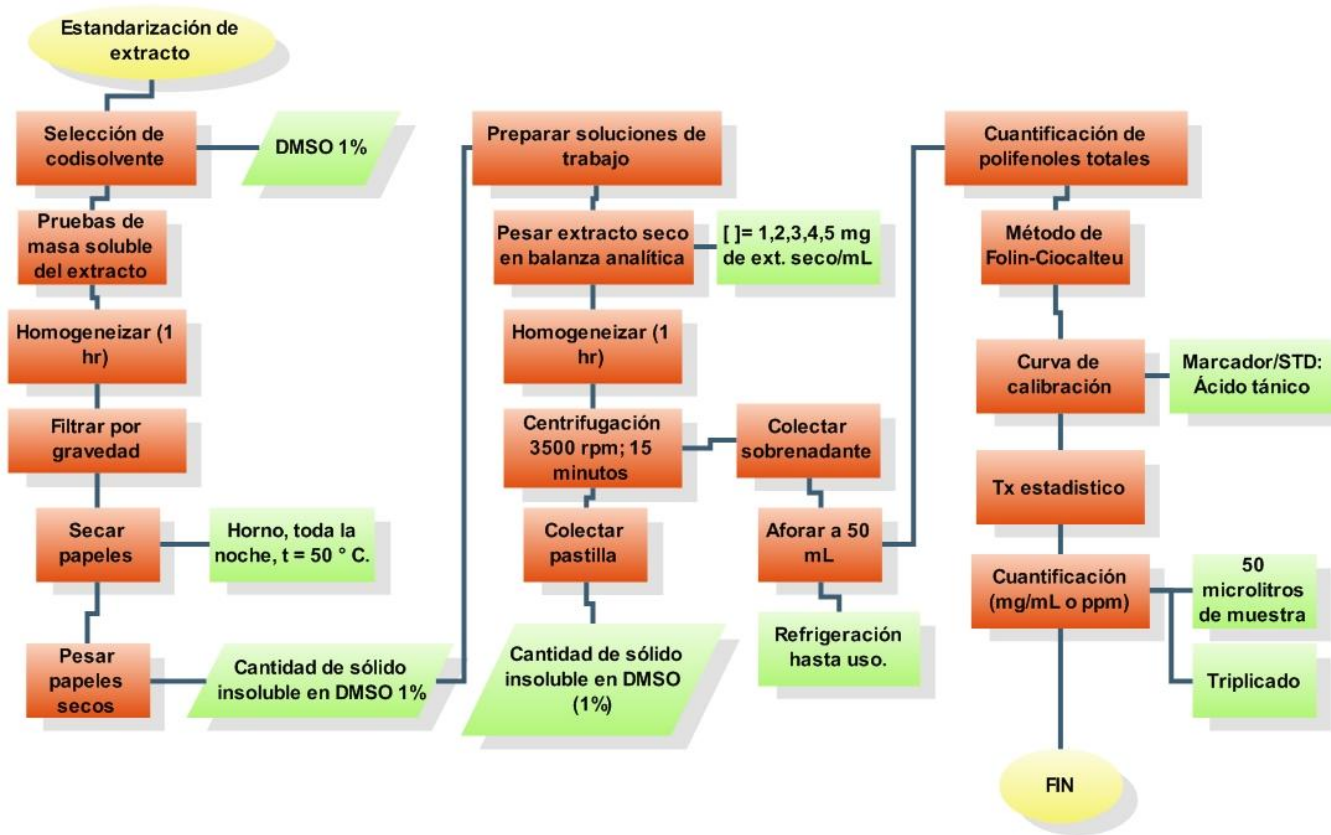


Diagrama 2. Estandarización de extracto

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los ensayos de germinación consisten en el estudio sobre el desarrollo vegetal de semillas en condiciones controladas. Las concentraciones manejadas para este ensayo contemplan un intervalo de 1, 2, 3, 4 y 5 mg del extracto seco /mL (Colegate & Molyneux, 2007).

Las especies receptoras en este ensayo son trigo (*Triticum aestivum* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *Parris Island*). La primera es elegida por el amplio rango de temperaturas en la que puede ser cultivada, su plasticidad genética y porque es el cereal de más producción en el mundo (FAO, 2002); la segunda es seleccionada por su fácil crecimiento (Weaver, 1997) y por ser una de las especies vegetales con mayor mención en esta clase de ensayos (Colegate & Molyneux, 2007).

Las semillas de trigo fueron adquiridas en una forrajería del municipio de Nicolás Romero. Se tomaron semillas de manera aleatoria, fueron germinadas y posteriormente herborizadas para su caracterización botánica en el Instituto de Biología en Ciudad Universitaria.

Para evitar la contaminación de las semillas de trigo con algún microorganismo durante el ensayo, se desinfecta la superficie (testa) con una solución acuosa al 5% de hipoclorito de sodio, seguida por 2 enjuagues con agua de paso.

Las semillas de lechuga provienen de empaques de la marca Gardiner®, donde se describe la especie y variedad de la legumbre. El sobre contenedor de las semillas señalaba que no requería de ningún tratamiento fitosanitario.

El medio de soporte fue papel filtro Whatman no.1 (Moreno Mtz., 1996). Se cortan círculos de este material y se colocan dentro de la caja, de manera que no queden irregularidades o pliegues para que la distribución de los líquidos sea uniforme en toda la caja.

Para controlar la cantidad de aire y la humedad relativa, producto del desarrollo aerobio de la semilla, se utilizan cajas Petri de vidrio; de diámetro de 9 cm y una altura de 1.5 cm. Las cajas fueron lavadas, desinfectadas y secadas previo al ensayo.

Las semillas son colocadas en arreglos de 5x5. Esto es, 5 filas y 5 columnas, dando un total de 25 semillas. Por ensayo, se evalúa la actividad sobre 100 individuos (semillas), por tanto se utilizan 4 cajas por tratamiento.

A cada caja se le adiciona 5 mL de la solución de trabajo con ayuda de pipetas volumétricas de 5 mL (Macias, Molinillo, & Castellano, 2000). Se aleatoriza su



distribución cerca de una fuente de luz natural por un lapso de 5 días. Este periodo de tiempo es suficiente para que las semillas de las especies receptoras se desenvuelvan con normalidad.

Al finalizar este lapso, se estudian los siguientes atributos con sus respectivos criterios:

- a) Para el índice de germinación: La radícula de ambas especies receptoras debe ser mayor de 3 mm (Macias, Molinillo, & Castellano, 2000); si este criterio no es satisfecho, se puede descartar la germinación a pesar la presencia de coléptilo (trigo) o hipocótilo (lechuga).
- b) Longitud de radícula, coléptilo y plúmula: En trigo, se tienen 3 características que pueden ser estudiadas en el germen: el trigo posee numerosas raíces adventicias; por lo que se opta por medir la más larga (Macias, Molinillo, & Castellano, 2000); en el caso de coléptilo, se mide del ápice hasta el fin del brote. La plúmula, aunque no siempre presente, se mide por separado por la diferencia que existe con los otros tejidos.
- c) Longitud de radícula e hipocótilo: La lechuga al ser una planta de germinación epigea, no desarrolla coléptilo, sino hipocótilo (Garcia Brejo, Rosello Caselles, & Santamarina Siurana, 2006) por lo que se mide la longitud de este último. Al igual que en el trigo, la longitud de la radícula no debe ser menor a 3 mm para considerarse como germinación verdadera.

Para evitar que las semillas sigan creciendo durante sus mediciones, se congelan los especímenes por 2 horas para inactivar su desarrollo y se cuentan el mismo día. Los datos promedio de ambas especies son graficados.

Para verificar si los tratamientos tienen diferencias significativas se realiza la prueba de ANOVA en el programa STATGraphics CENTURION XV. Si el ANOVA indica una diferencia significativa, se procede a la ejecución de un contraste de significancia de las medias; donde es posible observar cuál de los tratamientos posee diferencia significativa con respecto al control: una solución acuosa de DMSO al 1 %.

El resumen del proceso de Actividad biológica se halla en el Diagrama 3.

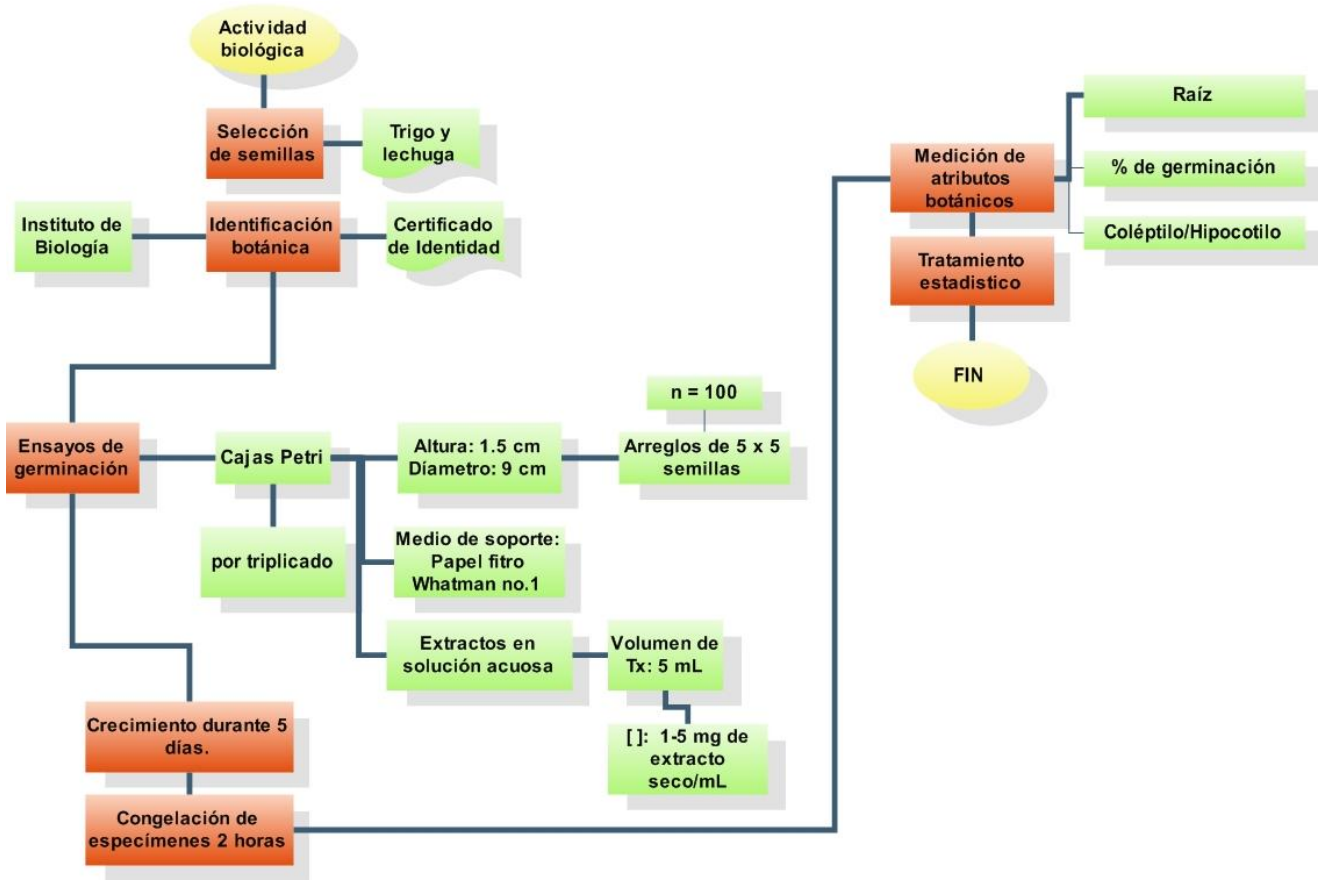


Diagrama 3. Actividad biológica

## VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL TRITURADO

Sabor: Astringente

Color: Naranja

Aroma: Ligeramente picante



FOTOGRAFÍA 3. CORTEZA DE CUACHALALATE TRITURADA

Foto tomada en el Lab. De Fitoquímica y Farmacognosia de la FES-Cuautitlán

### IDENTIFICACIÓN Y PROCESO EXTRACTIVO

#### CUACHALALATE

La corteza de cuachalalate se envió para su identidad botánica al Herbario IZTA de la FES Iztacala refiriendo a la especie como: *Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede. Perteneciente a la familia *Julianaceas* (Fotografía 4).

HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
Nº REG. 2105	FAM.: JULIANACEAE	
N.C.: <i>Amphipterygium</i>	<i>adstringens</i>	(Schltdl.) Schiede
N.P.: Cuachalalate		
EDO. Distrito Federal	MPIO.	
LOC.: Mercado Sonora		
TIPO DE VEG.:		
COORD. 19°25'20.93"	y 99°07'35.35"	ALT.: 2230 m.s.n.m
OBS.: Tesis QFB FES-C: "Evaluación de la capacidad alelopática de las fracciones hidrosolubles del extracto etanólico Cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens</i> )"		
COL. Isboset Gabriel Núñez Luna		
Nº DE COL: s.n.	FECHA: 26 / Octubre / 2011	
DET.: Patricia Jácquez Ríos		
USOS: Medicinal		



Fotografía 4. Espécimen de cuachalalate registrado en el herbario IZTA de FES Iztacala (2012).

## RENDIMIENTO DE EXTRACTO SECO

Tabla 4. Rendimiento promedio del extracto obtenido por ultrasonificación

	Cantidad pesada (g)	Extracto obtenido (g)	%
	5.05	0.62	12.2772
	5.01	0.54	10.7784
	5.02	0.55	10.9561
	5.08	0.56	10.0551
	5.02	0.5	9.96015
	5.08	0.62	12.2047
	5.03	0.56	11.1332
	5	0.54	10.8
	5.03	0.6	11.9284
	5.03	0.59	11.7296
	5.05	0.63	12.4752
	5.07	0.7	13.8067
	5.02	0.5	9.96015

	5.04	0.52	10.3174
	5.02	0.51	10.1593
	5	0.47	9.4
<i>Promedio</i>	5.0343	0.5568	11.05887
<i>DESV</i>	0.0247	0.06341	1.2314

Entre las ventajas más sobresalientes de este método se encuentra la mejora de los rendimientos extractivos con el uso de disolventes seguros, designados en inglés como GRAS (generally recognised as safe), además de agua (Vilkhu, Mawson, & et al, 2008).

Los principios activos que son sensibles a las altas temperaturas pueden ser extraídos de manera más eficiente, ya que esta técnica no genera demasiado calor, protegiendo la integridad de los compuestos.

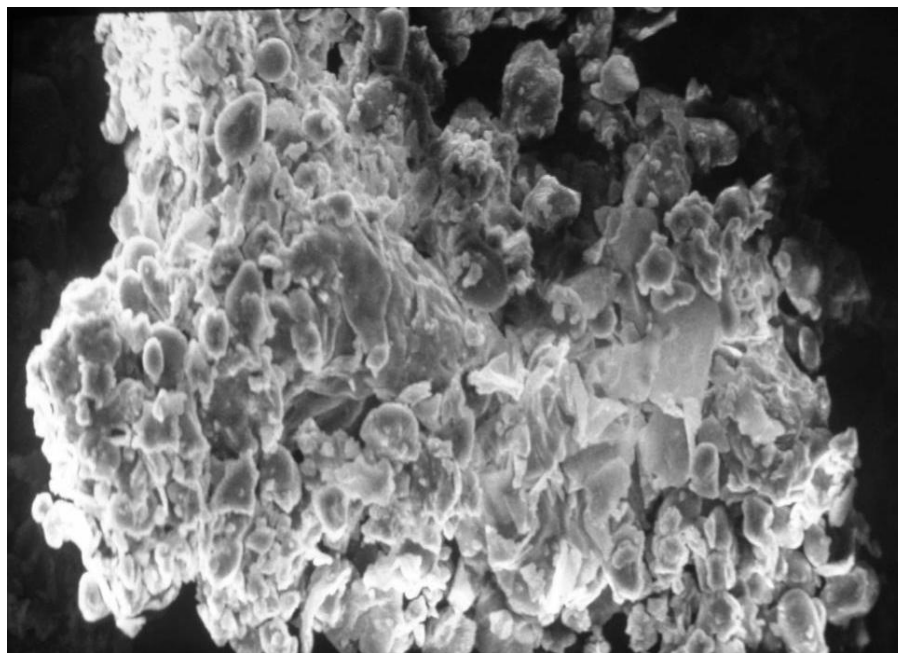
Señalado lo anterior, se destaca que dentro del proceso, los factores más relevantes a considerar son la temperatura del baño de sonicación, el tiempo, la polaridad del disolvente y el tamaño de partícula (Vilkhu, Mawson, & et al, 2008).

Las diferencias halladas en los rendimientos descritos en las Tabla 4 pueden deberse a errores de decantado durante el proceso de transferencia a los tubos de centrifuga. Otro factor fue la de remoción del extracto, ya que se obtenía un sólido ligeramente maleable, que no podía removerse en su totalidad de la caja.

El atributo de alteración de la superficie de la materia botánica fue comprobado experimentalmente con las fotografías de microscopia electrónica de barrido.

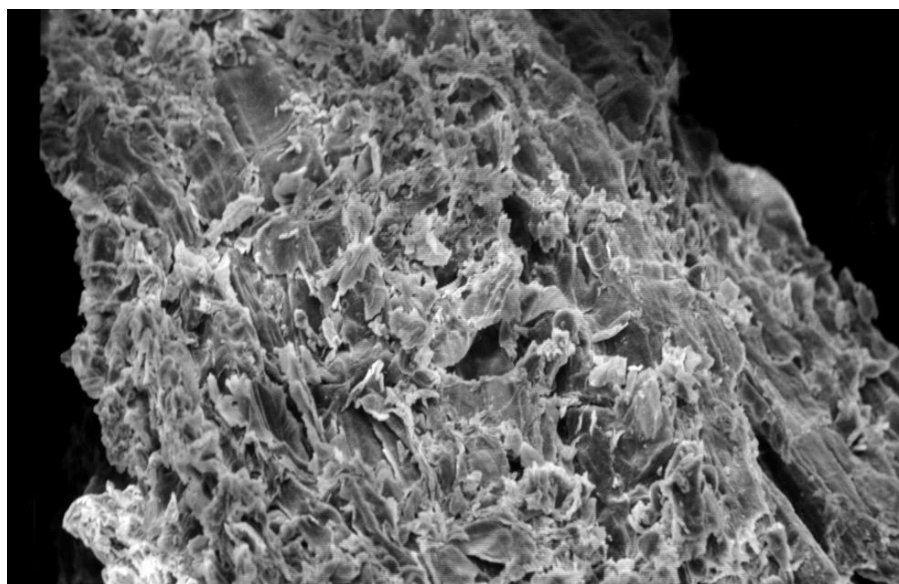
En la Fotografía 5, observamos el sólido triturado sin modificaciones estructurales más allá de la molienda. Se aprecian bordes romos en los extremos. En la Fotografía 6, el sólido luce ligeramente compactado, producto de la pérdida de volumen provocada por la evaporación del solvente.

En la Fotografía 7, observamos que el sólido sonicado tiene cavidades, semejando a lo mencionado en la literatura (Toma, Paniwnyk, & Vinatoru, 2001). En comparación con las anteriores, se aprecia la erosión avanzada de la corteza. Aunque en ambas se hallan envueltos fenómenos mecánicos (agitación vs cavitación), en la última fotografía queda de manifiesto que las microexplosiones de la sonicación genera cavidades en la materia prima, que reducen el tamaño de partícula, aumentando la superficie de contacto con la que el disolvente entra en contacto, mejorando el proceso extractivo.



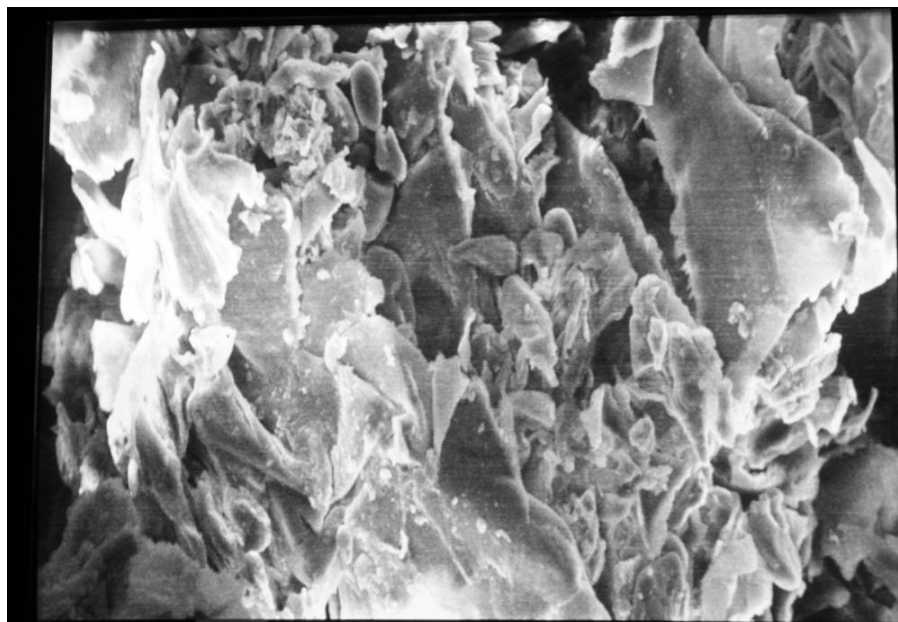
**Fotografía 5. Micrografía de cuachalalate triturado con microscopía electrónica de barrido: antes del tratamiento [450x]**

Foto obtenida en el Laboratorio de Microscopía electrónica de la FES Cuautitlán Campo 1, 2013



**Fotografía 6. Micrografía de cuachalalate triturado con microscopía electrónica de barrido: tratamiento de maceración durante 30 minutos con agitación. [450x]**

Foto obtenida en el Laboratorio de Microscopía electrónica de la FES Cuautitlán Campo 1, 2013.



**Fotografía 7. Micrografías de cuachalalate triturado con microscopía electrónica de barrido: después de tratamiento [450x]**

Foto obtenida en el Laboratorio de Microscopía electrónica de la FES Cuautitlán Campo 1, 2013

## ESTANDARIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

### DETERMINACIÓN DE MATERIA SOLUBLE DEL EXTRACTO

En la Tabla 5 podemos observar los datos colectados del experimento de solubilidad. En ella, se pesaron la mínima y la máxima cantidad de sólido y fueron sometidas a la acción de una agitación continua en una solución acuosa de DMSO al 1%.

**Tabla 5. Pruebas de disolución con DMSO al 1 %**

<b>Mínima cantidad de extracto pesada</b>				
<b>Cantidad pesada(g)</b>	<b>Peso del papel filtro seco sin sólido (g)</b>	<b>Peso del papel filtro seco con sólido (g)</b>	<b>Peso total de sólido no disuelto (g)</b>	<b>% de soluto no disuelto.</b>
0.0518	0.6353	0.6614	0.0261	50.3753
0.0505	0.621	0.6462	0.0252	50.0198
0.0511	0.6492	0.6746	0.0254	49.7632
Promedio	0.6368	0.6607	0.0255	50.0528
Desviación STD				0.30738

Máxima cantidad de extracto pesada				
0.2531	0.6396	0.7686	0.129	49.4208
0.2513	0.6330	0.7585	0.1255	48.9108
0.2534	0.6261	0.7346	0.1085	51.2720
Promedio	0.6329	0.7539	0.121	49.8679
Desviación STD				1.2424

Para corroborar que no existen diferencias significativas entre uno y otro tratamiento, se realiza una prueba de significancia de ambos grupos. Antes de realizar dicha prueba, se debe observar si las desviaciones estándar tienen diferencias significativas una respecto a la otra. Para dicho propósito, ejecutamos una prueba de F (Serrano Gallegos, 2003). Esta se calcula con las siguientes formulas. El significado de sus variables están descritas en el Apéndice E.

$$F_{cal} = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}; F_{cal} = \frac{(1.2424)^2}{(0.3078)^2}; F_{cal} = 16.2924.$$

Comparando dicho valor experimental con el de tablas<sup>2</sup> de F, podemos afirmar que no hay diferencias significativas entre las dos desviaciones estándar a un nivel de 95% de confianza.

$$H_0 = F_{exp} < F_{tablas} \text{ ó } H_a = F_{exp} > F_{tablas}$$

$$F_{exp} = 16.2924; F_{tablas} = 15.44 \therefore$$

Se cumple entonces con la hipótesis alternativa ( $H_a$ ), que nos dice que si hay diferencia significativa en las desviaciones estándar de los dos grupos de datos.

Determinado este atributo, se procede entonces a la prueba de significancia. Primero, se establecen las hipótesis a probar (nula) ( $H_0$ ) y después la alternativa ( $H_a$ ).

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

*Las medias experimentales no poseen diferencia significativa una de otra. El enunciado que da justifica esta afirmación es:  $t_{cal} < t_{tablas}$ .*

O

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2$$

*Las medias experimentales SI poseen diferencia significativa una de otra. Esta relación esta corroborada por la relación:  $t_{cal} > t_{tablas}$ .*

<sup>2</sup> Serrano Gallegos R. (2003) Introducción al análisis de datos experimentales. Universitat Jaume I.



Calculamos entonces el valor del estadístico t. En el Apéndice E se encuentra el desglose de cada formula y el significado de las variables que la conforman.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Con grados de libertad:

$$g. L. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)}$$

El valor obtenido de  $t$  es de: 0.2502. Comparando con las tablas correspondientes a los grados de libertad calculados, el valor es de  $t_{cal} = 12.71$ ; aceptadonse pues, la hipótesis nula de que las medias experimentales no tienen diferencia a un nivel de significación del 95%.

#### CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO TÁNICO

El barrido realizado para esta prueba de cuantificación se encuentra en el Apéndice A del apartado de Apéndices. El barrido indico que la longitud apropiada fue de 666 nm.

**Tabla 6. Datos generales de la curva de calibración de ácido tánico (Concentración del estándar y curva)**

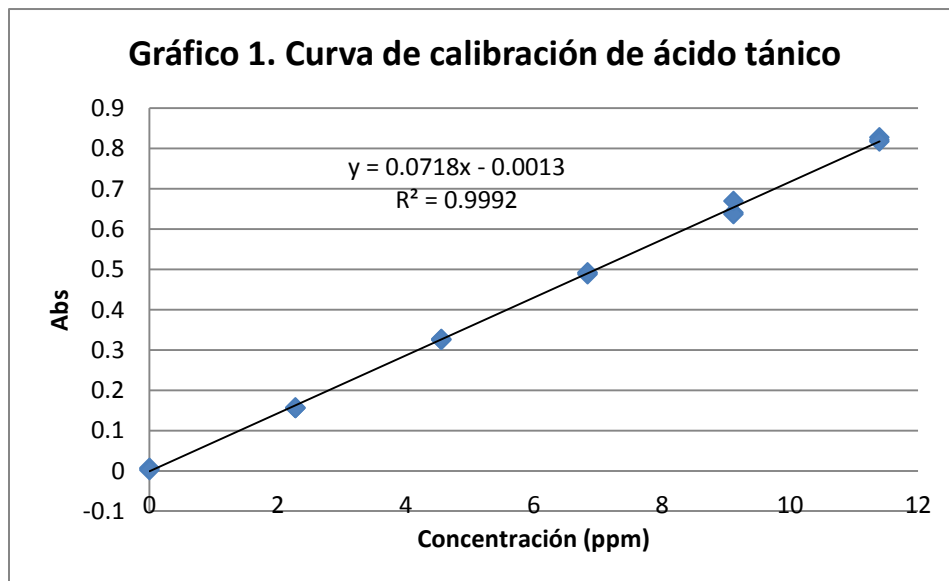
Cantidad real pesada	114	mg
Volumen de aforo	100	mL
Concentración real del estándar	1.14	mg/mL

Volumen adicionado de STD (mL)	Concentración (mg/mL)	Concentración (ppm)	Absorbancia (666 nm)	Normalización (Abs. / [ ])
0	0	0	0.007	0
0	0	0	0.0047	0
0	0	0	0.002	0
0.02	0.00228	2.28	0.1555	0.0682
0.02	0.00228	2.28	0.1569	0.0688
0.02	0.00228	2.28	0.1559	0.0683

0.04	0.00456	4.56	0.3252	0.0713
0.04	0.00456	4.56	0.3247	0.0712
0.04	0.00456	4.56	0.3275	0.0718
0.06	0.00684	6.84	0.4876	0.0712
0.06	0.00684	6.84	0.492	0.0719
0.06	0.00684	6.84	0.491	0.0717
0.08	0.00912	9.12	0.6407	0.0702
0.08	0.00912	9.12	0.6365	0.0697
0.08	0.00912	9.12	0.669	0.0733
0.1	0.0114	11.4	0.8271	0.0725
0.1	0.0114	11.4	0.821	0.0720
0.1	0.0114	11.4	0.8171	0.0716

**Tabla 7. Información estadística acerca de la curva de calibración de ácido tánico**

Variables y Valor	
Desviación estándar	0.0114
Coefficiente de correlación	0.9992
Coefficiente de variación	2.099
Pendiente	0.0718
Ordenada al origen	-0.0013
Desviación estándar con respecto a "y"	11.19
Desviación estándar de la pendiente	0.0002
Desviación estándar de la ordenada al origen	0.3113



**Gráfico 1. Curva de calibración de ácido tánico**

Con los datos experimentales y teóricos generados de esta curva se determinan los límites de confianza.

Para obtener los límites de confianza de la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) con un 95% de confianza ( $\alpha=0.05$ ). Al igual que en ejemplos anteriores, las formulas se encuentran descritas en el Apéndice E.

Por lo tanto:

Límites de confianza para la pendiente:

$$LC = b \pm t_{(n-2)}s_b$$

$$LC = (0.0718) \pm 2.78 \times (0.0002)$$

Límites de confianza para la ordenada al origen:

$$LC = a \pm t_{(n-2)}s_a$$

$$LC = -0.0013 \pm (2.78) \times 0.3113$$

**Tabla 8. Límites de confianza para la curva de calibración de ácido tánico**

Límite de confianza superior	$y = 0.0723x + 0.8641$
Límite de confianza inferior	$y = 0.07124x - 0.8511$

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

Se define como aquella respuesta analítica diferente del “blanco” o “ruido de fondo”. Se trata también “De la mínima cantidad que puede detectar un método, pero no necesariamente cuantificarlo.” (CNQFB México A.C., 2003).

$$LOD = -0.0013 + (3 \times 0.0002)$$

$$LOD = -0.0013 + 0.0006$$

$$LOD = -0.0007$$

Este valor, se reintroduce en la ecuación de nuestra curva de calibración, generando la cantidad mínima que se puede estimar con este método:

$$y = 0.0718x - 0.0013$$

Despejando:

$$x = \frac{y + 0.0013}{0.0718}$$
$$x = \frac{0.0007 + 0.0013}{0.0718}$$
$$x = 0.0278$$

El límite de detección de la curva de calibración es de  $0.0278 \mu\text{g mL}^{-1}$  o  $0.0278 \text{ ppm}$ .

CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN SOLUCIÓN DE DMSO AL 1% DE LA FRACCIÓN HIDROSOLUBLE DE CUACHALALATE

La información experimental completa de estas cuantificaciones se encuentra en el Apéndice B.

**Tabla 9. Primera cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en soluciones de trabajo de cuachalalate**

<b>Cantidad de sólido (g)</b>	<b>Sólido no disuelto (g)</b>	<b>Concentración real (mg/mL)</b>	<b>ppm equivalentes a ácido tánico(promedio)/mL</b>
0.1190	0.0606	1.166	506.7780
0.2160	0.1036	2.246	860.5585
0.3057	0.1490	3.132	1434.5403
0.4105	0.2031	4.146	1838.9972
0.5102	0.2499	4.998	2125.7195

**Tabla 10. Segunda cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en soluciones de trabajo de cuachalalate**

<b>Cantidad de sólido (g)</b>	<b>Sólido no disuelto (g)</b>	<b>Concentración real (mg/mL)</b>	<b>ppm equivalentes a ácido tánico (promedio)</b>
0.1101	0.0564	1.128	483.6583
0.2023	0.1011	2.022	911.6991
0.3153	0.1583	3.166	1432.2191
0.4022	0.2046	4.092	1746.0538
0.5137	0.2611	5.222	2007.4280

**Tabla 11. Tercera cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en soluciones de trabajo de cuachalalate**

<b>Cantidad de sólido (g)</b>	<b>Sólido no disuelto (g)</b>	<b>Concentración real (mg/mL)</b>	<b>ppm equivalentes a ácido tánico (promedio)</b>
0.1059	0.0529	1.058	540.4828
0.2085	0.1030	2.108	964.4382
0.3031	0.1491	3.078	1511.5134
0.4021	0.1992	4.056	1835.2831
0.5129	0.2501	5.254	2128.8765

**Tabla 12. Datos totales de la cuantificación de polifenoles totales en solución acuosa de extracto etanólico de cuachalalate**

	<b>Concentración (mg de extracto/mL)</b>	<b>ppm equivalentes a ácido tánico</b>
	1.166	506.7780
	1.128	483.6583
	1.058	540.4828
<i>Promedio</i>	<i>1.117</i>	<i>510.3063</i>
	2.246	860.5585
	2.022	911.6991
	2.108	964.4382
<i>Promedio</i>	<i>2.125</i>	<i>912.2319</i>
	3.132	1434.5403
	3.166	1432.2191
	3.078	1511.5134
<i>Promedio</i>	<i>3.125</i>	<i>1495.4242</i>
	4.146	1838.9972
	4.092	1746.0538
	4.056	1835.2831
<i>Promedio</i>	<i>4.098</i>	<i>1806.7780</i>
	4.998	2125.7195
	5.222	2007.4280
	5.254	2128.8765
<i>Promedio</i>	<i>5.158</i>	<i>2087.3413</i>

Se efectuó un barrido desde el espectro UV-Vis en el rango 200-800 nm (Harris, 2007). La longitud de onda óptima para este experimento fue 666 nm en el espectrofotómetro UV/VIS Beckmann-Coulter DU 800®.

Las especies azules observadas en el sistema se generan a partir de reacciones de reducción que involucran uno o dos electrones. Estas provienen en mayor parte de la

reducción del molibdeno y en una pequeña parte del tungsteno, obteniendo los electrones de la oxidación de los sustratos con los que reaccionan (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999).

Entre los parámetros más críticos para la ejecución de esta técnica se halla el tiempo de reposo y de lectura; el primero es esencial, ya que constituye la fase donde el estándar o sustancia de referencia reaccionará con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se manejan diversos tiempos de reposo, aunque se hace hincapié en la consulta bibliográfica, que el tiempo no debe sobrepasar los 8 minutos (Waterhouse, 2002).

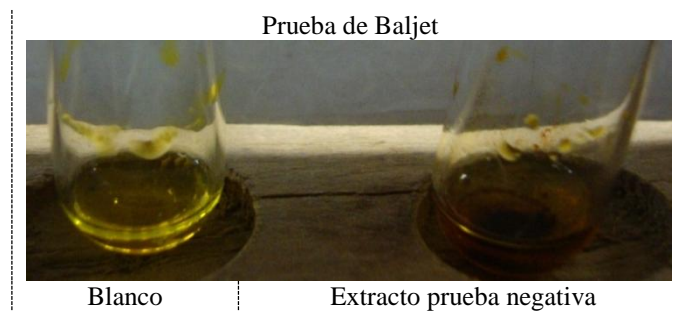
Uno de los inconvenientes es que no existe una relación estequiométrica entre las especies participantes (Walton & Reyes, 1983), además de que este método es poco selectivo, ya que reacciona con cualquier material oxidable que se encuentre en el sistema (Interjit, 1996).

## TAMIZ FITOQUÍMICO

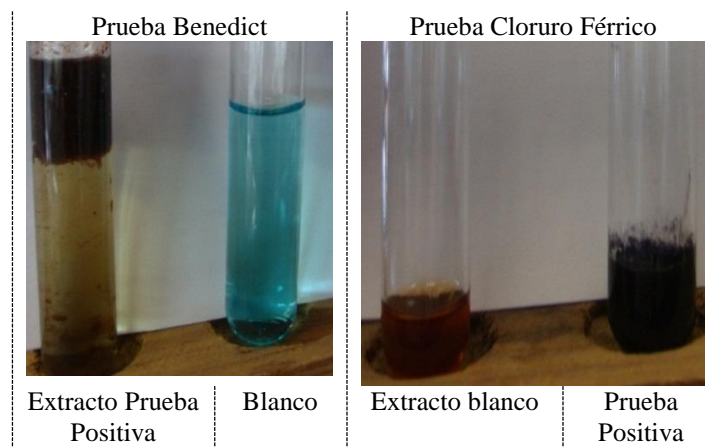
**Tabla 13. Tamiz fitoquímico de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede)**

Prueba	Extracto etanólico		Solución de trabajo	
	Metabolito	Resultado	Metabolito	Resultado
Benedict	Carbohidratos reductores	+++	Carbohidratos reductores	++
Baljet	Lactonas sesquiterpénicas	-	Lactonas sesquiterpénicas	-
Cloruro férrico	Fenoles y/o Taninos	+++	Fenoles y/o Taninos	++
Wagner	Alcaloides	-	Alcaloides	-
Dragendorff	Alcaloides	-	Alcaloides	-
Hager	Alcaloides	-	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	+++	Alcaloides	-
Ácido silicotúngstico	Alcaloides	+++	Alcaloides	-
Shinoda	Flavonoides	+ <sub>escaso</sub>	Flavonoides	+ <sub>escaso</sub>
Rosenthaler	Saponinas triterpénicas	+++	Saponinas triterpénicas	++
Espuma	Saponinas	+	Saponinas	+
Glicósidos cianogénicos	Glucósidos cianogénicos	-	Glucósidos cianogénicos	-
Liebermann-Buchard.	Triterpenos y esteroides	+++	Triterpenos y esteroides	+

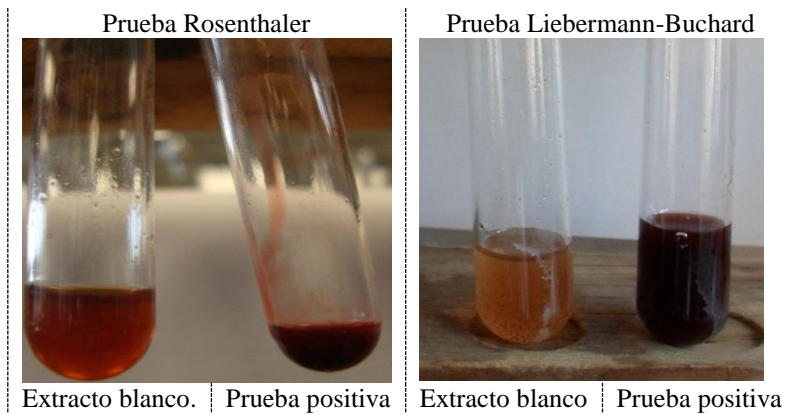
Las pruebas descritas en la Tabla 13 se prepararon y se realizaron mediante la metodología encontrada en el Apéndice C. Las fotografías fueron tomadas durante la ejecución de la prueba en el Laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia de FES Cuautitlán Campo 1



**Fotografía 8. Prueba de Baljet**



**Fotografía 9. Prueba de Benedict y cloruro férrico**



**Fotografía 10. Ensayo de Rosenthaler y Liebermann-Buchard**

Alcaloides: Ensayo Ac. Silicotúngstico y Mayer



Izq. Extracto: | Centro: Silicotúngstico (positivo) | Der.: Mayer (positivo)

**Fotografía 11. Prueba de ácido silicotúngstico y prueba de Mayer**

Alcaloides: Ensayo Dragendorff, Wagner y Hager



Dragendorff (negativa) | Wagner (negativa) | Hager (negativa)

**Fotografía 12. Prueba Dragendorff, Wagner y Hager**

Prueba de Benedict (Fracción Hidrosoluble)



Extracto blanco | Benedict sin extracto | Prueba positiva con pp. rojo

**Fotografía 13. Prueba de Benedict (fracción hidrosoluble)**

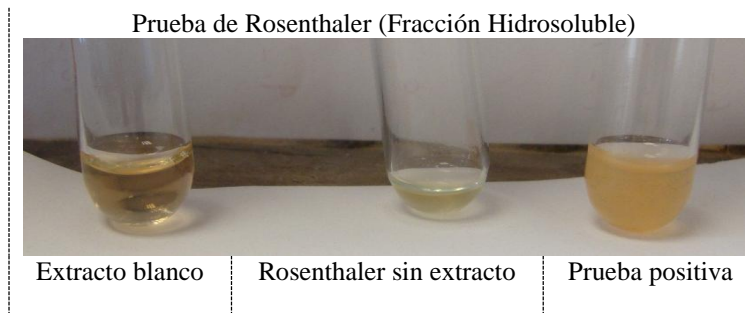
Prueba de Cloruro Férrico (Fracción Hidrosoluble)



Extracto blanco | Prueba positiva | Reactivo blanco

**Fotografía 14. Prueba de cloruro férrico para fracción hidrosoluble**





**Fotografía 15. Prueba de Rosenthaler para fracción hidrosoluble**



**Fotografía 16. Prueba de espuma para fracción hidrosoluble**

De acuerdo al tamiz fitoquímico del extracto etanólico se tienen presentes alcaloides, saponinas, lactonas sesquiterpénicas, esteroides, triterpenos, fenoles y taninos. Esto se encuentra en concordancia con los metabolitos descritos en la literatura (García González, 2006), (Soto Hernández, Olivera Ortega, & et al, 1999).

Se descarta la presencia de alcaloides, ya que se sabe que en algunas pruebas de identificación de alcaloides basadas en precipitación, arrojan resultados falsos positivos en extractos etanólicos (Domínguez, 1988).

Muchos de estos metabolitos han sido descritos como sustancias que influyen indirectamente el desarrollo de plantas y/o semillas; en particular, los polifenoles (Jankievics, 1989). Algunos de ellos, como las cumarinas y los lignanos, poseen notables efectos en el crecimiento vegetal.

Las pruebas negativas en el extracto acuoso no significan necesariamente una ausencia de metabolitos solubles en dicho material. Debido a que la concentración utilizada para el tamiz es bastante baja (1 mg de extracto seco/mL), se podría deducir que la concentración de metabolito no detectable dentro de los rangos de los ensayos cualitativos.

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### IDENTIFICACIÓN

#### TRIGO

El nombre científico de las semillas de trigo que forman parte de este trabajo se muestra en el Documento 1. De acuerdo a este documento, las semillas pertenecen a la especie *Triticum aestivum L.* El ejemplar fue entregado el 5 de diciembre de 2012 y se encuentra en proceso de montaje.

#### LECHUGA

Como se señaló en el método, las semillas que fueron compradas ya contaban con la información acerca de la especie y del cultivar/variedad botánica a la que pertenecía esta legumbre.

El volumen de aire y el volumen agua son factores extrínsecos críticos en el desarrollo de las semillas (García Brejo, Rosello Caselles, & Santamarina Siurana, 2006). Estos factores fueron controlados experimentalmente mediante el uso de pipetas volumétricas de 5 mL (volumen de agua) y con cajas Petri del mismo alto y diámetro (volumen de aire).

### ENSAYOS DE GERMINACIÓN

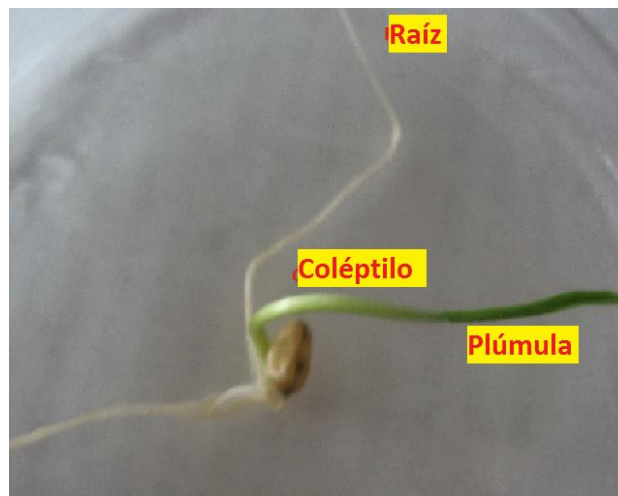
#### TRIGO

Se reporta que el trigo (*Triticum aestivum L.*) es una planta con potencial alelopático por sí mismo. Los extractos de raíces y desechos en descomposición tienen una función reguladora sobre los mismos trigos y sus diferentes variedades cultivares, otras gramíneas y malas hierbas (Yongqing, 2005).

En las Fotografías 17 y 18 se muestran las diferentes etapas de desarrollo del trigo por un periodo de 5 días y la anatomía general del germen de trigo, señalando la parte medida.



**Fotografía 17. Desarrollo de la semilla de trigo en lapso de 5 días**



**Fotografía 18. Anatomía del germen de trigo**

M. en C. Brígida del Carmen Camacho Enriquez  
Presente.

Por medio de la presente, me permito informarle que las semillas entregadas el 5 de diciembre de 2012 corresponden a la especie *Triticum aestivum* L., utilizadas para la tesis de licenciatura: "Evaluación de la actividad alelopática de la fracción hidrosoluble del extracto etanólico de cuachalalate", desarrollada en el laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.

Los especímenes de muestra se encuentran depositados en el Herbario Nacional de México, en el proceso de montaje para su incorporación a la colección.

Si tiene alguna pregunta, no dude en contactarme.

Me despido con un cordial saludo.

Atentamente



Dr. J. Gabriel Sánchez-Ken  
Departamento de Botánica  
Cd. Universitaria, D.F. a 4 de marzo de 2013

En las Tablas 14, 15, 16 y 17 se hallan los datos colectados durante los ensayos de germinación junto con un promedio global de los mismos.

**Tabla 14. Primer ensayo de germinación en trigo (*Triticum aestivum L.*): % de germinación, longitud de coléptilo y radícula promedio**

Tratamientos (mg/mL)	Germinación (%)	Coléptilo (cm)	Radícula (cm)
Control	66	1.3761	3.0014
1	62	1.438	2.8666
2	58	1.0135	2.6796
3	63	1.1984	2.5375
4	51	0.8519	1.7903
5	54	1.1781	2.0618

**Tabla 15. Segundo ensayo de germinación en trigo (*Triticum aestivum L.*): % de germinación, longitud de coléptilo y radícula promedio**

Tratamientos (mg/mL)	Germinación (%)	Coléptilo (cm)	Radícula (cm)
Control	50	1.4588	3.6039
1	51	1.498	3.3635
2	47	1.225	3.225
3	52	0.9377	2.5037
4	46	1.05744	2.2212
5	47	0.74166	1.7708

**Tabla 16. Tercer ensayo de germinación en trigo (*Triticum aestivum L.*): % de germinación, longitud de coléptilo y radícula promedio**

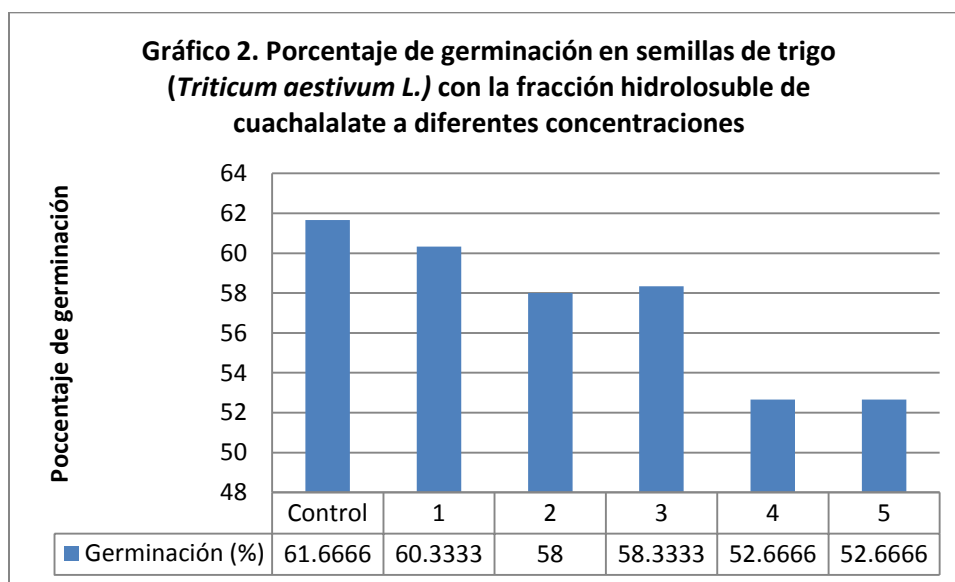
Tratamientos (mg/mL)	Germinación (%)	Coléptilo (cm)	Radícula (cm)
Control	69	1.2985	3.2794
1	68	1.8188	3.4308
2	69	1.2642	3.1614
3	60	1.0524	3.095
4	61	1.0596	2.5145
5	57	0.8017	2.4912

**Tabla 17. Resultados promedio de ensayos en trigo (*Triticum aestivum* L.)**

Tratamiento	Germinación (%)	Coléptilo (cm)	Radícula (cm)
Control	61.6666	1.3778	3.2949
1	60.3333	1.5849	3.2203
2	58	1.16756	3.022
3	58.3333	1.06283	2.712
4	52.6666	0.9896	2.1753
5	52.6666	0.9071	2.1079

**PORCENTAJE DE GERMINACIÓN**

En el Gráfico 2 se encuentran los porcentajes de germinación de las semillas de trigo descritos en las Tablas anteriores. Se aprecian diferencias en el tratamiento de 4 y 5 mg de extracto/mL, aunque estas afirmaciones deben ser sometidas a pruebas estadísticas para determinar la validez de dicho argumento.



**Gráfico 2. Porcentaje de germinación de semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) con la fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones.**

En la Tabla 18, se muestra el ANOVA aplicado a los datos de porcentaje de germinación.

**Tabla 18. ANOVA para porcentaje de germinación en trigo (*Triticum aestivum* L.)**

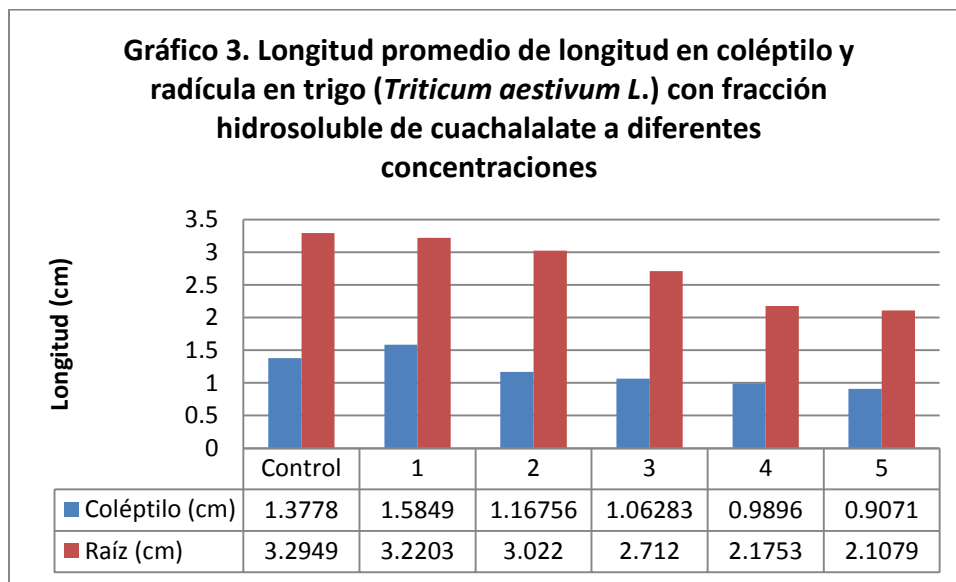
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Entre grupos	218.278	5	43.6556	0.63	0.6817
Intra grupos	833.333	12	69.4444		
Total	1051.61	17			

De acuerdo a la prueba estadística ANOVA aplicada a estos datos, se observa que por lo menos para un nivel de significancia de 95% ( $p=0.05$ ) no existe alguna diferencia en las varianzas de las medias entre los tratamientos.

Se puede deducir, pues, que los componentes presentes en la fracción soluble del extracto de cuachalalate no influyen de manera positiva o negativa en el proceso germinativo; o por lo menos no a las concentraciones manejadas en este método experimental.

**LONGITUD PROMEDIO DE COLÉPTILO Y RADÍCULA DE TRIGO**

En el siguiente grafico podemos ver los atributos de longitud de coléptilo o radícula en el mismo gráfico.



**Gráfico 3. Longitud promedio de coléptilo y radícula en trigo (*Triticum aestivum* L.) con fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones.**

Las Tablas 19 y 21 muestran la prueba estadística de ANOVA de longitud de coléptilo y longitud de radícula en trigo. En las tablas 20 y 22 se encuentra un resumen de los contrastes de significancia efectuados en los 5 tratamientos con respecto al blanco.

**Tabla 19. ANOVA para longitud de coléptilo en trigo (*Triticum aestivum* L.)**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Entre grupos	0.9829	5	0.1965	7.67	0.0019
Intra grupos	0.3075	12	0.0256		
Total	1.2905	17			

En función de este último resultado, procedemos con una evaluación estadística semejante a la empleada en los criterios de masa soluble del extracto para cada uno de los tratamientos, con respecto al tratamiento control.

Establecemos nuestra hipótesis nula:  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ , afirmando que no existen diferencias experimentales entre las medias de control con respecto a la de cada uno de los tratamientos. Esta afirmación se sustenta en que el valor calculado de  $t_{cal}$  no es superior a la de  $t$  tabulada

$$t_{cal} < t_{tablas}$$

En el caso contrario, si se presenta una relación inversa, concluimos que las medias no son similares, dando lugar a la aceptación de la hipótesis alternativa:  $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$ . Esta conclusión se reafirma con el enunciado:

$$t_{cal} > t_{tablas}$$

**Tabla 20. Datos para contrastes de significancia para longitud de coléptilo en trigo (*Triticum aestivum* L.)**

Tratamiento	Desv.	Valor $F_{exp}$	Valor $F_{tablas}$	Valor $t_{exp}$	Valor $t_{tablas}$	Significativamente diferente con respecto al control
Control	0.0801	-	-	-	-	-
1 mg/mL	0.2047	1.1503	39.00	0.8600	3.18	No
2 mg/mL	0.1348	1.1800		1.0756		No
3 mg/mL	0.1306	1.2963		1.8560		No
4 mg/mL	0.1192	1.3922		2.4732		No
5 mg/mL	0.2365	1.5188		1.6711		No



No hay diferencia significativa entre la comparación de los tratamientos con respecto al control en un nivel de significancia del 95%.

**Tabla 21. ANOVA para longitud de radícula en trigo (*Triticum aestivum* L.)**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón F</b>	<b>Valor P</b>
Entre grupos	4.0075	5	0.8015	7.41	0.0022
Intra grupos	1.2982	12	0.1081		
Total	5.3057	17			

En la Tabla 21, el ANOVA indica que sí existe una diferencia significativa en las varianzas de las medias de los tratamientos en lo que concierne a la longitud de la radícula de trigo en un nivel de significancia del 95% ( $p=0.05$ ). Para dilucidar cuál de los tratamientos es el que presentan mayor efecto, realizamos una prueba de significancia semejante a la anterior.

**Tabla 22. Datos para contrastes de significancia para longitud de radícula en trigo (*Triticum aestivum* L.)**

<b>Tratamiento</b>	<b>Desv.</b>	<b>Valor <math>F_{cal}</math></b>	<b>Valor <math>F_{tablas}</math></b>	<b>Valor <math>t_{cal}</math></b>	<b>Valor <math>t_{tablas}</math></b>	<b>Significativamente diferente con respecto al control</b>
Control	0.3015	-	-	-	-	-
1 mg/mL	0.3081	1.2018	39.00	0.1907	3.18	No
2 mg/mL	0.2982	1.0111		0.7025		No
3 mg/mL	0.3320	1.1011		1.4664		No
4 mg/mL	0.3642	1.2080		2.7523		No
5 mg/mL	0.3624	1.2018		2.9219		No

Para el nivel de significancia utilizado en esta prueba (95%), no hay diferencia significativa entre el control y los diferentes tratamientos utilizados.

En la familia de las Gramíneas o Poaceas, el coléptilo es considerado uno de los tejidos vegetales que señala un correcto desarrollo germinativo (García Brejo, Rosello Caselles, & Santamarina Siurana, 2006).

De acuerdo con la prueba de ANOVA descrita en la Tabla 22, nos indica que si hay una diferencia significativa en los tratamientos, puede ser entre los tratamientos o intratratamientos.

A pesar de ello, después de efectuar los contrastes de significancia de cada uno de ellos con respecto al control, pudimos observar que en lo que compete a la longitud de

radícula y coléptilo no existe diferencia significativa en las medias de ninguno de los tratamientos.

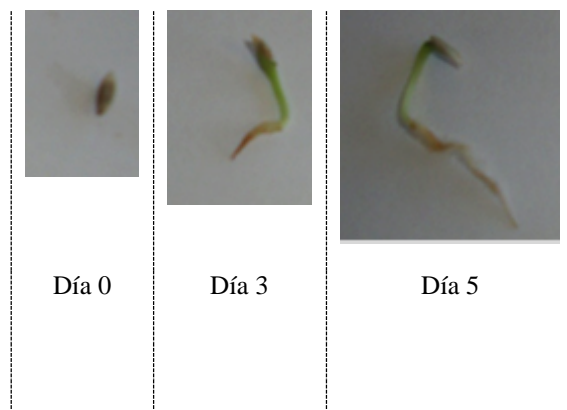
El análisis de varianza (ANOVA) es una prueba estadística que nos permite probar hipótesis con las varianzas de las medias en las poblaciones estudiadas (Daniels, 2007).

El propósito central de este estudio era determinar si existía algún efecto significativo de inhibición o promoción (evaluado por el ANOVA) y en que dosis se hallaba. Para este último fin se efectuaron pruebas de significancia a los 5 tratamientos con respecto al control.

Al realizarlos, observamos que no existían diferencias significativas entre los tratamientos, dándonos como conclusión final que el trigo parece no ser susceptible a los efectos de los componentes descritos en el tamiz del extracto o simplemente puede sobreponerse con facilidad a los mismos.

#### LECHUGA

A continuación se observa en las Fotografías 19 y 20 el desarrollo del germen de lechuga en un periodo de 5 días y la anatomía del germen de trigo.



**Fotografía 19. Desarrollo de lechuga en función del tiempo**



Fotografía 20. Anatomía del germen de lechuga

En las Tablas 23, 24, 25 y 26 se hallan los datos obtenidos durante los ensayos de germinación junto con una tabla de promedios generales del ensayo.

Tabla 23. Primer ensayo de germinación en lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *Parris Island*): % de germinación, longitud de hipocótilo y radícula promedio

Tratamiento (mg/mL)	Germinación (%)	Hipocótilo (cm)	Radícula (cm)
Control	37	0.5789	1.0394
1	30	0.6741	1.2248
2	27	0.6964	1.0607
3	28	0.7517	1.0206
4	26	0.65555	0.9703
5	20	0.7	1.0285

Tabla 24. Segundo ensayo de germinación en lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *Parris Island*): % de germinación, longitud de hipocótilo y radícula promedio

Tratamiento (mg/mL)	Germinación (%)	Hipocótilo (cm)	Radícula (cm)
Control	33	0.809	1.8878
1	23	0.725	1.2
2	22	0.6	1.1318
3	26	0.7595	1.3555
4	20	0.7333	1.3095
5	12	0.6615	0.9765

**Tabla 25. Tercer ensayo de germinación en lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *Parris Island*): % de germinación, longitud de hipocótilo y radícula promedio**

Tratamiento (mg/mL)	Germinación (%)	Hipocótilo (cm)	Radícula (cm)
Control	37	0.6815	1.35
1	24	0.584	1.348
2	18	0.6263	1.1842
3	19	0.715	1.505
4	17	0.55	0.8388
5	11	0.55	1

**Tabla 26. Resultados promedio de ensayos en lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *Parris Island*)**

Tratamiento (mg/mL)	Germinación (%)	Hipocótilo (cm)	Radícula (cm)
Control	35.6666	0.6898	1.4257
1	25.6666	0.661	1.2576
2	22.3333	0.6409	1.1255
3	24.3333	0.742	1.2937
4	21	0.6462	1.0395
5	14.3333	0.6371	1.0016

#### PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

En este gráfico., encontramos los datos de la Tabla 26, que nos muestra los porcentajes de germinación de las lechugas durante el ensayo.

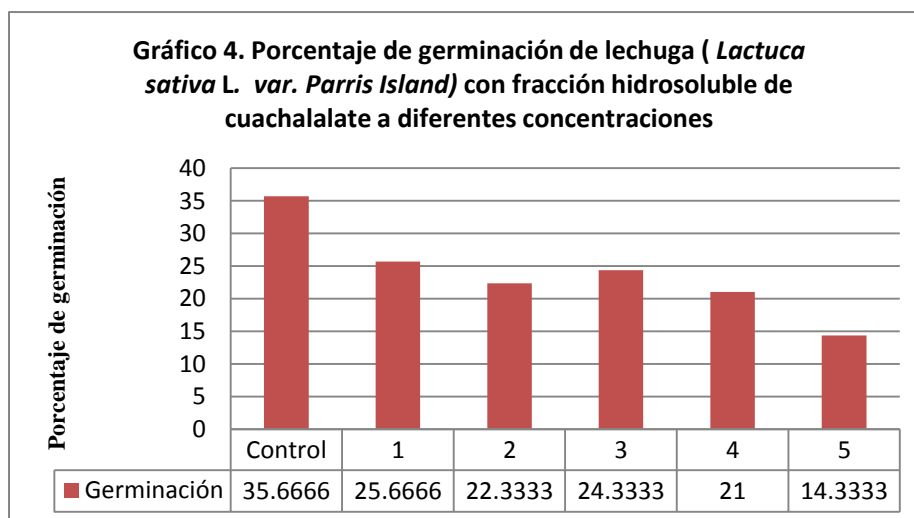


Gráfico 4. Porcentaje de germinación de lechuga (*Lactuca sativa* l. var. *Parris Island*) con fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones

En las Tabla 27, se halla la tabulación de la prueba ANOVA de porcentaje de germinación.

**Tabla 27. ANOVA para porcentaje de germinación en lechuga (*Lactuca sativa L. var. Parris Island*)**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Entre grupos	732.444	5	146.48	8.16	0.0015
Intra grupos	215.333	12	17.9444		
Total	047.778	17			

De acuerdo al valor p obtenido (0.0015, redondeando casi 0.002), existe una diferencia significativa de las varianzas de las medias entre tratamientos con respecto al porcentaje de germinación a un nivel de 95% de significancia ( $p=0.05$ ).

Semejando al tratamiento de datos en el trigo, se procede con un contraste de significancia para cada uno de los tratamientos con respecto al control, resumido en el contenido de la Tabla 28.

**Tabla 28. Resumen de datos para contrastes de significancia en porcentaje de germinación para lechuga (*Lactuca sativa L. var. Parris Island*)**

Tratamiento	Desv.	Valor $F_{exp}$	Valor $F_{tablas}$	Valor $t_{exp}$	Valor $t_{tablas}$	Significativamente diferente con respecto al control
Control	2.3094	-	-	-	-	-
1 mg/mL	3.7859	2.6874	39.00	2.1879	3.18	No
2 mg/mL	4.5092	3.8125		2.4806		No
3 mg/mL	4.7258	4.1875		2.0175		No
4 mg/mL	4.5825	3.9375		2.6877		No
5 mg/mL	4.9328	4.5624		3.6467		Sí.

La concentración que presenta una diferencia significativa en el tratamiento de 5 mg/mL con respecto al control.

Sabemos que en el proceso de germinación, la semilla inicia numerosos mecanismos bioquímicos para promover su desarrollo.

Se tiene reportado que muchos de los compuestos detectados en las pruebas de tamiz fitoquímico tienen influencia de manera directa o indirecta en el proceso germinativo, ya sea regulando en forma de cofactor a la enzima que sintetiza alguna fitohormona relacionada con la germinación (ácido abscísico/giberelinas) o altera alguna propiedad física del embrión.

Otro fenómeno que podría estar ocurriendo dentro del ensayo es aquel designado como dormancia o latencia (Grajalez Muñiz, 2010). Cuando las condiciones de desarrollo se ven satisfechas (cantidad de luz, sol, pH, humedad relativa) la semilla puede comenzar a germinar. Sin embargo, al encontrar una condición desfavorable en el medio, el embrión puede “decidir” si ralentiza su desarrollo o no.

Se puede notar en las Tablas 23, 24 y 25 que el porcentaje de germinación de las lechugas fue bajo en el control. La causa más probable es el periodo corto de luz al que fueron expuestos durante la ejecución de los ensayos.

Se ha reportado que periodos breves de luz, así como temperaturas bajas desencadenan una respuesta molecular en donde la planta sintetiza ácido abscísico, superando el equilibrio hormonal de germinación (ABA/giberelinas >1).

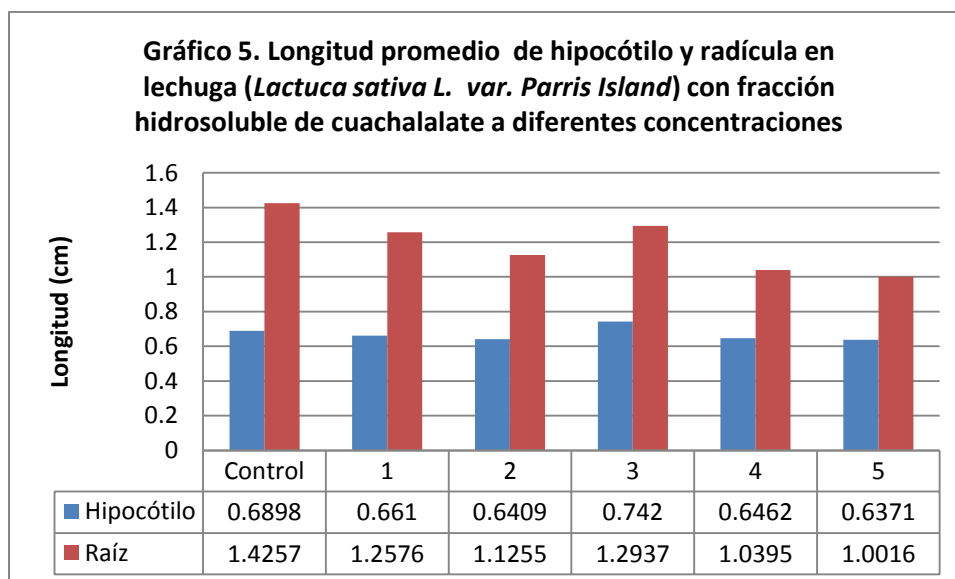
El ácido abscísico es una de las 5 fitohormonas que regula los ciclos metabólicos de las plantas. Promueve el envejecimiento de los órganos y su abscisión (Jankievics, 1989). Mencionado lo anterior, el exceso de ABA haría madurar los tejidos del embrión, pero de manera lenta; obteniendo así un embrión viable (Grajalez Muñiz, 2010) pero que no se desarrollará a menos que se logren superar los factores exógenos que comprometen su buen desarrollo.

Una vez justificado el porqué de los porcentajes de germinación bajos en el control, podemos inferir que los tratamientos con cuachalalate también afectan de manera importante los estímulos metabólicos de la germinación, ya sea en los factores endógenos o exógenos, alterando el potencial hídrico/humedad relativa del embrión, la permeabilidad de la testa o la tensión superficial del agua, gracias a los numerosos componentes hallados en la mezcla.

Con los contrastes de significancia, se denota que los tratamientos donde existe una diferencia significativa es el de 5 mg de extracto seco /mL en donde se observa la inhibición de la germinación.

#### LONGITUD PROMEDIO DEL HIPOCÓTILO Y RADÍCULA DE LECHUGA

En el gráfico se muestran los datos promedio de longitud de hipocótilo y radícula en lechuga, semejante a los efectuados en trigo.



**Gráfico 5. Longitud promedio de hipocótilo y radícula en lechuga (*Lactuca sativa L. var. Parris Island*) con fracción hidrosoluble de cuachalalate a diferentes concentraciones.**

Con el valor P obtenido del ejercicio estadístico de ANOVA en la Tabla 29, podemos decir que al ser un valor superior a 0.05, la hipótesis nula se acepta, significando que todas las varianzas de sus medias no poseen diferencias significativas entre ellas.

**Tabla 29. ANOVA para longitud de hipocótilo en lechuga (*Lactuca sativa L. var. Parris Island*)**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Entre grupos	0.02445	5	0.00489	0.82	0.5608
Intra grupos	0.0719	12	0.00599		
Total	0.0963	17			

**Tabla 30. ANOVA para longitud de radícula en lechuga (*Lactuca sativa L. var. Parris Island*)**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Entre grupos	0.3994	5	0.07989	1.52	0.2556
Intra grupos	0.6311	12	0.05259		
Total	1.0305	17			

El valor P que se halla en la Tabla 30 nos permite afirmar que no existen diferencias significativas.

En el caso de lechuga, la prueba de ANOVA y los datos que arroja la Tabla 29 y 30 nos permitió observar que no existe diferencia significativa en las varianzas de las medias de ninguno de los tratamientos.

Con dichos datos, podemos inferir que algunas de las semillas logran superar la barrera de latencia inducida por las diferentes concentraciones de metabolitos utilizadas en el experimento o simplemente no son susceptibles en etapas más avanzadas del desarrollo, creciendo con normalidad si se continuara la experimentación por un periodo de tiempo más prolongado.

Es importante resaltar que estos dos últimos atributos, elongación de hipocótilo y de radícula, son considerados como buenas pruebas de letalidad u toxicidad biológica para la determinación de calidad de agua (Llallana, Elizalde, & et al, 2008). Esto refuerza la idea de porque se seleccionaron a esta planta como organismo modelo para el estudio de desarrollo vegetal y monitoreo ambiental.



## VII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto etanólico de cuachalalate utilizando la técnica de sonicación y se verificó el mecanismo mediante el cual degrada el tejido vegetal mediante microscopia electrónica de barrido (MEB).
- Se identificaron los especímenes utilizados en este experimento en el Herbario de FES Iztacala y el Instituto de Biología.
- La longitud de onda óptima para el método Folin-Ciocalteu, utilizando ácido tánico como estándar, es de 666 nm en el equipo Beckmann-Coulter ® DU 800.
- El tamiz fitoquímico nos indica que el extracto etanólico posee saponinas, terpenos, esteroides, lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, polifenoles y carbohidratos reductores.
- En el caso del trigo (*Triticum aestivum* L.) no hay diferencias significativas en ninguno de los tratamientos que se manejaron en este experimento con respecto al control para ninguno de los atributos sometidos a estudio (porcentaje de germinación, longitud de coléptilo y longitud de radícula).
- De acuerdo a los ensayos efectuados, la fracción hidrosoluble del extracto de cuachalalate tiene efectos en la germinación de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *Parris Island*) a la concentración de 5 mg/mL, estandarizado a 2087.34 ppm o  $\mu\text{g/mL}$  de polifenoles totales equivalentes a ácido tánico.
- En el caso de hipocótilo y radícula de lechuga, no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

## VIII. PROSPECTIVAS

- Los ensayos de germinación pueden mejorarse, utilizando más especies vegetales receptoras; desde semillas de importancia económica y alimenticia hasta con plantas de ornato u especies vegetales salvajes.
- Una vez verificado el cambio morfológico ocurrido en la corteza con los tratamientos extractivos, se sugiere como estudio posterior, la determinación de materia extraíble del método de maceración con agitación con respecto al de sonicación para su posterior comparación y optimización.
- Se sugiere ampliar el rango de concentraciones de trabajo, usando como referencia la solución de concentración 5 mg/mL, para su evaluación en trigo y lechuga u otras semillas de importancia económica.
- Ensayos de germinación con actividades bien definidas (concentración del extracto, caracterización química del mismo y efectos biológicos específicos) procederían con pruebas en diferentes sustratos (tierra negra, hojarasca, etc.) estériles para observar la interacción del sustrato con los componentes del suelo y sus características reológicas.
- La prueba utilizada en esta tesis nos permite valorar de manera adecuada los extractos obtenidos de fuentes vegetales; primero, puede evaluarse el extracto crudo en diferentes solventes con diferentes diluciones y observar sus efectos en las especies receptoras. Si alguno de estos extractos arroja una actividad deseable, se procedería entonces con el estudio de las diferentes fracciones del extracto. La finalidad de ambas pruebas es conocer si los efectos biológicos del extracto provienen de alguna fracción en particular o de la acción sinérgica/antagónica de todos sus componentes.
- Dicho lo anterior, la evaluación de agentes sintéticos puede realizarse de igual manera con esta prueba, ajustando las condiciones de trabajo de acuerdo al interés de quien lo efectúe.

# APÉNDICES

## APÉNDICE A

### BARRIDO EFECTUADO PARA DETERMINACIÓN DE LONGITUD ÓPTIMA. (BECKMAN-COULTER ® DU 800)

Wavelength Scan – Scanning

DU 800

Instrument Name: Spectrophotometer

Serial Number: 8002982

Software Version: 2.1 Build 5

Firmware Version: 2.0.102

Method Name: <Default Method>

#	Filename	Acquired
		January 29, 2013 12:58
1		PM

Nm	Abs 1
200	3.9613
201	4.5
202	4.0124
203	4.5
204	4.0546
205	4.0721
206	4.5
207	4.5
208	4.5
209	4.1234
210	4.5
211	4.5
212	4.5
213	4.5
214	4.5
215	4.5
216	4.5
217	4.5
218	4.1912
219	4.5
220	4.1998
221	4.5
222	4.5
223	4.5

224	4.5
225	4.5
226	4.5
227	4.5
228	4.2231
229	4.5
230	4.5
231	4.5
232	4.5
233	4.5
234	4.5
235	4.5
236	4.5
237	4.5
238	4.5
239	4.5
240	4.5
241	4.2033
242	4.5
243	4.5
244	4.5
245	4.5
246	4.5
247	4.1847
248	4.5

249	4.5
250	4.1619
251	4.5
252	4.5
253	4.5
254	4.126
255	4.5
256	4.5
257	4.5
258	4.5
259	4.5
260	4.5
261	4.5
262	4.5
263	4.5
264	4.5
265	4.0103
266	4.5
267	3.9932
268	4.5
269	4.5
270	4.5
271	3.9656
272	4.5
273	4.5

274	4.5
275	4.5
276	3.9409
277	4.5
278	4.5
279	4.5
280	4.5
281	4.5
282	4.5
283	4.5
284	4.5
285	4.5
286	3.9224
287	4.5
288	4.5
289	4.5
290	4.5
291	4.5
292	4.5
293	3.9274
294	4.5
295	4.5
296	4.5
297	3.9187
298	3.9137
299	3.9075
300	3.9003
301	3.8916
302	3.4064
303	3.8753
304	3.8672
305	3.8589
306	3.5505
307	3.3674
308	3.3607
309	3.2288
310	3.1259
311	2.9742
312	2.9103
313	2.8524
314	2.7597

315	2.7536
316	2.6412
317	2.5496
318	2.5167
319	2.4212
320	2.377
321	2.2974
322	2.2299
323	2.1607
324	2.0973
325	2.0387
326	1.9805
327	1.9208
328	1.8722
329	1.8163
330	1.7674
331	1.7129
332	1.6684
333	1.6194
334	1.5738
335	1.5316
336	1.4879
337	1.4491
338	1.4063
339	1.37
340	1.3327
341	1.2934
342	1.2592
343	1.2257
344	1.1919
345	1.1594
346	1.1281
347	1.0962
348	1.0661
349	1.0372
350	1.0091
351	0.981
352	0.955
353	0.9302
354	0.9075
355	0.8908

356	0.8557
357	0.8335
358	0.8096
359	0.7885
360	0.7683
361	0.7469
362	0.7275
363	0.7091
364	0.6898
365	0.6722
366	0.6557
367	0.6398
368	0.6224
369	0.6075
370	0.5933
371	0.5782
372	0.5647
373	0.5523
374	0.5391
375	0.5272
376	0.5166
377	0.5055
378	0.4951
379	0.4856
380	0.4758
381	0.4672
382	0.4591
383	0.4509
384	0.4437
385	0.4369
386	0.4302
387	0.4239
388	0.4181
389	0.4123
390	0.4073
391	0.4028
392	0.3981
393	0.3938
394	0.3895
395	0.386
396	0.3829

397	0.3794
398	0.3767
399	0.3739
400	0.3714
401	0.3693
402	0.3676
403	0.3657
404	0.3643
405	0.3627
406	0.3611
407	0.3601
408	0.3591
409	0.3583
410	0.3578
411	0.3574
412	0.3571
413	0.3569
414	0.3567
415	0.3574
416	0.3577
417	0.3583
418	0.359
419	0.3596
420	0.3606
421	0.3617
422	0.3629
423	0.3641
424	0.3656
425	0.3669
426	0.3686
427	0.3703
428	0.372
429	0.3742
430	0.3759
431	0.378
432	0.3802
433	0.3822
434	0.3847
435	0.3868
436	0.3891
437	0.3916

438	0.3939
439	0.3965
440	0.399
441	0.4013
442	0.4041
443	0.4066
444	0.4094
445	0.4119
446	0.4145
447	0.4172
448	0.4197
449	0.4226
450	0.4253
451	0.4278
452	0.4308
453	0.4332
454	0.4361
455	0.4389
456	0.4418
457	0.4442
458	0.447
459	0.4499
460	0.4526
461	0.4556
462	0.4583
463	0.4613
464	0.464
465	0.467
466	0.4696
467	0.4723
468	0.4752
469	0.4779
470	0.4808
471	0.4835
472	0.4862
473	0.4888
474	0.4917
475	0.4942
476	0.4968
477	0.4997
478	0.5021

479	0.5049
480	0.5075
481	0.5103
482	0.5129
483	0.5158
484	0.5183
485	0.5211
486	0.5237
487	0.5265
488	0.5291
489	0.5319
490	0.5345
491	0.5374
492	0.54
493	0.5426
494	0.5455
495	0.5482
496	0.551
497	0.5536
498	0.5566
499	0.5591
500	0.5621
501	0.5648
502	0.5676
503	0.5703
504	0.5734
505	0.5759
506	0.5789
507	0.5817
508	0.5846
509	0.5872
510	0.5903
511	0.5928
512	0.5959
513	0.5986
514	0.6017
515	0.6042
516	0.6073
517	0.6102
518	0.6129
519	0.6158

520	0.6185
521	0.6214
522	0.6241
523	0.627
524	0.6296
525	0.6326
526	0.6352
527	0.6379
528	0.6406
529	0.6433
530	0.6459
531	0.6486
532	0.6511
533	0.6538
534	0.6564
535	0.6589
536	0.6615
537	0.6639
538	0.6665
539	0.6687
540	0.6712
541	0.6735
542	0.6759
543	0.6784
544	0.6806
545	0.6828
546	0.6851
547	0.6873
548	0.6893
549	0.6915
550	0.6936
551	0.6955
552	0.6976
553	0.6995
554	0.7012
555	0.7025
556	0.7058
557	0.7076
558	0.7094
559	0.7112
560	0.713

561	0.7148
562	0.7167
563	0.7185
564	0.7202
565	0.7217
566	0.7234
567	0.725
568	0.7266
569	0.7282
570	0.7297
571	0.7313
572	0.7328
573	0.7342
574	0.7359
575	0.7373
576	0.7388
577	0.7403
578	0.7416
579	0.7431
580	0.7446
581	0.7459
582	0.7473
583	0.7486
584	0.7498
585	0.7513
586	0.7526
587	0.754
588	0.7552
589	0.7564
590	0.7577
591	0.759
592	0.7603
593	0.7615
594	0.7627
595	0.764
596	0.7651
597	0.7664
598	0.7676
599	0.7687
600	0.77
601	0.771

602	0.7721
603	0.7732
604	0.7743
605	0.7755
606	0.7765
607	0.7776
608	0.7785
609	0.7796
610	0.7806
611	0.7816
612	0.7826
613	0.7835
614	0.7844
615	0.7853
616	0.7862
617	0.787
618	0.788
619	0.7886
620	0.7894
621	0.7902
622	0.791
623	0.7917
624	0.7923
625	0.793
626	0.7937
627	0.7943
628	0.7949
629	0.7953
630	0.796
631	0.7965
632	0.797
633	0.7975
634	0.798
635	0.7984
636	0.799
637	0.7992
638	0.7997
639	0.8001
640	0.8004
641	0.8007
642	0.8011

643	0.8014
644	0.8017
645	0.8018
646	0.8022
647	0.8025
648	0.8026
649	0.8028
650	0.803
651	0.8032
652	0.8034
653	0.8035
654	0.8036
655	0.8037
656	0.8038
657	0.8039
658	0.804
659	0.8041
660	0.804
661	0.8041
662	0.8042
663	0.8041
664	0.8042
665	0.8042
666	0.8043
667	0.8042
668	0.8042
669	0.8041
670	0.8039
671	0.8038
672	0.8037
673	0.8037
674	0.8036
675	0.8036
676	0.8035
677	0.8034
678	0.8031
679	0.8029
680	0.8027
681	0.8027
682	0.8025
683	0.8024

684	0.8021
685	0.802
686	0.8018
687	0.8016
688	0.8014
689	0.8011
690	0.8009
691	0.8006
692	0.8005
693	0.8001
694	0.7999
695	0.7995
696	0.7993
697	0.7992
698	0.7988
699	0.7985
700	0.7981
701	0.7978
702	0.7974
703	0.797
704	0.7967
705	0.7963
706	0.796
707	0.7957
708	0.7953
709	0.7947
710	0.7942
711	0.7939
712	0.7935
713	0.7929
714	0.7925
715	0.7922
716	0.7916
717	0.7911
718	0.7907
719	0.7901
720	0.7895
721	0.7891
722	0.7884
723	0.7877
724	0.7871

725	0.7864
726	0.7859
727	0.7851
728	0.7844
729	0.7838
730	0.783
731	0.7824
732	0.7815
733	0.7808
734	0.7804
735	0.7791
736	0.7782
737	0.7774
738	0.7765
739	0.7757
740	0.7749
741	0.7739
742	0.7729
743	0.772
744	0.7712
745	0.7703
746	0.7694
747	0.7682
748	0.7672
749	0.7664
750	0.7655
751	0.7643
752	0.7633
753	0.7624
754	0.7612
755	0.7602
756	0.7591
757	0.7579
758	0.7567
759	0.7557
760	0.7544
761	0.7533
762	0.752
763	0.7508
764	0.7497
765	0.7485



766	0.7474
767	0.7461
768	0.7449
769	0.7435
770	0.7425
771	0.7411
772	0.7399
773	0.7386
774	0.7373
775	0.7361
776	0.7346
777	0.7333

778	0.7318
779	0.7307
780	0.7292
781	0.7279
782	0.7267
783	0.7253
784	0.7239
785	0.7225
786	0.7209
787	0.7196
788	0.7183
789	0.7168

790	0.7154
791	0.714
792	0.7126
793	0.7111
794	0.7098
795	0.7081
796	0.7068
797	0.7054
798	0.7042
799	0.7033
800	0.7033

## APÉNDICE B

Cuantificación de polifenoles totales de los extractos de cuachalalate

**Datos A. Primer ensayo cuantitativo: lectura de muestras a una longitud de onda de 666 nm, con sólido disuelto y cuantificación de polifenoles totales**

Masa disuelta (g)	Equivalencia en mg	[ $\epsilon$ ] (mg/mL)	Abs	Normalización	Concentración en sistemas (ppm)	Concentración total (ppm)	Promedio
0.0583	58.3	1.166	0.1729	0.1482	2.4261	485.2363	
0.0583	58.3	1.166	0.1853	0.1589	2.5988	519.7774	
0.0583	58.3	1.166	0.1837	0.1575	2.5766	515.3203	506.7780
0.1123	112.3	2.246	0.3003	0.1337	4.2005	840.1111	
0.1123	112.3	2.246	0.3331	0.1483	4.6573	931.4763	
0.1123	112.3	2.246	0.2895	0.1288	4.0501	810.0278	860.5585
0.1566	156.6	3.132	0.5117	0.1633	7.1448	1428.969	
0.1566	156.6	3.132	0.5036	0.1607	7.0320	1406.4066	
0.1566	156.6	3.132	0.5258	0.1678	7.3412	1468.2451	1434.5403
0.20733	207.33	4.1466	0.6546	0.1578	9.1350	1827.0195	
0.20733	207.33	4.1466	0.6705	0.1616	9.3565	1871.3091	
0.20733	207.33	4.1466	0.6516	0.1571	9.0933	1818.6629	1838.9972
0.2499	249.9	4.998	0.7752	0.1551	10.8147	2162.9526	
0.2499	249.9	4.998	0.7425	0.1485	10.3593	2071.8660	
0.2499	249.9	4.998	0.7678	0.1536	10.7116	2142.3398	2125.7195
Promedio	0.15344641						
STD	0.01026689						
CV	6.69086394						

**Datos B. Segundo ensayo cuantitativo: lectura de muestras a una longitud de onda de 666 nm, con extracto disuelto y cuantificación de polifenoles totales**

<b>Masa disuelta (g)</b>	<b>Equivalencia en mg</b>	<b>□ (mg/mL)</b>	<b>Abs</b>	<b>Normalización</b>	<b>Concentración en sistemas (ppm)</b>	<b>Concentración total (ppm)</b>	<b>Promedio</b>
0.0564	56.4	1.128	0.1708	0.1514	2.3969	479.3877	
0.0564	56.4	1.128	0.1792	0.1588	2.5139	502.7855	
0.0564	56.4	1.128	0.167	0.1480	2.3440	468.8022	483.6583
0.1011	101.1	2.022	0.333	0.1646	4.6559	931.1977	
0.1011	101.1	2.022	0.3161	0.1563	4.4206	884.1225	
0.1011	101.1	2.022	0.3289	0.1626	4.5988	919.7771	911.6991
0.1583	158.3	3.166	0.5179	0.1635	7.2311	1446.239	
0.1583	158.3	3.166	0.5074	0.1602	7.0849	1416.991	
0.1583	158.3	3.166	0.5074	0.1602	7.1671	1433.426	1432.2191
0.2046	204.6	4.092	0.6441	0.1574	8.9888	1797.771	
0.2046	204.6	4.092	0.6027	0.1472	8.4122	1682.451	
0.2046	204.6	4.092	0.6298	0.1539	8.7896	1757.938	1746.0538
0.2611	261.1	5.222	0.7443	0.1425	10.3844	2076.880	
0.2611	261.1	5.222	0.7031	0.1346	9.8105	1962.116	
0.2611	261.1	5.222	0.7107	0.1360	9.9164	1983.286	2007.4280
Promedio	0.15332412						
STD	0.00943095						
CV	6.15098748						

**Datos C. Tercer ensayo cuantitativo: lectura de muestras a una longitud de onda de 666 nm, con extracto disuelto y cuantificación de polifenoles totales**

<b>Masa disuelta (g)</b>	<b>Equivalencia en mg</b>	<b>[<math>\epsilon</math>] (mg/mL)</b>	<b>Abs</b>	<b>Normalización</b>	<b>Concentración en sistemas (ppm)</b>	<b>Concentración total (ppm)</b>	<b>Promedio</b>
0.0529	52.9	1.058	0.1794	0.1695	2.67966574	535.933148	
0.0529	52.9	1.058	0.179	0.1691	2.67409471	534.818942	
0.0529	52.9	1.058	0.1847	0.1745	2.75348189	550.696379	540.4828
0.1054	105.4	2.108	0.3345	0.15868121	4.83983287	967.966574	
0.1054	105.4	2.108	0.3411	0.16181214	4.93175487	986.350975	
0.1054	105.4	2.108	0.3241	0.15374763	4.69498607	938.997214	964.4382
0.1539	153.9	3.078	0.5331	0.17319688	7.60584958	1521.16992	
0.1539	153.9	3.078	0.5231	0.16994802	7.46657382	1493.31476	
0.1539	153.9	3.078	0.5327	0.17306693	7.60027855	1520.05571	1511.5134
0.2028	202.8	4.056	0.6534	0.16109467	9.28133705	1856.26741	
0.2028	202.8	4.056	0.6466	0.15941815	9.18662953	1837.32591	
0.2028	202.8	4.056	0.6376	0.15719921	9.06128134	1812.25627	1835.2831
0.2627	262.7	5.254	0.7576	0.1441	10.7325905	2146.51811	
0.2627	262.7	5.254	0.7495	0.1426	10.6197772	2123.95543	
0.2627	262.7	5.254	0.7467	0.1421	10.5807799	2116.15599	2128.8765
Promedio	0.16069735						
STD	0.01079747						
CV	6.71913586						

## APÉNDICE C

### SOLUCIONES Y REACTIVOS DE IDENTIFICACIÓN FITOQUÍMICA

#### Alcaloides

1. El extracto a evaluar se disuelve en agua u disolvente adecuado y se acidula.
2. Se añade una gota del reactivo para la evaluación de alcaloides. El resultado deberá compararse con un estándar y confirmado por 2 o más pruebas con los diferentes reactivos para alcaloides (Domínguez, 1988).
3. El reactivo de Wagner genera precipitados floculados de color marrón; el reactivo de Mayer genera sólidos amarillo-blancos cuando es positiva; el reactivo de Dragendorff genera sólidos naranja-marrón (Domínguez, 1988); con el reactivo de Hager se observa la formación de cristales en forma de aguja del picrato de alcaloide y finalmente, ácido silicotúngstico forma un precipitado floculado color crema o beige.

Reactivo	Preparación.
Wagner	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Disolver 1.27 g de iodo resublimado y 2 g de ioduro de potasio en 20 mL de agua.</li><li>2. Aforar la solución a 100 mL con agua destilada.</li></ol>
Mayer	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Disuelva 1.358 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua.</li><li>2. Adicione a una solución de 5 g de ioduro de potasio en 10 mL de agua.</li><li>3. Afore con suficiente agua para llegar al volumen de 100 mL (Lide, 2005).</li></ol>
Dragendorff	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20 mL de ácido nítrico (30%) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.</li><li>2. En otro matraz Erlenmeyer, coloque 27.2 g de ioduro de potasio con 50 mL de agua.</li><li>3. Mezclar las soluciones y dejar reposar 24 h.</li><li>4. Decantar la solución y aforar a 100 mL.</li></ol>
Hager	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Solución saturada de ácido pícrico.</li></ol>
Ácido silicotúngstico	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Se disuelven 12 g de ácido en agua y se aforan a 100 mL.</li></ol>

#### Carbohidratos reductores

##### Prueba de Fehling

1. La fracción concentrada a seco en agua se trata con una mezcla de 1 mL de reactivo de Fehling A y 1 mL de Fehling B.
2. Calentar de 15 minutos.

3. La aparición de un color o precipitado rojo indica la presencia de azúcares reductores (Lastra & Cuéllar, 1994).

<b>Reactivo</b>	<b>Preparación</b>
Fehling	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La solución A consiste en 3.5 g de sulfato de cobre pentahidratado aforado a 50 mL.</li> <li>2. La solución B consiste en 17.5 g de tartrato de sodio y potasio más 5 g de hidróxido de sodio, aforados a 50 mL con agua destilada.</li> </ol>

#### Prueba de Benedict

1. Añadir 0.5 mL del líquido problema a un tubo de ensayo con 5 mL del reactivo de Benedict.
2. Calentar la mezcla en agua hirviendo por 5 minutos.
3. La aparición de un precipitado verde, amarillo o rojo-naranja da una estimación semicuantitativa de la cantidad de carbohidrato reducto existente (Harper, 1976).

<b>Reactivo</b>	<b>Preparación</b>
Benedict	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Disolver 17.3 g de citrato de sodio más 10 g de carbonato de sodio anhidro en 60 mL de agua destilada.</li> <li>2. La mezcla se añade lentamente y con agitación a una mezcla preparada previamente con 1.73 g de sulfato de cobre pentahidratado y 15 mL de agua.</li> <li>3. Se afora a 100 mL.</li> </ol>

#### Saponinas

##### Rosenthaler

1. A una porción del extracto se le adiciona 1 gota del extracto y 1 gota de reactivo de Rosenthaler.
2. Adicionar 1-2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, coloraciones rojas o violetas indican la presencia de terpenos pentacíclicos (Valencia del Toro & Garín Aguilar, 2010).

<b>Reactivo</b>	<b>Preparación</b>
Rosenthaler	Diluir 1 gramo de vainillina en 100 mL de etanol.

## Espuma

1. Se utiliza 1 mL del extracto etanólico, se le adicionan 5 mL de agua tibia y se agita fuertemente durante 2 minutos.
2. Si aparece espuma estable que dura por más de 5 minutos, esto indica la presencia de saponinas (Lastra & Cuéllar, 1994).

## Triterpenos/Esteroles (Liebermann-Buchard)

1. Disolver una porción del extracto con 1 mL de cloroformo.
2. Agregar 1 mL de anhídrido acético y dejar resbalar por las paredes del tubo, dejar reposar en frío.
3. Añadir de 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
4. La aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase se considera positiva.

## Taninos

1. Se divide el extracto en 2 porciones diferentes:
  - a) Cloruro férrico – Numerosos fenoles dan coloraciones características con esta solución debido a la formación de complejos (Devore & Muñoz Mena, 1974).
  - b) Gelatina – La formación de un precipitado indica la presencia de taninos (Rangari, 2007).

<b>Reactivo</b>	<b>Preparación</b>
Cloruro férrico.	1. Disolver 1.25 g de cloruro férrico en 25 mL de agua y aforar a 50 mL con alcohol metílico
Gelatina	1. 1 g de gelatina pura se hidrata con 100 mL de agua.

## Flavonoides (Shinoda)

1. Se toma un tubo de ensaye con el extracto a evaluar y se le añade una viruta de magnesio.
2. Se prosigue la prueba con la adición de ácido clorhídrico concentrado.
3. Las coloraciones que van del amarillo al rojo azulado, pasando por el anaranjado se consideran positivas (Barba, 1997).

## Glucósidos cianogénicos

1. Se coloca una tira de papel impregnada con el reactivo de Guignard en la boca del tubo que contenga un poco del extracto etanólico con unas gotas de cloroformo.
2. Calentar a 30-35 ° C y ver la coloración que aparece en el papel.
3. Colores del rojo al rosa son considerados como positivos (Barba, 1997).

Reactivo	Preparación
Guignard	1. Aforar 1 g de carbonato de sodio y 100 mg de ácido pícrico a 100 mL

Lactonas sesquiterpénicas (Baljet)

1. Mezclar 0.5 mL de solución A con 0.5 mL de la solución B.
2. Adicionar unos miligramos del residuo alcohólico. La aparición de una coloración naranja o roja oscura, se considera positiva (Barba, 1997).

Reactivo	Preparación
Solución A	1. Disolver 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol.
Solución B	1. Disolver 10 g de hidróxido de sodio y aforar a 100 mL con agua destilada.

### CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Solución patrón de Ácido Tánico (1 mg/ml)

Considerando que la pureza del reactivo, los cálculos efectuados fueron:

$$100 \text{ mL} \times \left( \frac{1 \text{ mg de Ácido Tánico}}{\text{mL}} \right) \left( \frac{100 \text{ mg de Ácido Tánico R. A.}}{88 \text{ mg de Ácido Tánico}} \right) \\ = 114 \text{ mg de Ácido Tánico R. A.}$$

1. Disolver la cantidad de ácido tánico calculada con una solución acuosa de DMSO al 1%.
2. Aforar con esta solución a 100 mL con agua destilada.

Solución de carbonato de sodio

1. Disolver 20 g de carbonato de sodio anhidro en 80 mL de agua y llevar a ebullición.
2. Aforar a 100 mL y almacenar hasta su uso.



## APÉNDICE D

### GLOSARIO

**Coléptilo.** Vaina o estuche que cubre la plúmula en el embrión de las gramíneas.

**Cotiledón.** Estructura similar a una hoja que se encuentra en las semillas de las plantas con flores, aparecen durante la germinación de las semillas, a veces se denominan "hojas" de las semillas u hojas seminales. La primera o cada una de las primeras hojas de la planta, que se forman en el embrión.

**Epicótilo.** Porción del eje comprendida entre el punto de inserción de los cotiledones y las primeras hojas.

**Epigea (germinación).** Tipo de plántula en donde el hipocótilo se desarrolla de manera considerable y emerge junto con los cotiledones fuera del sustrato en donde se encuentra sembrado.

**Floema.** Tejido complejo que, en las plantas de las flores, consta parcialmente de miembros de tubo criboso, de células compañeras, parénquima y fibras; la principal función del floema es la conducción de alimento.

**Hipocólito.** Porción comprendida entre la radícula y el punto de inserción de los cotiledones.

**Hipogea (germinación).** Tipo de plántula, los cotiledones permanecen enterrados en el sustrato donde se entierran y únicamente la plúmula sobresale.

**Marco.** Materia vegetal remanente de un proceso extractivo.

**Plúmula.** Yema apical del embrión.

**Radícula.** Un órgano vegetal, que por regla general subterráneo, que comprende la porción del eje de la planta que sirve típicamente para anclarla y para absorción de agua y elementos nutricios.

**Testa.** Cubierta seminal, desarrollada a partir del integumento o de los integumentos de un óvulo.

**Yema.** Es un tallo de estructura apical o terminal que consta de una pequeña masa de tejido meristemático total o parcialmente cubierta por hojas imbricadas.

## APÉNDICE E

Fórmulas estadísticas utilizadas. (MILLER & MILLER, 2002) (SERRANO GALLEGOS, 2003)

### Desviación estándar.

Desviaciones en y.	Desviación de la pendiente.	Desviación de la ordenada al origen.
$s_{y/x} = \sqrt{\sum_i \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$	$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$	$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$
<p>Donde <math>s_{y/x}</math> es la desviación estándar en y; <math>n</math> es el número de puntos que posee la curva; <math>y_i</math> es el valor experimental de cada punto de la curva; <math>\hat{y}_i</math> es el valor estimado de <math>y</math> obtenido de la ecuación de la recta.</p>	<p><math>s_b</math> es desviación estándar de la pendiente; <math>s_{y/x}</math> es la desviación estándar en y; <math>x_i</math> es el valor real de cada punto en el eje x; <math>\bar{x}</math> es el valor medio de los valores que se encuentran en el eje x.</p>	<p><math>s_a</math> es desviación estándar de la ordenada al origen; <math>s_{y/x}</math> es la desviación estándar en y; <math>x_i</math> es el valor real de cada punto en el eje x; <math>\bar{x}</math> es el valor medio de los valores que se encuentran en el eje x.</p>

### Intervalos de confianza para una recta que proviene de una curva de calibración.

*Límites de confianza para pendiente:  $b \pm t_{(n-2)}s_b$*

*Límites de confianza para ordenada al origen:  $a \pm t_{(n-2)}s_a$*

En los límites de confianza para la pendiente,  $b$  equivale al valor de la pendiente,  $t$  es el valor del estadístico  $t$ ;  $n-2$  son los grados de libertad, donde  $n$  es el número de puntos que forman la curva; y  $s_b$  es la desviación estándar de pendiente.

En los límites de confianza para la ordenada al origen,  $a$  equivale al valor de la ordenada,  $t$  es el valor del estadístico  $t$ ;  $n-2$  son los grados de libertad, donde  $n$  es el número de puntos que forman la curva y  $s_a$  es la desviación estándar de la ordenada.

**Límite de detección.** Determina la mínima cantidad detectable por un método analítico.

$$LOD = y_b + 3s_b$$

Donde  $y_b = a$ ; esto es que los valores de la ordenada al origen ( $a$ ) es y  $s_b = s_{y/x}$ ; la desviación estándar de la pendiente es igual a la desviación estándar de  $y$  con respecto a  $x$ .

**Prueba de F.** Para determinar si las desviaciones estándar de dos grupos de datos son significativamente diferentes. Los datos deben introducirse de manera que el resultado de  $\geq 1$ .

$$F_{cal} = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$$

Donde  $F_{cal}$  es el valor de F calculado,  $\sigma_1^2$  es la desviación estándar del grupo de datos 1 elevada al cuadrado y  $\sigma_2^2$  es la desviación estándar del grupo de datos 2.

**Estadístico t.** Cuando se determina que no hay diferencias significativas entre los grupos de datos después de efectuar la prueba de F, se utiliza esta fórmula:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde  $\bar{x}_1$  es la media del grupo de datos 1,  $\bar{x}_2$  es la media del grupo de datos 2;  $s$  es la varianza calculada;  $n_1$  es el tamaño de muestra del grupo de datos 1 y  $n_2$  es el tamaño de muestra del grupo de datos 2.

**Calculo de la varianza s.** Para cuando las diferencias de las desviaciones estándar de los 2 grupos de datos no son significativas:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Donde  $s$  es la desviación estándar;  $n_1$  es el tamaño de muestra del grupo de datos 1 y  $n_2$  es el tamaño de muestra del grupo de datos 2;  $s_1^2$  es la desviación estándar elevada al cuadrado del primer grupo de datos,  $s_2^2$  es la desviación estándar elevada al cuadrado del segundo grupo de datos.

**Estadístico t.** Para cuando las desviaciones estándar de dos grupos de datos que se comparan tienen diferencias significativas.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Donde t es el valor del estadístico t calculado;  $\bar{x}_1$  es la media del grupo de datos 1;  $\bar{x}_2$  es la media del grupo de datos 2;  $n_1$  es el tamaño de muestra en el grupo de datos 1;  $n_2$  es el tamaño de muestra del grupo de datos 2;  $s_1^2$  es la desviación estándar elevada al cuadrado del primer grupo de datos,  $s_2^2$  es la desviación estándar elevada al cuadrado del segundo grupo de datos.

**Grados de libertad.** El resultado obtenido deberá ser redondeado para seleccionar el número entero más cercano y encontrarlo en la tabla del estadístico t.

$$g. L. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)}$$

En esta fórmula se determinan los grados de libertad, donde  $n_1$  es el tamaño de muestra del grupo de datos 1 y  $n_2$  es el tamaño de muestra del grupo de datos 2;  $s_1^2$  es la desviación estándar elevada al cuadrado del primer grupo de datos,  $s_2^2$  es la desviación estándar elevada al cuadrado del segundo grupo de datos.

## APÉNDICE F

### EQUIPO Y MATERIAL UTILIZADO

#### Material

- Cajas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro
- Pipetas volumétricas 5 mL
- Pera para pipetear
- Papel filtro Whatman no. 1
- Regla de 30 cm
- Tijeras
- Molino
- Frascos ámbar 100 mL
- Tubos de vidrio
- Espátula metálica
- Matraces aforados 10 mL
- Micropipetas de 10 a 100  $\mu\text{L}$  y de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  Optipette® HTL Lab Solutions
- Matraz de bola 150 mL
- Tubos cónicos de centrifuga 40 mL
- Soporte universal
- Embudo de vidrio
- Molino de grano
- Pinzas metálicas

#### Equipo

- Balanza analítica OHAUS PA214
- Balanza semi-analítica OHAUS Pionner™
- Espectrofotómetro Beckmann-Coulter® 800 DU
- Centrifuga Solbat J-40®
- Rotavapor BUCHI® R-205
- Máquina de sonicación Elma® Ultrasonic LC30H
- Agitador magnético

## REFERENCIAS

- Barba, C. J. (1997). *Introducción al análisis de los productos naturales. Laboratorio de Fitoquímica*. México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Blanco, Y. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 5-16.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. En J. Bruneton, *Farmacognosia* (pág. 6). España: Acribia.
- Castillo J., I., Rivero C., F., Celis, H., & Romero, I. (2007). Anti-Helicobacter pylori activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*(114), 72-77.
- Chemat, F., Zill-e, H., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835.
- CNQFB México A.C. (2003). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. México D.F.: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.
- Colegate, S., & Molyneux, R. (2007). *Bioactive natural products: Detection, isolation and structural determination*. New York: CRC Press.
- Daniels, W. W. (2007). *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. México D.F.: Limusa-Wiley.
- Dayan, F., Owens, D., & Duke, O. (2012). Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest Manag. Sci.*(68), 519-528.
- De Albuquerque, M. B., & et al. (2010). Allelopathy: an alternative tool to improve cropping systems - A review. *Agron. Sustain. Dev*(31), 379 395.
- Devore, G., & Muñoz Mena, E. (1974). *Química Orgánica*. México D.F.: Publicaciones Culturales S.A.
- Domínguez, X. A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. México D.F.: LIMUSA.
- Duke, S. O. (2010). Allelopathy: Current status of research and future of the discipline: A Commentary. *Allelopathy Journal*, 25(1), 17-30.
- FAO. (2002). *Wheat growth and physiology*. Obtenido de Bread Wheat: Improvement and Production: <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e00.htm#Contents>
- Flores Garza, M. (1999). *Patente nº 5869059*. USA.
- García Brejo, F. J., Rosello Caselles, J., & Santamarina Siurana, M. P. (2006). *Introducción al funcionamiento de las plantas*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

- García González, K. Y. (2006). Principales usos y posibles acciones farmacológicas del cuachalalate (*Amphypteryngium adstringens* Schiede ex Schltdl). *InFÁRMate*(7).
- Grajales Muñiz, O. (2010). *Fisiología vegetal*. México: UNAM FES Cuautitlán.
- Harper, H. A. (1976). *Manual de química fisiológica*. (G. Anguiano L., Trad.) México: El Manual Moderno S.A.
- Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. España: Reverte.
- Hibino, T. (2004). *Patente nº 10/363,682*. USA.
- Hui-Li, Z., Wang, Q., & Ruan, X. (2010). Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*(15), 8933-8952.
- Interjit. (1996). Plant phenolics in allelopathy. *Botanical Review*, 62(2), 186-202.
- Jankievics, L. S. (1989). *Desarrollo vegetal: sustancias reguladoras*. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Jordan, M., & Casaretto, J. (2006). Capítulo XVI Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. En F. A. SQUEO, & L. CARDEMILL, *Fisiología vegetal* (págs. 3-27). La Serena, Chile: Universidad de la Serena.
- Lastra, H., & Cuéllar, A. (4-21 de Abril de 1994). Curso-Taller Utilización de Productos naturales en la Industria Farmacéutica. *Tamizaje fitoquímico de plantas medicinales*. La Habana, Cuba: Universidad de la Habana.
- Leonelli, C., & Mason, T. J. (2010). Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chemical Engineering and Processing*, 48(9), 885–900.
- Leong, T., Ashokumar, M., & Kentish, S. (2011). The fundamentals of power ultrasound - a Review. *Acoustics Australia*, 39(2), 54-63.
- Lide, D. R. (2005). *CRC Handbook of chemistry and physics*. New York: CRC Press.
- Lira Saldivar, R. H., & et al. (2007). Bioplaguicidas de origen vegetal: El caso de los extractos y productos derivados del arbusto de Gobernadora (*Larrea tridentata*). En R. Lira Saldivar, *Bioplaguicidas y control biológico* (págs. 13-29). Coahuila: COFUPRO.
- Llallana,, M. d., Elizalde, J. H., & et al. (2008). Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* L.: determinación de calidad de agua en represas para riego. *Rev. FCA UNCuyo*, 40(1), 29-38.
- Macias, F. A., Molinillo, J. G., & Castellano, D. (2000). Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 48(6), 2512-2521.
- Mas Oliva, J., & Hurtado Bocanegra, M. (2012). *Patente nº PCT/MX2011/000149*. México.

- Mata, R., Calzada, F., & Navarrete, A. (1991). Longchain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2-3), 147-154.
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Madrid: Prentice Hall.
- Moreno Mtz., E. (1996). *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*. Cuautitlán, México.: UNAM FES Cuautitlán.
- Navarrete, A., Martínez Uribe, L. S., & Reyes, B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, 12(1), 1-4.
- Niazi, S. K. (2002). *Patente nº 6365198*. USA.
- Oviedo Sánchez, I., Ramirez Apán, T., & et al. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 11(5), 436–445.
- Raman, V., & Abbas, A. (2008). Experimental investigations on ultrasound mediated particle breakage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(1), 55-64.
- Rangari, V. D. (19 de Agosto de 2007). *Tannins containing drugs*. Obtenido de Pharmacognosy: <http://nsdl.niscair.res.in/bitstream/123456789/591/1/revised+Tannins+containing+Drugs.pdf>
- Rangma, S. (1986). *Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products*. New York: Tata McGraw-Hill Education.
- Saenz Peña, C., & et al. (2008). *Ecología de las comunidades*. (U. N. Nordeste, Editor) Recuperado el 12 de agosto de 2013, de Hipertextos del área de biología: <http://www.biologia.edu.ar/ecologia/ECOLOGIA%20DE%20LAS%20COMUNIDADES.htm>
- Salager, J.-L. (2002). *Surfactantes Tipos y Usos*. Mérida: Universidad de los Andes.
- Sampietro, D. (2001). *Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia*. Recuperado el 7 de abril de 2012, de <http://www.ual.es/personal/edana/bot/mh/complemento/docufijos/revalelo.htm>
- Schonbeck, M. (30 de agosto de 2011). *How Cover Crops Suppress Weeds*. Obtenido de eXtension: More mind reach: <http://www.extension.org/pages/18524/how-cover-crops-suppress-weeds>
- Serrano Gallegos, R. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos*. Castellón de la Plana: Universitat Jaume I.



- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*(53), 10-23.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Soto Hernández, M., Olivera Ortega, A. G., & et al. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipherygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1-3), 109–113.
- Toma, M., Paniwnyk, L., & Vinatoru, M. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*(8), 137–142.
- UNAM. (Septiembre de 2012). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Cuachalalate*. Obtenido de Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cuachalalate&id=7945>
- Valencia del Toro, G., & Garín Aguilar, M. E. (2010). *Manual de Prácticas de Productos Naturales*. México D.F.: UPIBI IPN.
- Vilkhu, K., Mawson, R., & et al. (2008). Applications and oportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*(9), 161-169.
- Villar del Fresno, M. A. (1999). *Farmacognosia General*. Madrid: SINTESIS.
- Vyvyan, J. (2002). Allelochemicals as lead for new herbicides and agrochemicals. *TETRAHEDRON*, 58, 1631-1646.
- Walton, H. F., & Reyes, J. (1983). *Análisis químico e instrumental moderno*. Madrid: Reverte.
- Waterhouse, A. (2002). *Determination of Total Phenolics*. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Obtenido de Supplement 6. John Wiley & Sons Inc: <http://www.nshvtv.org/ebook/molbio/Current%20Protocols/CPFAC/fai0101.pdf>
- Weaver, W. W. (1997). *Heirloom Vegetable Gardening: A Master Gardener's Guide to Planting, Seed Saving and Cultural History*. New York: Henry Holt and Company.
- Yongqing, M. (2005). Allelopathic studies of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Weed Biology and Management*, 5, 93-105.