

QK524
D5B8



REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO INTERDISCIPLINARIO EN QUÍMICA APLICADA (PIQA)
GRUPO DE QUÍMICA ECOLÓGICA

**Potencial alelopático del *Pteridium caudatum* (L.) Maxon (Pteridophyta:
Dennstaedtiaceae)**

www.bdigital.ula.ve

Autora: Lic. Daisy Yenifer Buendía Duque

Tutora: Dra. María Pía Calcagno

Co-tutor: Dr. Alberto Oliveros



Mérida, Mayo 2013

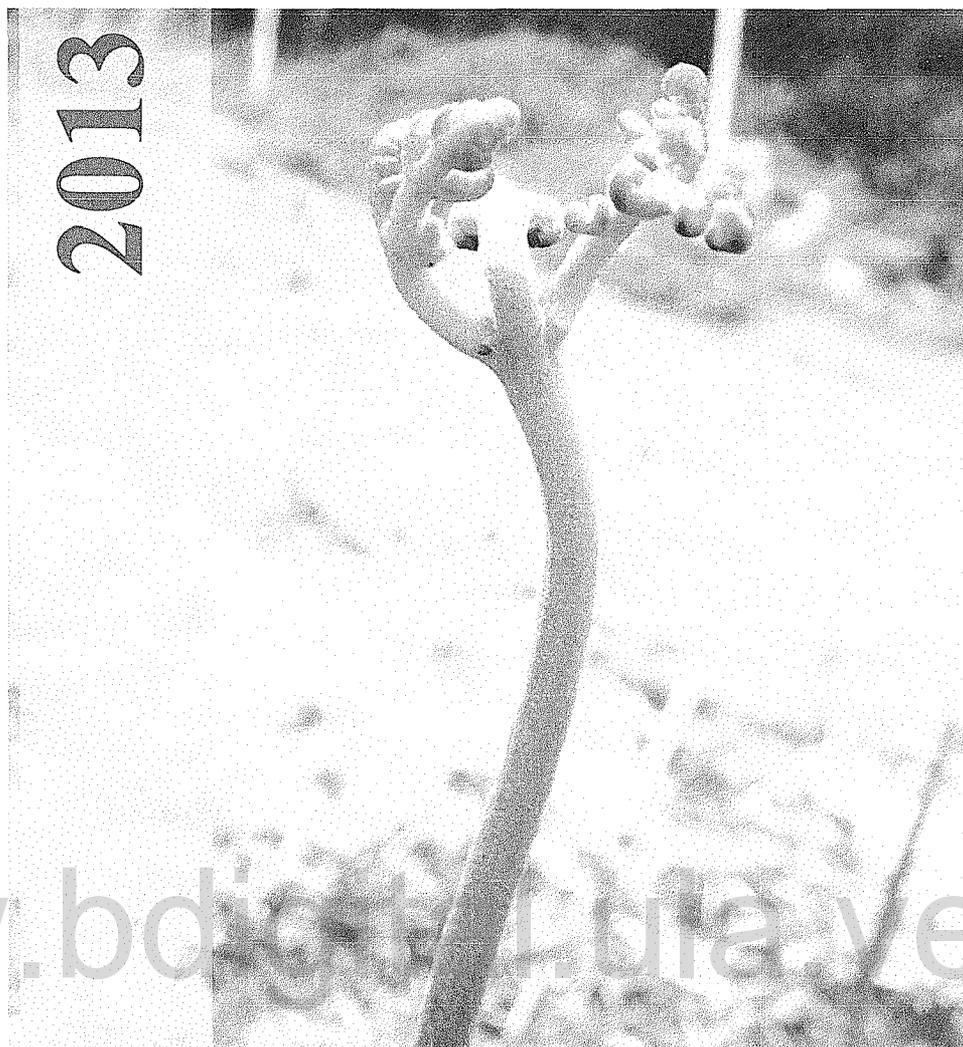


Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Potencial alelopático del
Pteridium caudatum (L.) Maxon
(Pteridophyta: Dennstaedtiaceae)**

Trabajo Especial de Grado de Maestría

2013



www.bdigital.ula.ve

**Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Postgrado Interdisciplinario en Química
Aplicada
Grupo de Química Ecológica**



**UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MÉRIDA VENEZUELA**



GQE

Lic. Daisy Buendía

**Tutora: Dra. María Pía Calcagno
Co-Tutor: Dr. Alberto Oliveros**

Mérida, mayo 2013

**Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)**

Resumen

El *Pteridium* es considerado la quinta maleza más distribuida en todo el mundo y se ha propuesto que tan amplia distribución se debe a diferentes estrategias adaptativas como lo es la defensa química asociada a sus metabolitos secundarios. En este estudio, se tiene como objetivo determinar si la actividad fitotóxica observada en el *Pteridium caudatum* podría estar relacionada con la cumarina presente en sus tejidos, la cual en conjunto con otros metabolitos secundarios, como las pterosinas A y B, los ácidos fenólicos y taninos, podrían estar ejerciendo una función alelopática. En este trabajo, se evalúa el contenido de estos metabolitos, en los extractos acuosos y orgánicos de *P. caudatum* (frondes en sus diferentes etapas fenológicas, rizomas y esporas) y en muestras de suelo circundantes a las plantas en estudio. Así mismo, se estudia la actividad fitotóxica de los macerados acuosos de los frondes y los efectos de la cumarina patrón sobre el desarrollo de plántulas de *Lactuca sativa* en medio hidropónico. Los resultados revelan la presencia de cumarina a nivel de trazas en las esporas, sugiriendo que pudiera cumplir una función ecológica durante el proceso de dispersión y germinación de las mismas. El contenido total de cumarina y compuestos fenólicos alcanzan los valores máximos en los frondes verdes, donde la actividad fotosintética es máxima y el potencial de compuestos lixiviables disminuye a medida que el fronde avanza hacia su madurez, lo cual pudiera ser consecuencia de la mayor lignificación de las paredes celulares de las células vegetales. En cuanto a la actividad fitotóxica, las pterosinas A y B cuantificadas en los macerados acuosos de los frondes, no muestran efectos sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa*. Por su parte, la fitotoxicidad registrada para la cumarina demostró que ésta pudiera jugar una función primordial en el potencial alelopático del *P. caudatum*, aunque los compuestos fenólicos podrían estar actuando de manera conjunta. Los bioensayos hidropónicos, sugirieron que la cumarina es absorbida por los tallos y hojas de *L. sativa* ejerciendo un efecto fitotóxico en una manera similar a los herbicidas post-emergentes. Finalmente, la cumarina no fue detectada en el suelo en niveles iguales o mayores a 0,001 mg/Kg de suelo seco. Este resultado podría deberse a varios factores como: metodología no óptima para la extracción de cumarina de este tipo de matriz, procesos de retención o absorción irreversible en el suelo, degradación microbiana ó pérdida por escorrentía debido a un buen drenaje. Se concluye que, la cumarina en *P. caudatum* es parte de la defensa química que esta especie presenta como estrategia competitiva ante las otras especies de plantas cumpliendo una función alelopática.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Introducción.....	1
CAPÍTULO 1	3
MARCO TEÓRICO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1.- Metabolitos secundarios.....	3
1.2.- Alelopatía	10
1.2.1.- Rutas de liberación de aleloquímicos.....	10
1.2.1.1.- Lixiviados.....	11
1.2.1.2.- Exudados radiculares	12
1.2.1.3.- Volatilización	13
1.2.1.4.- Descomposición vegetal.....	14
1.2.2.- Variables en la actividad de los Aleloquímicos	15
1.2.2.1.- Ontogenia de la planta.....	15
1.2.2.2.- Condiciones meteorológicas	16
1.2.2.3.- Suelo.....	18
1.2.2.4.- Concentración de los aleloquímicos y mezclas de estos.....	22
1.3.- Estudios alelopáticos. Evaluación de la actividad de los aleloquímicos.....	23
1.3.1.- Diseño de ensayos biológicos	23
1.3.2.- Medidas cuantitativas de respuestas biológicas	26
1.4.- <i>Pteridium</i>	26
1.4.1.- Clasificación y distribución del helecho macho.....	27
1.4.2.- Especies del <i>Pteridium</i> presentes en Venezuela	28
1.4.3.- Morfología comparativa.....	30
1.4.4.- Etapas fenológicas.....	32
1.4.5.- Toxicidad del <i>Pteridium</i> spp.	32
1.4.5.1.- Iludanos	33
1.4.5.2.- Ácidos fenólicos.....	33
1.4.5.3.- Flavonoides	34
1.4.5.4.- Taninos.....	34
1.4.5.5.- Glicósidos cianogénicos.....	34
1.4.5.6.- Fitoecdisteroides	35
1.4.5.7.- Indanonas	36

1.5.- Metabolitos secundarios presentes en <i>Pteridium</i> spp., asociados a una actividad alelopática.....	37
1.5.1.- Fenólicos y taninos.....	40
1.5.1.1.- Ocurrencia.....	40
1.5.1.2.- Estructura química y biosíntesis.....	40
1.5.1.3.- Actividad fitotóxica descrita para los fenólicos y taninos.....	41
1.5.2.- Cumarina.....	42
1.5.2.1.- Ocurrencia.....	42
1.5.2.2.- Estructura química y biosíntesis.....	43
1.5.2.3.- Derivados cumarínicos.....	44
1.5.2.4.- Actividad fitotóxica descrita para la cumarina.....	46
1.6.- Justificación del trabajo.....	49
1.7.- Hipótesis.....	49
1.8.- Objetivos.....	49
1.8.1.- Objetivo General.....	49
1.8.2.- Objetivos Específicos.....	49
CAPITULO 2.....	51
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	51
2.1.- Materiales, equipos, reactivos y métodos de análisis.....	51
2.1.1.- Materiales.....	51
2.1.2.- Equipos.....	51
2.1.3.- Reactivos.....	52
2.1.4.- Metodología de análisis cromatográfico.....	52
2.2.- Diseño del muestreo.....	53
2.2.1.- Sitio de muestreo.....	53
2.2.2.- Desarrollo del muestreo.....	53
2.2.2.1.- Seguimiento del desarrollo de una población seleccionada de <i>P. caudatum</i>	53
2.2.2.2.- Muestreo.....	54
2.2.3.- Medición de las condiciones climatológicas.....	54
2.3.- Preparación de los extractos vegetales a ser analizados.....	55
2.3.1.- Protocolo de obtención de los macerados acuosos (MA) de frondes, esporas y rizomas de <i>P. caudatum</i>	55
2.3.1.1.- Frondes.....	55

2.3.1.2.- Esporas	56
2.3.1.3.- Rizomas.....	56
2.3.2.- Protocolo de obtención de los extractos orgánicos (EO) de los frondes, esporas y rizomas de <i>P. caudatum</i> , previamente macerados en agua	57
2.3.2.1.- Frondes	57
2.3.2.2.- Esporas	60
2.3.2.3.- Rizomas.....	61
2.4.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los MA de <i>P. caudatum</i>	61
2.4.1.- Cumarina	61
2.4.2.- Pterosinas	62
2.4.3.- Fenólicos totales (FT)	63
2.5.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los EO de <i>P. caudatum</i>	64
2.5.1.- Cumarina	64
2.5.2.- Fenólicos totales.....	65
2.5.3.- Pterosinas	65
2.6.- Preparación de los extractos orgánicos de muestras de suelo para determinar presencia de cumarina en un estudio preliminar.....	65
2.7.- Bioensayos	66
2.7.1.- Estudios de fitotoxicidad sobre lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) en bioensayos en placas de <i>petri</i> de los MA de <i>P. caudatum</i>	66
2.7.1.1.- Método de preparación de los bioensayos en placas de <i>petri</i> con las soluciones de pterosinas A y B y Linurón	67
2.7.1.2.- Método de preparación de los bioensayos en placas de <i>petri</i> con las soluciones de cumarina patrón	68
2.7.1.3.- Método de preparación de los bioensayos en placas de <i>petri</i> con los MA de <i>P. caudatum</i>	69
2.7.1.4.- Preparación de los controles.....	69
2.7.1.5.- Determinación de la actividad.....	69
2.7.2.- Estudio preliminar de los efectos de la cumarina patrón sobre lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) en bioensayos en medio hidropónico.....	70
2.7.2.1.- Germinación de semillas de <i>L. sativa</i>	70
2.7.2.2.- Montaje de los bioensayos con <i>L. sativa</i> en medio hidropónico.....	71
2.8.- Análisis estadístico de los resultados	75

CAPITULO 3	76
RESULTADOS	76
3.1.- Análisis del crecimiento del <i>P. caudatum</i>	76
3.2.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los MA de <i>P. caudatum</i>	77
3.2.1.- Cumarina	77
3.2.1.1.- Frondes	77
3.2.1.2.- Esporas	79
3.2.1.3.- Rizomas.....	79
3.2.2.- Pterosinas	80
3.2.2.1.- Frondes	80
3.2.2.2.- Esporas y rizomas.....	81
3.2.3.- Fenólicos totales.....	81
3.2.3.1.- Frondes	81
3.2.3.2.- Esporas y rizomas.....	83
3.3.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los EO de <i>P. caudatum</i>	83
3.3.1.- Cumarina	83
3.3.1.1.- Frondes	83
3.3.1.2.- Esporas	87
3.3.1.3.- Rizomas.....	87
3.3.2.- Fenólicos totales.....	87
3.3.2.1.- Frondes	87
3.3.2.2.- Esporas y rizomas.....	87
3.4.- Determinación de la presencia de cumarina en muestras de suelo	88
3.5.- Bioensayos	89
3.5.1.- Actividad fitotóxica sobre <i>L. sativa</i> en placas de <i>petri</i> de los MA de <i>P. caudatum</i>	89
3.5.1.1.- Actividad fitotóxica de las pterosinas A y B patrones	89
3.5.1.2.- Actividad fitotóxica de la cumarina patrón.....	91
3.5.1.3.- Actividad fitotóxica de los MA de <i>P. caudatum</i>	92
3.5.2.- Efectos de la cumarina patrón sobre lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) en bioensayos en medio hidropónico.....	96
3.5.2.1.- Absorción de cumarina por las plántulas de <i>L. sativa</i>	96
3.5.2.2.- Absorción de cumarina por la radícula en <i>L. sativa</i>	98
3.5.2.3.- Efecto de la cumarina sobre el crecimiento de <i>L. sativa</i>	98

CAPITULO 4	101
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	101
4.1.- Seguimiento del desarrollo de una población de <i>P. caudatum</i>	101
4.2.- Cuantificación de cumarina, pterosinas y fenólicos totales en <i>P. caudatum</i>	102
4.2.1.- Cumarina	102
4.2.2.- Pterosinas	105
4.2.3 Fenólicos totales	105
4.3.- Determinación de la presencia de cumarina en las muestras de suelo.	110
4.4.- Actividad fitotóxica sobre <i>L. sativa</i> de los MA de <i>P. caudatum</i>	112
4.5.- Absorción y translocación de la cumarina por <i>L. sativa</i> en crecimiento hidropónico	114
Conclusiones.....	117
I.- Distribución de la cumarina y los compuestos fenólicos en <i>P. caudatum</i>	117
II.- Dinamica de liberación por lixiviación de cumarina y compuestos fenólicos de <i>P. caudatum</i>	117
III.- Actividad fitotóxica.....	118
A.- Actividad fitotóxica en placas de <i>petri</i>	118
A.1.- Pterosinas	118
A.2.- Cumarina y compuestos fenólicos.....	118
B.- Actividad fitotóxica en bioensayos hidropónicos.....	119
IV.- Análisis del suelo en población de <i>P. caudatum</i>	119
V.- Conclusión general.....	120
Referencias Bibliográficas.....	121
Anexos.....	139
ANEXO A: Muestreo de los individuos de <i>P. caudatum</i> y de las muestras de suelo. Seguimiento del crecimiento de la población de los helechos. Registro de las condiciones meteorológicas.....	139
ANEXO B: Determinación de la presencia de cumarina en cayados y en las diferentes partes de los frondes. Optimización de las metodologías de análisis.....	141
ANEXO C: Cuantificación de cumarina y fenólicos totales en <i>Pteridium caudatum</i>	145
ANEXO D. Bioensayos de fitotoxicidad.....	149

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3

Tabla 1.1. Potencial alelopático de los lixiviados de algunos géneros y especies de plantas (tomada y adaptada de Sampietro, 2000). 12

Tabla 1.2: Algunas de las especies de *Pteridium* que han sido reportadas y clasificadas taxonómicamente de acuerdo con estudios morfogénicos. 29

Tabla 1.3: Resumen de algunos estudios realizados sobre alelopatía en *Pteridium* spp. 38

Tabla 1.4: Los cuatro principales subtipos de cumarinas (tomada y adaptada de Lacy y O'Kennedy, 2004). 46

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla 2.1: Características y observaciones de los reactivos. 52

Tabla 2.2: Condiciones para el análisis cromatográfico por HPLC de los macerados acuosos* y de los extractos orgánicos de frondes de *Pteridium caudatum* y de los extractos orgánicos de suelo. 52

Tabla 2.3: Material vegetal usado para determinar el porcentaje de extracción de cumarina en la primera extracción (%Ext-RepX-EXT1) siguiendo la metodología EO-6. 59

Tabla 2.4: Datos para la construcción de la curva de calibración. 62

Tabla 2.5: Datos para la construcción de la curva de calibración. 62

Tabla 2.6: Datos para la construcción de la curva de calibración. 63

Tabla 2.7: Datos para la construcción de la curva de calibración. 64

Tabla 2.8: Solución nutritiva para el control* 72

CAPITULO 3

RESULTADOS

76

Tabla 3.1: Rango de longitud de raquis seleccionado para el muestreo de los individuos de *P. caudatum* en cada etapa fenológica. 76

Tabla 3.2: Parámetros de análisis de la curva de calibración. 77

Tabla 3.3: Parámetros de análisis de la curva de calibración sencilla de la pterosina B. 80

Tabla 3.4: Parámetros de análisis de la curva de calibración sencilla de tanino de quebracho. 82

Tabla 3.5: Factor de corrección aplicado al contenido de cumarina detectada en la fracción F2. 85

Tabla 3.6: Parámetros de análisis de la curva de calibración sencilla # 2 de cumarina 86

patrón.	
Tabla 3.7: Parámetros medidos para caracterizar el suelo de la parcela en estudio.	89
Tabla 3.8: Parámetros de ajuste de la función matemática que mejor describe la actividad y coeficientes de correlación para la actividad en función de la concentración de cumarina.	96
CAPÍTULO 4	
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	101
Tabla 4.1: Contenido de cumarina, pterosinas y fenólicos totales en los MA y EO de <i>P. caudatum</i> .	107
ANEXOS	140
Tabla B.1: Resultados del análisis de los macerados acuosos y orgánicos de la muestra de esporas estudiada para determinar presencia o ausencia de cumarina.	143
Tabla B.2: Rizomas colectados para la determinación de la presencia o ausencia de cumarina en los macerados acuosos y extractos orgánicos.	143
Tabla B.3: Resultados del estudio de la muestra del primer par de pinas de fronde en desarrollo (tercera etapa madura) colectada para seleccionar el solvente de extracción de cumarina usando la metodología EO-6.	143
Tabla B.4: Optimización de la metodología de prepurificación de extractos orgánicos de frondes de <i>P. caudatum</i> que fueron obtenidos al aplicar metodología EO-6.	144
Tabla B.5: Concentración de cumarina en la muestra usada para la construcción de la curva de calibración por adición de estándar (tomada de Buendía, 2009).	144
Tabla C.1: Contenido de cumarina en macerados acuosos y extractos orgánicos de <i>P. caudatum</i> (N = 10 para cada etapa).	146
Tabla C.2: Contenido de fenólicos totales en macerados acuosos y extractos orgánicos de <i>P. caudatum</i> (N = 10 para cada etapa).	147
Tabla C.3: Datos de actividad de cumarina patrón (SIGMA, 99% pureza) sobre la elongación de tallo y raíz y la germinación de lechuga.	149
Tabla D.1: Datos de actividad de cumarina patrón (SIGMA, 99% pureza) sobre la elongación de tallo y raíz y la germinación de lechuga.	150
Tabla D.2: Datos de actividad de los MA de <i>P. caudatum</i> sobre la elongación de tallo y raíz y la germinación de lechuga.	151
Tabla D.3: Concentración de pterosina A y pterosina B en los MA de los individuos de 1E y 2E fenológica.	152
Tabla D.4: Actividad fitotóxica de las pterosinas y el Linurón sobre el crecimiento de tallo y raíz de <i>L. sativa</i> .	153

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
Figura 1.1: Estructura química de las moléculas de clorofila a y b, abundantes en las plantas verdes (metabolitos primarios).	3
Figura 1.2: Estructura molecular de los precursores de las rutas metabólicas secundarias.	4
Figura 1.3: Orígenes biosintéticos de los metabolitos secundarios y su relación con el metabolismo primario (Taiz y Zeiger, 1991).	5
Figura 1.4: Estructuras del isopreno, precursor de los terpenos y de otras moléculas conocidas en este grupo de metabolitos secundarios.	6
Figura 1.5: Glicósido cardíaco, oleandrina (encontrada en <i>Nerium oleander</i>). (Tomada de Cseke et al., 2006).	7
Figura 1.6: Algunos compuestos fenólicos (Tomada de Cseke et al., 2006).	7
Figura 1.7: Estructura base y tipos de flavonoides. La quercetina, es ejemplo de un flavonol (Tomada de Cseke et al., 2006).	8
Figura 1.8: Estructuras de algunos compuestos nitrogenados (de los glucosinatos solo se muestra la estructura base) (Tomada de Cseke et al., 2006).	9
Figura 1.9: Principales rutas de liberación de aleloquímicos al entorno (tomado de Sampietro 2000).	11
Figura 1.10: Factores que afectan el comportamiento y la actividad fitotóxica de los aleloquímicos en el suelo (Tomado y adaptado de Kobayashi, 2004).	18
Figura 1.11: Comportamiento químico y biológico de L-DOPA en ambientes de suelo (Hiradate et al., 2005).	20
Figura 1.12: Estructura química de la juglona y la L-DOPA	20
Figura 1.13: Fronde de <i>Pteridium</i> .	27
Figura 1.14: Esporas en un fronde maduro de <i>Pteridium caudatum</i> (Fotografía tomada por Jorge Luis Ávila).	27
Figura 1.15: Características morfológicas del <i>Pteridium</i> en forma generalizada; (a) lámina del fronde; (b) raquis; (c) pina; (d) stipe; (e) nectario; (f) cayados con pelos; (g) primordio foliar referido al pequeño retoño; (h)ápice del retoño; (i) línea lateral; (j) raíces petiolares – encontradas en variedad <i>esculentum</i> ; (k) raíces; (l) rizoma; (<i>m – p</i>) <i>pina mostrando</i> : (m) pínula;(n) nervadura de la pina; (o) pinuleta o segmento; (p)	31

nervadura de la pínula (Marrs y Watt, 2006).	
Figura 1.16: Comparación de la morfología de las pinas de las dos especies de <i>Pteridium</i> encontradas en Venezuela (Tomada de Alonso – Amelot y Rodulfo – Baechler, 1996).	31
Figura 1.17. <i>Pteridium caudatum</i> en las cuatro etapas fenológicas de desarrollo (Tomada de Alonso-Amelot, 1999).	32
Figura 1.18: Estructura química del ptaquilósido.	33
Figura 1.19: Algunos compuestos fenólicos encontrados en <i>Pteridium</i> .	33
Figura 1.20: Secuencia de reacciones que conducen a la formación de ácido cianhídrico a partir de prunasina.	35
Figura 1.21: Estructura química de la α -ecdisona (2 β ,3 β ,5 β ,22R)2,3,14,22,25-Pentahidroxicolest-7-en-6-ona), un fitoecdisteroide encontrado en las pinas de <i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn (Kaplanis et al., 1967).	36
Figura 1.22: Indanonas que han sido reportadas en <i>Pteridium</i> spp.	37
Figura 1.23: Algunos fenólicos y taninos comunes.	41
Figura 1.24: Estructura de la cumarina (1,2-benzopirona).	43
Figura 1.25: Lactonización de ácido o-cumárico a cumarina (Murray et al., 1982).	43
Figura 1.26: Desaminación de fenilalanina a ácido <i>trans</i> -cinámico (tomado de Taiz y Zeiger, 1991).	44
Figura 1.27: Algunos derivados cumarínicos comunes.	45
Figura 1.28: Efecto de la cumarina y esculetina sobre el crecimiento de plántulas de calabaza. Las plántulas fueron tratadas con soluciones de 50 μ M y la data fue tomada seis días después de la germinación (tomado de Hossain et al., 2008).	47
CAPÍTULO 2	
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	51
Figura 2.1: Metodología para la obtención de los MA de <i>P. caudatum</i> , MA-1 (Buendía, 2009).	55
Figura 2.2: Metodología para la obtención de los MA de <i>P. caudatum</i> propuesta, MA-2.	56
Figura 2.3: Metodología EO-6 para la obtención de los EO de <i>P. caudatum</i> . En la figura, la flecha a indica que se realizó un MA a todas las muestras antes de aplicarles esta metodología (flecha b).	57
Figura 2.4: Metodología EO-6.4 usada para el pre tratamiento de los extractos orgánicos a través del Sep-Pak C18.	58

Figura 2.5: Metodología seguida para determinar el porcentaje de recuperación de cumarina, contenida en una solución acuosa de EO de <i>P. caudatum</i> , al ser procesada con la metodología EO-6.4 (figura 2.4).	60
Figura 2.6: Metodología Suelo EO-1, diseñada para la extracción de cumarina de muestras de suelo.	65
Figura 2.7: Metodología de prepurificación del Sep-Pak C18 de los extractos orgánicos del suelo.	66
Figura 2.8: Diseño de los bioensayos 1 y 2 para los hidropónicos con <i>L. sativa</i> .	73
Figura 2.9: Diseño del bioensayo 3 para los hidropónicos con <i>L. sativa</i> .	74
CAPITULO 3	
RESULTADOS	76
Figura 3.1: Velocidad de crecimiento del fronde de <i>P. caudatum</i> a 1990 msnm. Las barras representan la desviación estándar de los promedios de longitud de raquis para N = 38. Línea roja = ajuste de la función para la longitud de raquis vs los días de emergencia; Línea azul = ajuste de la función para la velocidad de elongación (derivada) vs los días de emergencia.	77
Figura 3.2: Curva de calibración sencilla de cumarina #1 (rango de concentraciones: desde 0 hasta 300 μ M) (Las barras representan la desviación estándar para cada patrón (N = 3).	78
Figura 3.3: Contenido de cumarina en los MA de frondes de diferentes etapas de desarrollo del <i>P. caudatum</i> . Las barras indican la desviación estándar de los promedios (N = 10). (Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).	78
Figura 3.4: a) Cromatograma obtenido para MA de las esporas y b) el espectro ultravioleta del pico a 7,61 min.	79
Figura 3.5: Curva de calibración sencilla de pterosina B (0 – 20 μ M) (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para cada patrón, N = 3).	80
Figura 3.6: Contenido de pterosinas A y B en los MA en cayados y frondes de 2da etapa de <i>P. caudatum</i> (Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los promedios, N = 10).	81
Figura 3.7: Curva de calibración sencilla de fenólicos totales como equivalentes de tanino de quebracho (0,9 – 504 mg/L) (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para cada patrón, N = 3).	82

Figura 3.8: Contenido de fenólicos totales (en equivalentes de tanino de quebracho) en los MA de <i>P. caudatum</i> en las diferentes etapas fenológicas (Las barras indican la desviación estándar de los promedios, N = 10. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).	83
Figura 3.9: Porcentaje de extracción de cumarina realizando extracciones sucesivas (3 extracciones) al material de los frondes de <i>P. caudatum</i> (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para N = 5).	84
Figura 3.10: Curva de calibración sencilla #2 de cumarina patrón (0,2 - 6,0 μ M) (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para cada patrón, N = 3).	85
Figura 3.11: Contenido de cumarina en EO de frondes de <i>P. caudatum</i> . (Las barras indican la desviación estándar de los promedios, N = 10. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).	86
Figura 3.12: a) Cromatograma obtenido para el extracto orgánico de esporas de <i>P. caudatum</i> , obtenido con la metodología EO-2 y b) espectro UV del pico de cumarina a un tiempo de retención de 7,67 min.	87
Figura 3.13: Contenido de fenólicos totales en los EO de frondes de diferentes etapas de desarrollo del <i>P. caudatum</i> . (Las barras representan la desviación estándar de los promedios, N = 10. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).	88
Figura 3.14: Actividad fitotóxica de las pterosinas A y B en comparación con el Linurón sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) de plántulas de <i>L. sativa</i> .	90
Figura 3.15: Actividad fitotóxica de las pterosinas A y B en comparación con el Linurón sobre la germinación de <i>L. sativa</i> .	90
Figura 3.16: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de la cumarina sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) y sobre la germinación (G) de <i>L. sativa</i> . (ver parámetros del ajuste en tabla 3.8).	91
Figura 3.17: Actividad fitotóxica de los MA de <i>P. caudatum</i> , sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) y sobre la germinación (G) de <i>L. sativa</i> en función de la concentración de cumarina. (Los puntos dentro de los óvalos corresponden a los frondes senescentes).	93
Figura 3.18: Actividad fitotóxica de los MA de <i>P. caudatum</i> , sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) y sobre la germinación (G) de <i>L. sativa</i> en función del contenido de fenólicos totales.	94

(Los puntos dentro de los óvalos corresponden a los frondes senescentes y los puntos dentro de los recuadros representan el rango de actividad donde se encuentran la mayoría de los individuos).

Figura 3.19: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de los MA de los frondes de 2E, 3E y 4E y de los frondes senescentes de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo de *L. sativa* en función de la concentración de cumarina. 95

Figura 3.20: Contenido de cumarina encontrada en los tallos de *L. sativa* a diferentes días de estudio. 97

Figura 3.21: Contenido de cumarina encontrada en las radículas de *L. sativa* a diferentes días de estudio. 97

Figura 3.22: Efecto sobre el crecimiento de *L. sativa* de la cumarina patrón en bioensayos en medio hidropónico (N = 3 en el estudio a 200 μ M; N = 5 y N = 3 en control y tratamiento del estudio a 500 μ M respectivamente; letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p < 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis). 98

Figura 3.23: Plántulas de *L. sativa*, control y tratamiento, luego de 16 días expuestas a una concentración de cumarina de 200 μ M. 99

Figura 3.24: Plántulas de *L. sativa*, control (C) y tratamiento (T), luego de 29 días expuestas a una concentración de cumarina de 500 μ M. 100

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS 101

Figura 4.1: Correlación de las precipitaciones en los cinco días previos a la fecha de muestreo y el contenido de cumarina en los MA de los frondes según su etapa fenológica. 103

Figura 4.2: Contenido de cumarina promedio en MA y en EO de los frondes de *P. caudatum* muestreados (la desviación estandar corresponde a N=10; Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis). 104

Figura 4.3: Correlación de las precipitaciones en los cinco días previos a la fecha de muestreo y contenido de fenólicos totales en los MA de los frondes por etapa fenológica. 106

Figura 4.4: Contenido de fenólicos totales en MA y en EO de los frondes de *P. caudatum* (la desviación estandar corresponde a N = 10; Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal- 108

Wallis).

Figura 4.5: Correlación entre la cumarina y fenólicos totales en los MA de *P. caudatum*, desde el despliegue del primer par de pinas (2E fenológica) hasta senescencia. 109

Figura 4.6: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de los MA en función de la concentración de cumarina para la 2E, 3E y 4E de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) de *L. sativa*. 112

Figura 4.7: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de los MA en función del contenido de fenólicos totales para la 2E, 3E y 4E y senescente de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) de *L. sativa*. 114

ANEXOS 140

Figura A.1: Parcela seleccionada para el estudio a 1990 msnm, en una ladera de montaña, perteneciente a la Universidad de Los Andes y conocida como aula ambiental, localizada a 2 Km al norte de la ciudad de Mérida, al Occidente de Venezuela. 140

Figura A.2: Seguimiento del crecimiento de los frondes de *P. caudatum* en la parcela seleccionada. Duración: 2 meses. 140

Figura A.3: Histogramas diseñados para la selección del tamaño normal de los frondes de *P. caudatum*. 141

Figura A.4: Grafico de precipitaciones y temperaturas promedio durante el periodo de muestreo (falta por hacer un único gráfico con temperatura y precipitación). 141

Figura B.1. Lixiviación de cumarina de *P. caudatum* a diferentes tiempos de maceración.
(Se toma como el 100 % el valor correspondiente a las 24 h)(Buendía, 2009). 142

Figura B.2: Porcentaje de recuperación de cumarina en las fracciones de elusión del Sep-Pak C18 durante el proceso de prepurificación de los macerados acuosos de *P. caudatum* antes del análisis por HPLC (Buendía, 2009). 142

Figura B.3: Metodologías de prepurificación, de los EO de los frondes de *P. caudatum*, usando cartuchos Sep-Pak C18. En las fracciones F3 y F3F3 sale cumarina residual que no salió en F2. Esto determina la metodología seleccionada (tabla B.4) y el factor de corrección que se debe hacer a F2. 144

Figura B.4: Superposición de las curvas de calibración para descartar efecto de la matriz vegetal en macerados acuosos de *P. caudatum* en el rango de concentraciones de 0,1 μ M – 100 μ M (tomada de Buendía, 2009). 145

Figura B.5: Superposición de la curva de calibración sencilla de cumarina con la curva de adición estándar de un extracto orgánico (obtenido según EO-6) de un fronde de <i>P. caudatum</i> para descartar efecto de la matriz vegetal en extractos orgánicos (relación de pendientes = 0,776) en el rango de concentraciones de 0,1 μM – 300 μM (CCS = curva calibración sencilla y CAS = curva de adición estándar). EO = Extracto orgánico.	145
Figura C.1: Espectro ultravioleta de la cumarina patrón.	147
Figura C.2: Cromatogramas del MA y del EO de un individuo de 3E fenológica con los espectros UV correspondientes a los picos de interés en cada uno (CD = compuesto desconocido; Cum = cumarina).	149
Figura C.3: Cromatograma del extracto orgánico (metanólico) de una muestra de suelo.	149
Figura D.1: Concentración de cumarina en los MA por cada etapa fenológica de <i>P. caudatum</i> en cada individuo.	150
Figura D.2: Concentración de fenólicos totales en los MA de los frondes de <i>P. caudatum</i> para todos los individuos por cada etapa fenológica.	153

www.bdigital.ula.ve

Introducción

Las plantas, debido a su inmovilidad, están muy expuestas tanto a factores bióticos como abióticos del medio que son los que pueden alejarlas de las condiciones óptimas de crecimiento, originando estrés (Oliveros, 2006), por lo tanto, deben desarrollar estrategias de protección o defensa frente a tales condiciones que puedan comprometer su ciclo vital. Existen dos tipos de defensa que las plantas desarrollan para hacer frente a tales condiciones: la defensa estructural relacionada con las barreras físicas propias de la morfología de la planta, y la defensa metabólica asociada con los metabolitos secundarios fabricados por la misma.

Las especies de los helechos del género *Pteridium* han sido foco de interés en el estudio de estas estrategias metabólicas de defensa, pues es una maleza con una distribución cosmopolita y evolutivamente se puede considerar una de las más exitosas, debido a su persistencia a lo largo de miles de años (Raven et al., 1991; Wieckowska et al., 2012). En Venezuela se han descrito dos especies de este género de helechos, *P. caudatum* y *P. arachnoideum*, que han demostrado tener estrategias de defensa metabólicas bastante efectivas que pueden explicar en parte el gran éxito invasivo observado.

La actividad fitotóxica observada en el *Pteridium*, asociada posiblemente con el fenómeno de la alelopatía, también pudiera ser atribuida en parte a la cumarina, la cual fue aislada junto con el ácido *o*-cumárico del *Pteridium caudatum* (Alonso-Amelot et al., 1995). Pese a la gran cantidad de investigación existente, la dinámica de la cumarina durante el desarrollo fenológico del fronde, así como su función ecológica en *Pteridium caudatum* aún está por ser estudiada.

Ante esta perspectiva, se presentará en una primera parte de este trabajo una revisión general sobre los metabolitos secundarios, sus rutas principales de biosíntesis, su función como aleloquímicos en el fenómeno de la alelopatía y las variables que pueden afectar su actividad biológica, así como también las metodologías comúnmente usadas para el estudio de la misma. También, se abordará el estudio del género *Pteridium* y los antecedentes alelopáticos

realizados así como los metabolitos secundarios presentes en *Pteridium caudatum* que es la especie de interés en este trabajo.

Finalmente, se abordará el estudio realizado: el muestreo de los frondes, las metodologías de obtención de los extractos y de cuantificación, la determinación del contenido de cumarina, de pterosinas y de fenólicos totales en *P. caudatum* en las diferentes matrices y la actividad fitotóxica observada en los diferentes bioensayos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.- Metabolitos secundarios

El metabolismo primario comprende una serie de procesos químicos como la fotosíntesis y la respiración. Los productos de estas reacciones son los metabolitos primarios los cuales tienen funciones esenciales en el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de las plantas. Estos comprenden una gran variedad de compuestos orgánicos que incluyen moléculas ricas en energía tales como sucrosa y almidón, componentes estructurales como celulosa, ácidos nucleicos tales como ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico), y pigmentos tales como clorofila (figura 1.1). Se encuentran en todas las plantas porque son los componentes o productos de rutas o ciclos metabólicos fundamentales, y además de tener funciones esenciales en las plantas, algunos son precursores (materiales de partida) para la síntesis de metabolitos secundarios (Dewick, 2002).

www.bdigital.ula.ve

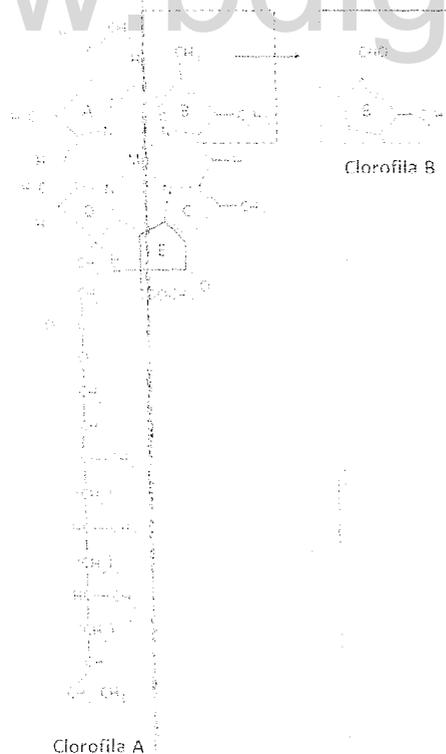


Figura 1.1: Estructura química de las moléculas de clorofila a y b, abundantes en las plantas verdes (metabolitos primarios).

Hay cuatro rutas de partida principales (figura 1.2 y 1.3) para el metabolismo secundario (Mann, 1980; Taiz y Zeiger, 1991):

- (a) **Ácido shikímico**, es el precursor de muchos compuestos aromáticos incluyendo los aminoácidos aromáticos, ácidos cinámicos, y ciertos polifenoles.
- (b) **Ácido malónico**, que conduce a compuestos fenólicos y también compuestos nitrogenados, a los alcaloides, antibióticos pectídicos, incluyendo las penicilinas y cefalosporinas.
- (c) **Ácido mevalónico**, que deriva de la unión de tres moléculas de acetil-CoA. Este intermediario clave, de seis carbonos, es luego pirofosforilado, descarboxilado, y deshidratado para formar isopentenil difosfato (IPP). Este último es el bloque de construcción de cinco carbonos de los terpenos. Es el precursor de poliacetilenos, prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenoles, y los terpenos isoprenoides, esteroides y carotenoides.
- (d) La ruta vía **Fosfato de metileritritol (MEP)**, está constituida por un grupo de reacciones que ocurren a través del ciclo de reducción del carbono fotosintético, que opera en los cloroplastos y que también da origen a terpenos.

Sin embargo, la línea divisora entre el metabolismo primario y secundario es bastante difusa; hay que tener en cuenta que la diferencia entre metabolitos primarios y secundarios es sólo funcional, por lo que no pueden ser distinguidos en base a moléculas precursoras, ni estructura química, ni origen biosintético.

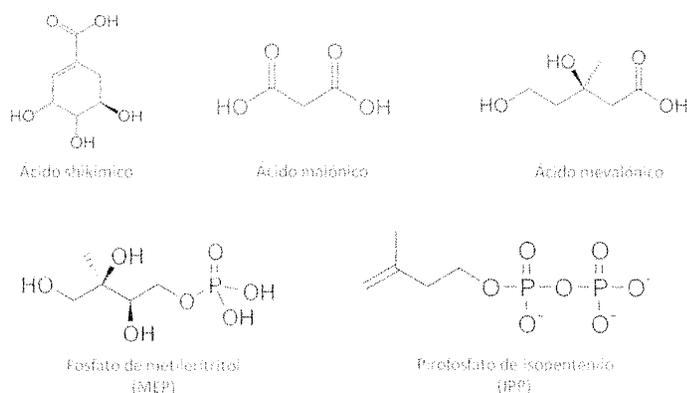


Figura 1.2: Estructura molecular de los precursores de las rutas metabólicas secundarias.

Nombres IUPAC: *ácido shikímico*: ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico; *ácido malónico*: ácido propanodióico; *ácido mevalónico*: ácido (3R)-3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico; *MEP*: 2,3,4-Trihidroxi-3-metilbutil dihidrógeno fosfato; *IPP*: ácido (hidroxi-(3-metilbut-3-enoxi) fosforil)oxifosfónico.

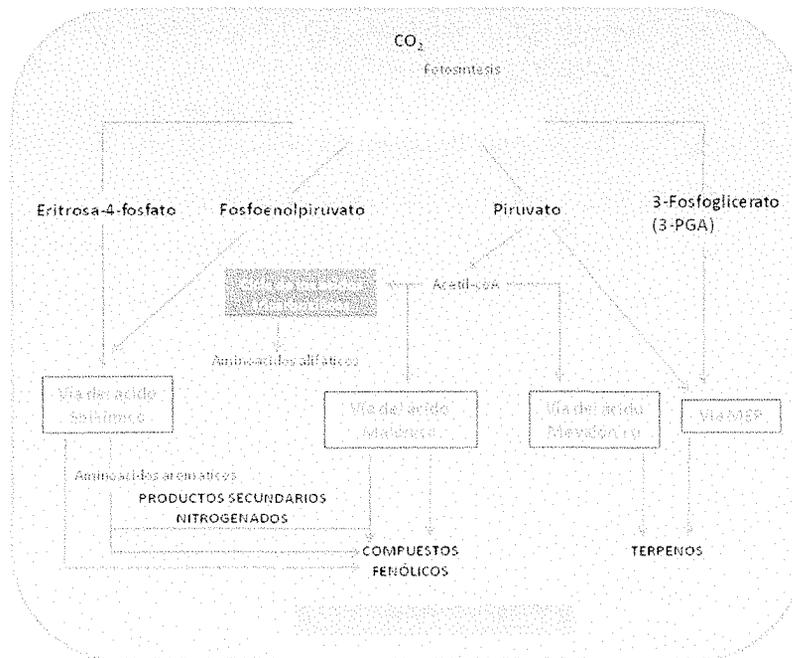


Figura 1.3: Orígenes biosintéticos de los metabolitos secundarios y su relación con el metabolismo primario (Taiz y Zeiger, 1991).

Se considera que el potencial que ofrece el reino vegetal como fuente de compuestos no ha sido suficientemente aprovechado, ya que sólo un limitado porcentaje de las 270.000 especies de plantas superiores conocidas, han sido investigadas en cuanto a sus compuestos activos y es frecuente el caso en que las plantas son estudiadas solamente por un tipo específico de actividad biológica (Wink, 2010).

La gran diversidad estructural de metabolitos secundarios que existen se pueden clasificar en dos grandes grupos: los compuestos basados en carbono y los compuestos nitrogenados. Entre los compuestos basados en carbono están los terpenos, los glicósidos cardíacos, los flavonoides y los compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos, taninos y cumarinas. Dentro de los compuestos nitrogenados se tiene los aminoácidos no proteicos, los alcaloides, los glicósidos cianogénicos y los glucosinolatos (Mann, 1980; Cseke et al., 2006).

- a) **Terpenos:** Se conocen unos 30.000 y todos ellos poseen un precursor de 5 carbonos denominado isopreno. Es el grupo que presenta la mayor diversidad estructural de los metabolitos secundarios y comprende a los hemiterpenos (C5), los monoterpenos (C10), los sesquiterpenos (C15), los diterpenos (C20) (se incluyen aquí los

clerodanos, giberilinas, podolactonas y nigilactonas), los triterpenos (C30) (se incluye los esteroides y saponinas) y los tetraterpenos (C40) (Cseke et al., 2006). Solo de los sesquiterpenos se han descrito más de 3.500 estructuras (Wink, 2008; Wink, 2010). Son encontrados en aceites esenciales, latex, resinas de plantas, flores y frutos, de familias como Compositae, Angiospermas, Rutaceae, Meliaceae, Cucurbitaceae, entre otras. Dentro de este grupo se pueden mencionar el limoneno (presente en los cítricos) y mentol (presente en la menta). Algunos esteroides tienen funciones protectoras frente a insectos, como en el caso de la ecdisona presente en el helecho común (*Pteridium* spp.) (Figura 1.4) (Ávalos y Pérez, 2009).

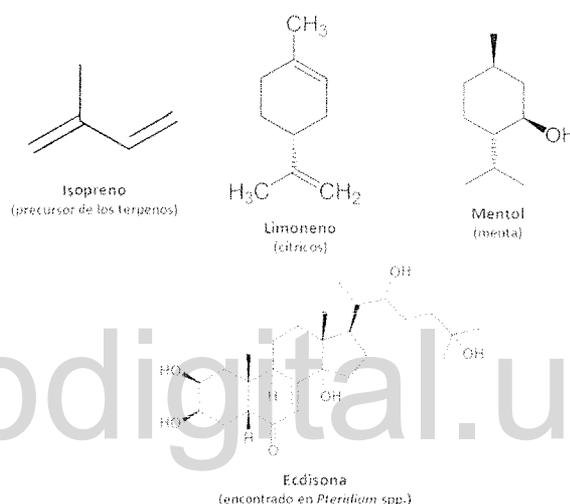
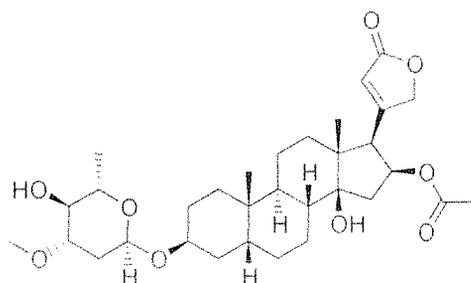


Figura 1.4: Estructuras del isopreno, precursor de los terpenos y de otras moléculas conocidas en este grupo de metabolitos secundarios.

- b) Glicósidos cardíacos:** Se han reportado unas 200 estructuras. Son esteroides de 23 carbonos. Poseen sustituyentes metilos en la posición 10 y 13, con una lactona de 5 miembros en el carbono 17. Contienen grupos estructurales derivados de azúcares. Se encuentran principalmente en el género *Asclepia* (*Asclepiadaceae*), aunque también los producen algunas especies de las familias *Apocynaceae* y *Sorophulanaceae* (Wink, 2008; Wink, 2010). La oleandrina pertenece a este grupo de metabolitos secundarios (figura 1.5).
- c) Compuestos fenólicos:** Se conocen unos 8.000 compuestos fenólicos y todos ellos provienen principalmente de la ruta del ácido shikímico. Pertenecen a este grupo los

ácidos fenólicos, las cumarinas, las quinonas y los taninos. Se encuentran en las hojas, tallos y semillas de plantas (Wink, 2008; Wink, 2010). La cumarina (derivado de un ácido fenólico), presente en el *Pteridium caudatum* (Alonso-Amelot et al., 1995), pertenece a este amplio grupo de compuestos (figura 1.6).



Oleandrina
(glicósido cardíaco)

Figura 1.5: Glicósido cardíaco, oleandrina (encontrada en *Nerium oleander*). (Tomada de Cseke et al., 2006).

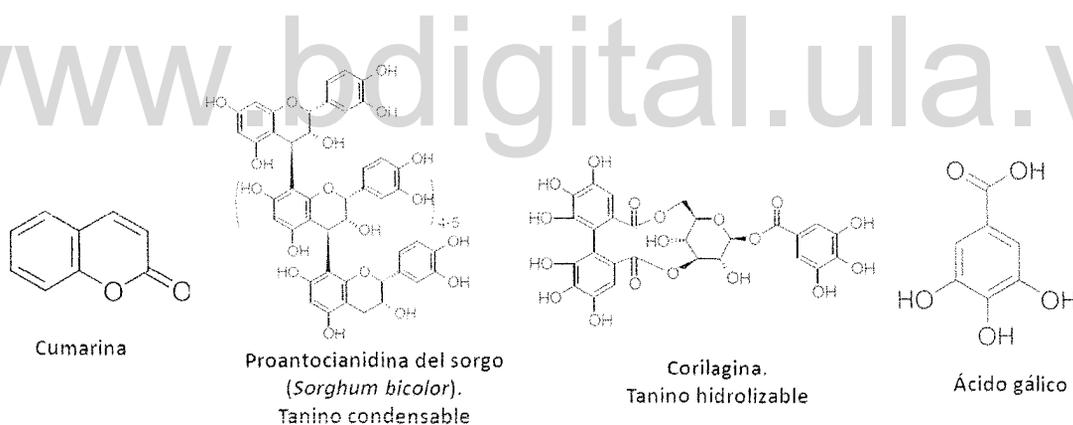
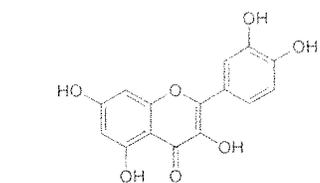
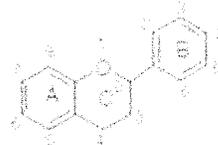


Figura 1.6: Algunos compuestos fenólicos (Tomada de Cseke et al., 2006).

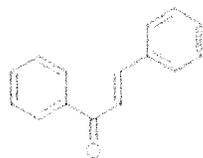
d) Flavonoides: Dentro de los flavonoides, se agrupan las antocianinas, las catequinas y los taninos (se clasifican aquí también los taninos condensados). Se han reportado unas 5.000 estructuras y son heterociclos derivados de la flavona, encontrándose principalmente como glicósidos, hidróxidos, metóxidos y otros. Estos son comunes en Angiospermas y helechos (Dewick, 1988; Wink, 2008; Wink, 2010). El flavonol conocido como quercetina pertenece a este grupo (figura 1.7).



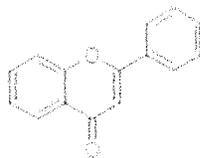
Quercetina (flavonol presente en verduras y frutas)



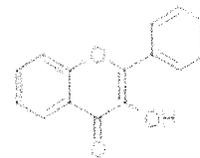
Esquema de numeración de la estructura de los flavonoides



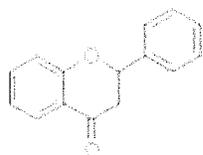
Chalconas



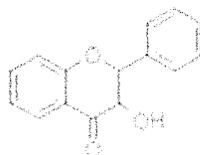
Flavonas



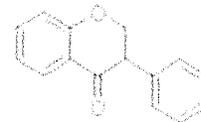
Flavonoles



Flavanonas



Antocianinas



Isoflavonas

www.bdigital.ula.ve

Figura 1.7: Estructura base y tipos de flavonoides. La quercetina, es ejemplo de un flavonol (Tomada de Cseke et al., 2006).

e) **Compuestos nitrogenados:** Representan a este grupo los alcaloides, glicósidos cianogénicos, aminoácidos no protéicos y glucosinolatos (figura 1.8). De los alcaloides se han descrito alrededor de 21.000 compuestos y todos ellos poseen al menos un átomo de nitrógeno en su estructura. Se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos y algunos de los alcaloides más conocidos son la cafeína y la nicotina. De los glicósidos cianogénicos hay un reporte de unas 100 estructuras. Son compuestos con polaridad intermedia, típicamente *O*- β -glicósidos de α -hidroxinitrilos. La prunasina es un glicósido cianogénico que ha sido aislado del *Pteridium* spp. Se encuentran usualmente en helechos, gimnospermas, angiospermas, mono y dicotiledóneas. Los aminoácidos no protéicos (unas 700 estructuras) están presentes en las semillas de legumbres y los glucosinolatos (unas 100 estructuras) se han encontrado en la familia Cruciferae entre otras (Wink, 2008; Wink, 2010).

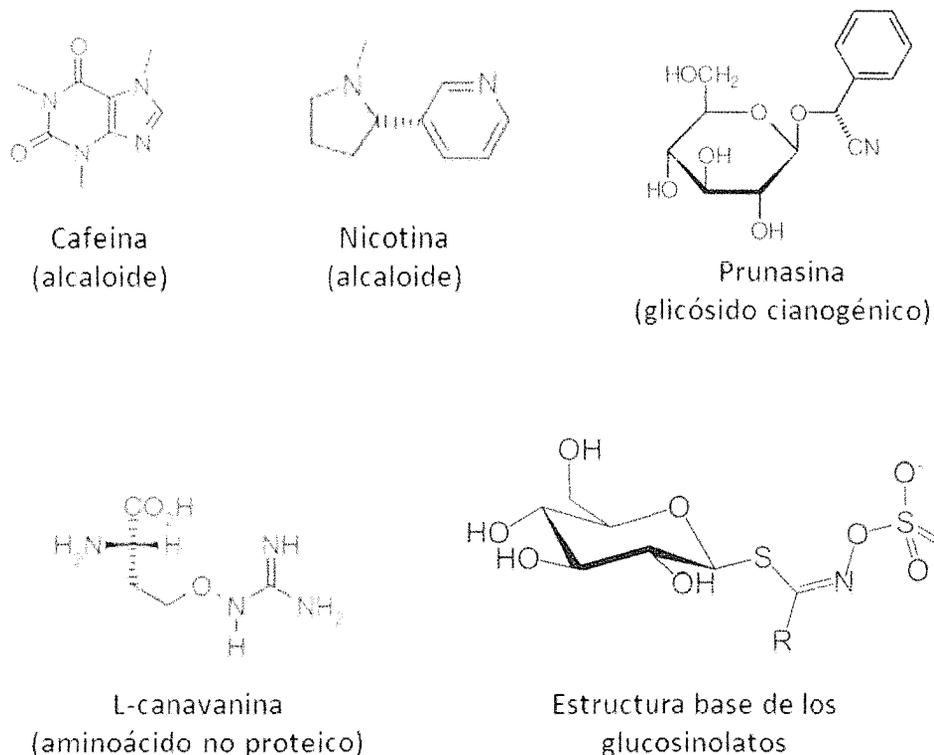


Figura 1.8: Estructuras de algunos compuestos nitrogenados (de los glucosinolatos solo se muestra la estructura base) (Tomada de Cseke et al., 2006).

Los metabolitos secundarios que han sido aislados de las plantas son conocidos como productos naturales y se les ha atribuido funciones de defensa. De acuerdo con todos los antecedentes existentes, estos se pueden definir como:

“compuestos químicos producidos por las plantas que no son esenciales en los procesos principales de las mismas, como crecimiento, desarrollo y reproducción pero que sin embargo, tienen funciones importantes en la defensa y protección de estas frente a factores bióticos y abióticos”.

Los factores bióticos son las condiciones causadas por otros organismos del ecosistema, como son ataque de herbívoros, infección por microorganismos, competencia con otras plantas, entre otros; mientras que los factores abióticos son aquellos debidos a las variables del medio ambiente como son la radiación solar, la humedad, los nutrientes del suelo, el viento y la temperatura (Webber y Woodrow, 2009).

1.2.- Alelopatía

Considerando la amplia investigación existente sobre los metabolitos secundarios de las plantas y las funciones que cumplen, particularmente en relación a la agricultura, la fitopatología y los patrones de vegetación, estos son denominados aleloquímicos y el fenómeno que tiene lugar mediado por ellos es llamado Alelopatía (Rice, 1984).

En 1996, el término Alelopatía, fue definido por la **Sociedad Internacional de Alelopatía** como:

“cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos y agrícolas”.

En términos de las interacciones planta – planta, la acción de los aleloquímicos puede afectar, entre otras funciones, la respiración, fotosíntesis, actividad enzimática, relación hídrica, apertura estomatal, niveles hormonales, disponibilidad de minerales, división celular y elongación, estructura y permeabilidad de las membranas y paredes celulares de las plantas receptoras alterando su patrón de crecimiento (Chou 1999; Reigosa et al. 1999; Gatti et al., 2010).

En cuanto a su localización dentro de las plantas que los producen, los aleloquímicos pueden estar presentes en todos los órganos, incluyendo hojas, flores, frutos, raíces, rizomas, tallos y semillas, sin embargo, la cantidad y vía de incorporación al entorno varía de especie a especie de plantas dependiendo también de la naturaleza del aleloquímico (Putnam y Tang, 1986; Friedman, 1995; Gatti et al., 2010).

1.2.1.- Rutas de liberación de aleloquímicos

Los aleloquímicos tendrán algún significado ecológico cuando sean incorporados al ambiente por un mecanismo lo suficientemente efectivo para garantizar una concentración tóxica a la planta u organismo receptor. Ecológicamente, se han propuesto cuatro mecanismos para la excreción de los aleloquímicos al ambiente, involucrando procesos de lixiviación, exudación radicular, volatilización y descomposición de partes de la planta en el suelo (figura 1.9) (Whittaker, 1969).

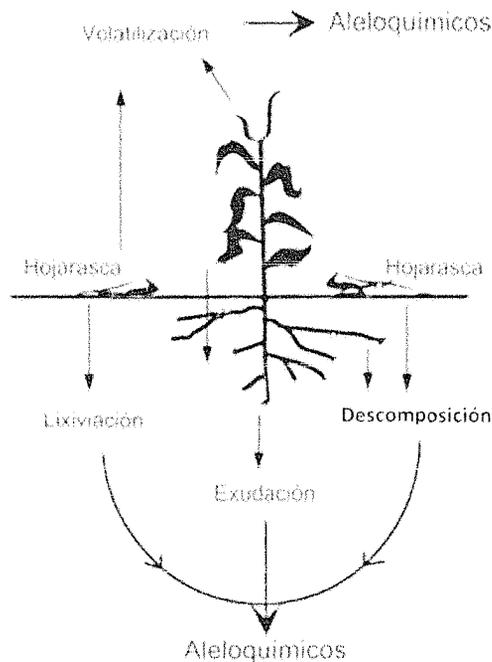


Figura 1.9: Principales rutas de liberación de aleloquímicos al entorno (tomado de Sampietro 2000).

Esto implica que los aleloquímicos pueden encontrarse en cualquier parte de la planta, y que la dinámica de su actividad es una función del mecanismo en que estos puedan ser liberados. Por ejemplo, durante la descomposición de residuos vegetales que implica material senescente, no hay una función activa de la planta, mientras que la volatilización y los exudados radiculares son procesos extremadamente activos donde está involucrado el tejido vivo de la planta (Oliveros, 2008).

1.2.1.1.- Lixiviados

La lixiviación es la remoción de sustancias presentes en la planta por efecto de la lluvia, nieve, niebla o rocío. El tipo de tejido vegetal, la edad de la planta, la cantidad y naturaleza de la precipitación determinaran el grado de lixiviación. De esta manera, se liberan una gran variedad de aleloquímicos de diferente naturaleza, tales como, compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides (Tukey, 1970).

Por ejemplo, se ha demostrado que los lixiviados acuosos de plantas como *Polygonum orientale* (control de cardenal), *Erica vagans* (biércol), *Calluna vulgaris* (brezo), *Daboecia cantábrica* (urciona), *Vaccinium myrtillus* (arándano), *Pinus densiflora* (pino rojo Japonés),

Pilocarpus goudotianus y *Echinacea angustifoli* (equinácea) son ricos en compuestos fenólicos y producen inhibición en la germinación de semillas de diferentes especies de plantas (Alias, 2006).

Así, se han determinado algunos compuestos en los lixiviados de semillas y hojas de plantas a los que se les atribuye un posible potencial alelopático sobre plantas silvestres y cultivadas (Tabla 1.1) (Sampietro, 2000).

Tabla 1.1. Potencial alelopático de los lixiviados de algunos géneros y especies de plantas (tomada y adaptada de Sampietro, 2000).

Nombre de la planta	Efecto inhibitorio sobre la especie receptora	Aleloquímicos	Referencia
<i>Datura stramonium</i> (datura)	Crecimiento de sorgo (<i>Sorghum halepense</i>)	Escopolamina, atropina	Butnariu, 2012
<i>Brassica napus</i> (canola)	<i>Sorghum halepense</i>	Alil isotiocianato	Uremis et al., 2009
<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto común)	Crecimiento de plantas de cultivo (<i>Lactuca sativa</i>)	Ácidos fenólicos y terpenoides	Molina et al., 1991
<i>Calamintha ashei</i>	Germinación y crecimiento de <i>Rudberkia hirta</i> y <i>Leptochloa dubia</i>	(+) Evodona y desacetil calaminthona	Weidenhamer et al., 1994
<i>Juglas</i> spp. (árboles de nueces)	Acumulación del peso seco y elongación del tallo de: <i>Lonicera maackii</i> , <i>Lespedeza cuneata</i> , <i>Trifolium incarnatum</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , y <i>Elaeagnus umbellata</i> .	Juglona	Rietveld, 1983

1.2.1.2.- Exudados radiculares

Las raíces de las plantas además de servir de sostén y para absorber agua y nutrientes para el crecimiento dentro del ambiente del suelo también liberan sustancias químicas de interés (exudados radiculares). La exudación radicular incluye la secreción de iones, oxígeno libre y agua, enzimas, mucílago y una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios que contiene carbono (Uren, 2000; Bertin et al., 2003; Bais et al., 2006). Los pelos radiculares, así como las raíces primarias y secundarias en crecimiento activo, por lo general son los que liberan grandes cantidades de exudados (Bais et al., 2001; Bertin et al., 2003). El patrón radicular está determinado principalmente por el tipo de planta, la estructura del suelo y las interacciones entre los dos. Estos sistemas radiculares muestran alguna

plasticidad fenotípica ya que el ambiente en el cual se desarrollan es heterogéneo tanto en tiempo como en espacio (Bertin et al., 2003; Oliveros et al., 2009).

Algunas de las más complejas interacciones químicas, físicas o biológicas que son experimentadas por las plantas terrestres son las que ocurren entre las raíces y su ambiente circundante en el suelo (rizósfera) (Bais et al., 2006). Es en la rizósfera donde se encontrará toda la carga fitoquímica liberada por la planta y la región donde es de esperar se encuentre la máxima actividad ejercida por los compuestos, o ejercida sobre ellos como es el caso de la biodegradación. Así, esta es la zona que está siendo estudiada en la búsqueda de los agentes verdaderamente activos (Oliveros et al., 2009).

Los diferentes metabolitos secundarios (aleloquímicos), en los exudados radiculares, afectan en las plantas susceptibles la producción de metabolitos, la fotosíntesis, la respiración, el transporte a través de la membrana, la germinación, el crecimiento radicular, el crecimiento del tallo y la mortalidad celular (Einhelling, 1995; Weir et al., 2004; Bais et al., 2006). Así mismo, a través de la exudación de esa amplia variedad de compuestos, las raíces pueden regular la comunidad microbiana del suelo, afectar funciones fisiológicas de las plantas vecinas, hacer frente a los herbívoros, estimular la simbiosis benéfica y cambiar las propiedades físicas y químicas del suelo (Walker, et. al., 2003).

Algunos de los compuestos fitotóxicos que han sido identificados en exudados radiculares de las plantas incluyen a la 7,8-benzoflavona (*Acroptilon repens*, centaurea Rusa) (Stermitz et al., 2003), la (±)-catequina (*Centaurea maculosa*, centaurea moteada) (Bais et al., 2002), el DIMBOA (*Triticum aestivum*, trigo) (Wu et al., 2000), la juglona (*Juglans nigra*, nuez negra) (Jose y Gillespie, 1998), la 8-hidroxiquinolina (*Centaurea diffusa*, centaurea difusa) (Vivanco et al., 2004), la sorgoleona (*Sorghum* spp., sorgo) y la 5,7,4-trihidroxi-3,5-dimetoxiflavona (*Oryza sativa*, arroz) (Kong et al., 2004; Dayan, 2006; Bais et al., 2006).

1.2.1.3.- Volatilización

En los ecosistemas de desierto y mediterráneos, o en zonas de alta radiación solar, la estrategia de liberación de compuestos alelopáticos utilizada frecuentemente es la volatilización, debido al predominio de altas temperaturas y fuertes vientos. La liberación por volatilización de estos aleloquímicos está mayormente restringida a plantas que producen terpenos (comúnmente aceites esenciales) (Dudareva et al., 2004) y se obtienen

fundamentalmente de las partes no leñosas de la planta, en especial de las hojas. Son una compleja mezcla, principalmente de terpenoides, en particular monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de compuestos aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, que determinan el característico aroma y olor de la planta que los produce (Batish et al., 2008). Los géneros que comúnmente liberan compuestos volátiles incluyen *Artemisia*, *Salvia*, *Parthenum*, *Eucalyptus* y *Brassica* (Sampietro, 2000). Entre las funciones reportadas para los aceites volátiles de *Thymus capitatus*, *Satureja thymbra* y *Rosmarinus officinalis* se ha encontrado que estos estimulan la respiración del suelo, lo cual está relacionado con una mayor actividad de los microorganismos (Vokou et al., 1984). Así también, se ha reportado que los compuestos volátiles de las flores sirven como atractores de los polinizadores o como defensa frente al ataque de herbívoros evitando con esto el daño del tejido vegetal (Matsuyama et al. 2000; Dudareva et al., 2004; Cipollini et al., 2008). En el caso del género *Eucalyptus*, estudios realizados demuestran que el mecanismo de bioactividad de los aceites sobre las plantas reduce la supervivencia de las células y el contenido en clorofila, ARN y carbohidratos (Kohli et al., 1988).

1.2.1.4.- Descomposición vegetal

La descomposición de los residuos de la planta es un proceso central de las funciones del ecosistema y del ciclo de los nutrientes. Se han estudiado ampliamente los factores que afectan la velocidad de descomposición y las dinámicas relacionadas con los nutrientes, de acuerdo a las condiciones ambientales, características químicas y diversidad de residuos (Liebl y Worsham 1983; Kobayashi, 2004). Además, se han reportado tanto influencias positivas como negativas que tienen los residuos sobre el crecimiento y regeneración de las especies vegetales (Harper y Lynch, 1982). Estos efectos se han relacionado con diferentes mecanismos tales como: impedimento físico, penetración reducida de la luz, efectos sobre la actividad de predación y liberación de compuestos aleloquímicos durante la descomposición de los residuos vegetales sometidos a procesos físicos, químicos y biológicos en el suelo (Bananomi et al., 2005; Walker et al, 2003).

Los estudios indican que la dinámica de liberación de compuestos fitotóxicos durante la descomposición de los residuos puede potencialmente afectar la dinámica de la población y, consecuentemente, la estructura de las comunidades de plantas, por ejemplo a través de la alteración de factores edáficos cuando la acumulación de aleloquímicos alcanza una cierta concentración (Bananomi et al., 2005; Bonanomi et al., 2011).

1.2.2.- Variables en la actividad de los Aleloquímicos

Una vez que un aleloquímico es incorporado al ambiente, su actividad se verá afectada por variables del entorno, las cuales además afectaran la producción de los aleloquímicos por la planta donadora. Estas variables o factores de estrés generan reducción de funciones fisiológicas (como: absorción de agua o nutrientes, fotosíntesis, respiración, crecimiento, desarrollo y reproducción) haciendo a este fenómeno un proceso dinámico que se desarrolla en distintas fases (Lambers et al., 1998; Alias, 2006):

- Estrés.
- Respuesta al estrés.
- Aclimatación.
- Adaptación (en un tiempo evolutivo).

Entonces, se podría definir el estrés como un estado en el cual las demandas fisiológicas desestabilizan el correcto funcionamiento de la planta, seguido por una fase de normalización y de resistencia. Si la planta es forzada a vivir fuera de estos límites de tolerancia y su capacidad de aclimatación es sobrepasada, el resultado es una demanda crónica e incluso la muerte. Sin embargo, el efecto de estos factores de estrés no solo depende de la intensidad y del tiempo de exposición a los mismos, sino también de la especie, variedad e incluso del individuo, así como de las condiciones de vida previas de la planta. Los principales factores de estrés que afectan la biosíntesis de aleloquímicos y su actividad son: la ontogenia de la planta (planta donadora y receptora), las condiciones meteorológicas, el suelo y la concentración de aleloquímicos en el entorno (Alias, 2006).

1.2.2.1.- Ontogenia de la planta

La ontogenia (también llamada morfogénesis u ontogénesis) describe el desarrollo de un organismo, desde el óvulo fertilizado hasta su senescencia, pasando por la forma adulta.

Esta consiste principalmente de dos procesos: el crecimiento y la diferenciación celular. El crecimiento involucra la división y ampliación celular que esta relacionada con la biomasa, el número, tamaño y volumen de las células. La diferenciación involucra por su parte, al desarrollo de los tejidos como hojas, tallos y raíces. Esta diferenciación regula el desarrollo fenológico que es evidente a través de la morfología, el desarrollo de las plántulas, la floración, la maduración fisiológica y la velocidad de desarrollo, y que determinará la defensa química producida por las plantas. Este desarrollo fenológico y en consecuencia

las defensas químicas producidas son moduladas por los factores bióticos y abióticos del entorno (Herms y Mattson, 1992; Barthelemy y Caraglio, 2007).

Algunos estudios empíricos han examinado las trayectorias ontogénicas en la defensa química de las plantas, concentrándose generalmente sobre los tejidos aéreos; así, el conocimiento sobre las tendencias generales de la defensa de la planta (desde el punto de vista de interacción planta-planta) a lo largo del desarrollo está limitado. De acuerdo a esto, se han estudiado los cambios en la biomasa de la planta, calidad nutricional y defensas químicas para los tejidos subterráneos y aéreos a lo largo del crecimiento de *Plantago lanceolata* encontrándose un aumento significativo de iridoides glicosídicos que cumplen funciones de defensa frente al ataque de herbívoros (Quintero y Bowers, 2011).

Por otro lado, algunas plantas proveen a las semillas de altas concentraciones de metabolitos secundarios, posiblemente para protegerlas, hasta que germinen y las plántulas hayan crecido, como es el caso de las semillas de tonka o sarrapia (*Dipteryx odorata*) las cuales almacenan cumarina en gran cantidad (Herms y Mattson, 1992).

1.2.2.2.- Condiciones meteorológicas

Cuando se trata con los aleloquímicos en plantas, es importante considerar las condiciones como temperatura, estrés hídrico y radiación solar. Estas condiciones han demostrado afectar la cantidad de aleloquímicos producidos, pudiendo restringir el crecimiento de las plantas y reducir la velocidad fotosintética (Khalid et al., 2002). Carbohidratos no estructurales tienden a ser acumulados, bajo estas condiciones y pueden explicar el aumento de síntesis de sustancias de defensas basadas en carbono pertenecientes al metabolismo secundario (Sosa, 2003).

Un ejemplo es el trabajo de Tongma y colaboradores (2001), donde reportaron que en el campo, bajo condiciones de estrés hídrico, el crecimiento de la flor del sol Mexicana (*Tithonia diversifolia*) se redujo, pero la planta produjo una cantidad más grande de sustancias alelopáticas por peso seco que en ausencia de estrés hídrico.

Así mismo, los compuestos fenólicos son de gran importancia en la adaptación de las plantas frente a las fuerzas evolutivas de selección de naturaleza biótica y climática, en

particular con referencia a la función protectora frente a la excesiva radiación solar. Estudiando la dinámica de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular (FBPM) y de alto peso molecular (FAPM) en los helechos neotropicales *Pteridium caudatum* (1180 – 2140 msnm) y *Pteridium arachnoideum* (1880 – 3190 msnm) se registró la acumulación progresiva de ambos tipos de compuestos fenólicos con la expansión del fronde, por el incremento de la superficie de la lámina expuesta a la luz del sol. Los niveles de FAPM correlacionaron positivamente con la elevación en ambas especies de helecho. La respuesta independiente de ambos tipos de fenólicos a la radiación solar se interpretó como una protección más efectiva y de costo metabólicamente más efectivo de los FAPM frente a la luz UV-B que los FBPM o como una activación diferencial por la luz de los pasos claves en la biosíntesis de FAPM y FBPM en el helecho (Alonso-Amelot et al., 2004; Alonso-Amelot et al., 2007).

Para elucidar los efectos de la temperatura y el fotoperiodo sobre la calidad y cantidad de los exudados radiculares de *Cucumis sativus*, cv. Shougoin-Aonaga-Fushinari (Pramanik, 2000), los investigadores prepararon cultivos hidropónicos bajo condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas. El crecimiento radicular (y acumulación de peso seco) se redujo, especialmente a alta temperatura y largo fotoperiodo. Paralelamente, la velocidad de exudación en las etapas vegetativas y reproductivas de ácido benzóico, derivados del ácido cinámico y ácidos grasos (que fueron identificados en la solución de los hidropónicos), incrementó con la elevación de la temperatura y el alargamiento del fotoperiodo, siendo la velocidad media de exudación dos o tres veces más alta que el valor mínimo obtenido a baja temperatura y corto fotoperiodo.

Por lo tanto, las plantas pueden experimentar de manera simultánea diferentes tipos de estrés, pudiendo responder de una forma aditiva, sinérgica o antagónica. Algunos estudios revelan que la respuesta de la planta a condiciones de estrés múltiple es diferente a la que se observa cuando el estrés es impuesto por separado (Cen y Bornman, 1993; Balakumar et al., 1993). Por ejemplo, en *Cistus ladanifer* la inducción de flavonoides depende de la luz ultravioleta así como del contenido de agua en hojas, siendo la suma de estos factores especialmente relevante en su producción total (Chaves, 1994; Chaves y Escudero., 1997).

1.2.2.3.- Suelo

El suelo es un sistema físico, químico y biológico complejo. El comportamiento de los aleloquímicos en el suelo está gobernado, no solo por las propiedades fisicoquímicas (pH, contenido de humedad) de éste, sino también por la materia orgánica y los microorganismos presentes. Ellos afectan la adsorción, desorción y transporte de estos compuestos así como su metabolismo (figura 1.10), haciendo de esto un proceso dinámico. Así mismo, la cantidad de aleloquímicos liberados desde la planta donadora y la sensibilidad de la planta receptora a los mismos, es también dependiente de las condiciones de crecimiento de ambas plantas (Kobayashi, 2002; Kobayashi, 2004).

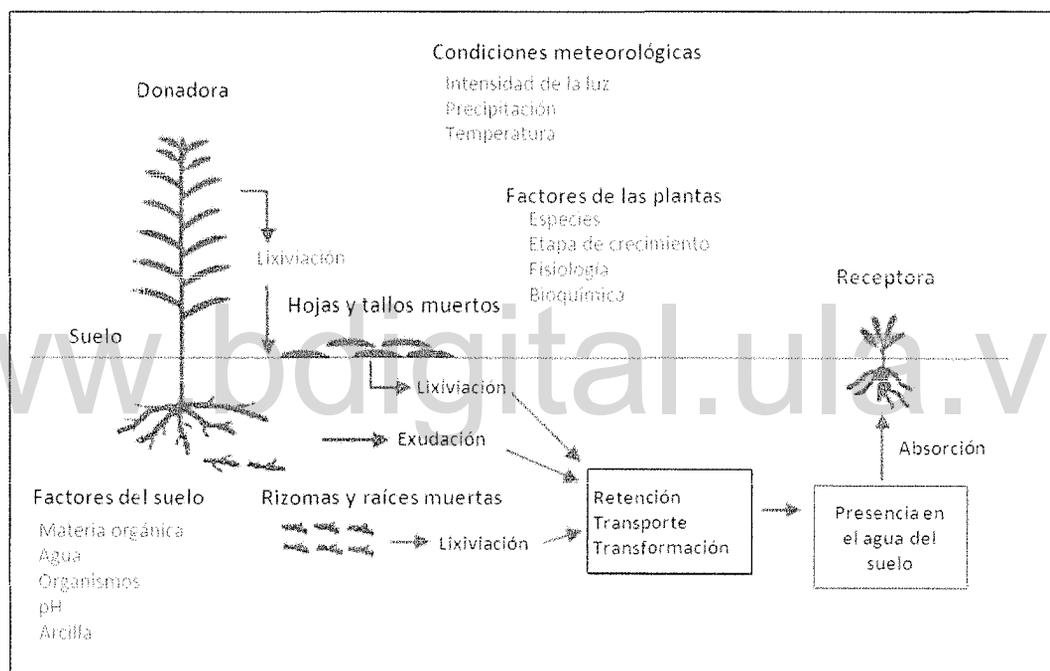


Figura 1.10: Factores que afectan el comportamiento y la actividad fitotóxica de los aleloquímicos en el suelo (Tomado y adaptado de Kobayashi, 2004).

Entonces, dependiendo del tipo de suelo y de sus características fisicoquímicas, la producción de toxinas por parte de las plantas así como su actividad se verán afectadas y son muchos los trabajos que dan evidencia de ello; un ejemplo lo tenemos en el estudio del efecto que produce el suelo sobre la síntesis de terpenos de la especie *Cistus monspeliensis*, realizado por Rivoal y colaboradores (2010). Ellos observaron que las velocidades más altas de emisión de terpenos (de compuestos individuales y totales) se obtuvieron en

sustrato de silicio. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis del balance carbono/nutrientes, ya que el sustrato de silicio tiene más bajo contenido de nutrientes (bajo nivel de nitrógeno y baja capacidad de intercambio catiónico) que el sustrato calcáreo. Cuando todos los factores son favorables, los procesos de crecimiento predominan sobre la producción de los compuestos secundarios, pero cuando un nutriente tal como el nitrógeno es escaso, la planta asignará proporcionalmente más recursos a los compuestos secundarios basados en carbono tales como terpenos. Esto se demuestra con la correlación negativa encontrada entre el contenido de nitrógeno del suelo y la producción de terpenos en la hoja.

También los aleloquímicos pueden ser transformados por los constituyentes del suelo; como en el caso de los ácidos fenólicos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, ferúlico, siríngico, y los ácidos vanílico que al ser retenidos en suelos tipo arcilloso, por compuestos no cristalinos de hidroxialuminio y hierro y por otros minerales, ocurre una polimerización de los compuestos fenólicos catalizada por estos minerales de la arcilla (Inderjit, 1996).

Así mismo, se ha reportado que los frijoles de *Mucuna pruriens* liberan 3-(3',4'-dihidroxifenil)-L-alanina (L-DOPA) como un aleloquímico que inhibe el crecimiento de otras plantas; se observó que la actividad inhibitoria depende del tipo de suelo, reduciéndose extremadamente en Andosols (alto contenido de minerales de aluminio y hierro principalmente). Al adicionar una solución de L-DOPA al suelo, la concentración del metabolito en la solución disminuyó por la absorción y reacciones de transformación (polimerización), observándose una actividad catalítica de los componentes del suelo (figura 1.11 y 1.12). Así mismo, el efecto inhibitorio de L-DOPA sobre el crecimiento de las plantas receptoras se debilitó, lo que indicó que la actividad alelopática se va perdiendo (Hiradate et al., 2005).

Por su parte, los procesos de retención retardan el movimiento del aleloquímico en el ambiente, por ejemplo en el caso de la juglona, 5-hidroxi-1,4-naftalenediona (figura 1.12), la concentración en suelo de este aleloquímico disminuye en un 80% con el aumento de la distancia a más de 4 metros de la hilera de árboles de *Juglans nigra* L. (Jose y Gillespie, 1998).

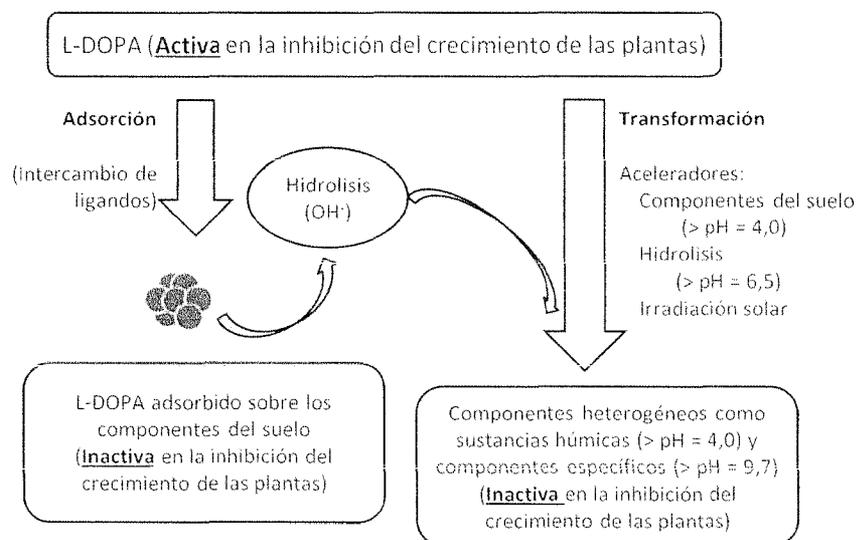


Figura 1.11: Comportamiento químico y biológico de L-DOPA en ambientes de suelo (Hiradate et al., 2005).

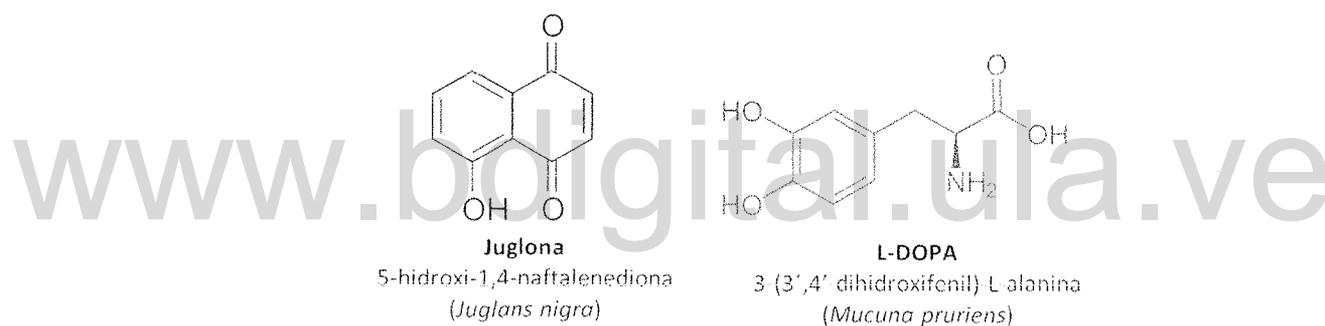


Figura 1.12: Estructura química de la juglona y la L-DOPA

Los microorganismos del suelo, también juegan un papel importante en la determinación de la persistencia de los aleloquímicos en el suelo, pues consumen moléculas orgánicas y por lo tanto los aleloquímicos pueden no acumularse a los niveles fitotóxicos, por lo que la planta donadora puede no exhibir alguna actividad alelopática en situaciones naturales. Además, en muchas situaciones, un compuesto liberado por las plantas puede ser inocuo, mientras que su producto de degradación microbiana puede ser tóxico (Inderjit, 2005). También se debe tener presente que la actividad microbiana dependerá de la temperatura, materia orgánica, pH del suelo, contenido de nutrientes y contenido de agua en el suelo (Hanson, 2010). La juglona, ya mencionada anteriormente, ha sido detectada en suelos con un alto contenido de humedad, lo cual favorece su acumulación, extracción y actividad

fitotóxica, pues estas son condiciones de reducción anaeróbicas que no favorecen la degradación biológica y química de la juglona (Rietveld, 1983). Si embargo, un estudio de degradación microbiana, realizado por Rettenmaier y colaboradores (1983), usando *Pseudomonas putida*, que fue aislada de suelos donde crece *Juglas nigra*, demostró que se puede catabolizar la juglona. Los pasos de degradación son:

Juglona → 3-hidroxi-juglona → 2,3-dihidroxibenzoato → semialdehído del ácido 2-hidroxi-muconico.

En conclusión, el hábitat de la especie, las propiedades fisiológicas y biológicas del sustrato y las condiciones edáficas y medioambientales determinarán la síntesis y actividad de los aleloquímicos, pudiendo repercutir en la disponibilidad cuantitativa y cualitativa de los mismos en la planta y en el suelo (Inderjit, 2005).

De esta manera, las principales rutas de biotransformación (degradación) de los aleloquímicos en el suelo citadas por Hanson (2010) son:

- *Fotoquímica*: Ocurre debido a la destrucción de los enlaces químicos por la radiación UV. Esto estará determinado por la estructura del aleloquímico, el tiempo de exposición y la época del año.
- *Químico (agua o suelo)*: Cambia la estructura química debido a los factores abióticos en el suelo, por ejemplo la hidrólisis de una molécula por el agua presente en el suelo. Esto dependerá del pH, la temperatura, contenido de materia orgánica y arcilla, humedad del suelo y por la estructura química del aleloquímico (anillos y cadenas, grupos funcionales).
- *Microbiano (agua o suelo)*: Cambia la estructura química debido a la actividad de los microbios que producen enzimas que degradan los compuestos. Los organismos usan las moléculas como fuente de alimento.
- *Metabolismo animal/planta*: Producen cambios en la estructura química de los compuestos de acuerdo con su metabolismo.

Los numerosos tipos de reacciones que esencialmente tienen lugar para que se produzca la degradación de los aleloquímicos en el suelo, de acuerdo con las rutas mencionadas, son: deshalogenación, desalquilación, descarboxilación, oxidación, reducción, hidrólisis, conjugación, ruptura de anillos, polimerización, entre otras (Hanson, 2010).

1.2.2.4.- Concentración de los aleloquímicos y mezclas de estos

La cuantificación de la concentración de los aleloquímicos incorporados al ambiente (en particular al suelo) es necesaria para estudiar la alelopatía. Williamson y Weidenhamer (1990) sugirieron que la toxicidad está dada principalmente en función de la concentración existente de toxinas y de su tasa de renovación por la planta alelopática. Sin embargo, la concentración de los aleloquímicos en el campo depende de la densidad y crecimiento de la planta alelopática, hábitat, patrón de cultivo, y prácticas agrícolas. Es por lo tanto muy difícil determinar los valores de concentración exacta de los aleloquímicos bajo condiciones de campo.

En principio, la concentración de un aleloquímico se debe determinar por la tasa de entrada al ambiente (es decir, lixiviados de la hoja, exudados radiculares, o descomposición y lixiviación de los restos de la planta), absorción y desorción por semillas y raíces, fijación por los componentes del suelo y degradación microbiana. Todos estos factores revelan que existe desigual distribución de las sustancias fitotóxicas y además, los efectos inhibitorios en suelo dependen de la probabilidad de la exposición, de las raíces de las plantas afectadas a los focos de toxinas (Inderjit y Dakshini, 1995).

Así mismo, se debe considerar que los aleloquímicos son liberados al medio ambiente como mezclas de compuestos de diversa naturaleza, y generalmente su actividad es una consecuencia de la combinación de los mismos. Las interacciones alelopáticas son el resultado de la actividad sinérgica, aditiva o antagónica de varios aleloquímicos, más que de la actividad de uno solo de ellos. Bajo condiciones de campo, estos efectos pueden estar influenciando aun a bajas concentraciones (Inderjit y Dakshini, 1995).

Un ejemplo de esto lo muestran Williams y Hoagland (1982), los cuales realizaron estudios de fitotoxicidad de varios compuestos fenólicos sobre la germinación de nueve especies de malezas y plantas cultivables. El ácido clorogénico, el *p*-hidroxibenzaldehído, y el pirocatecol, cada uno combinado con la cumarina, inhibieron la germinación. La combinación de cumarina + *p*-hidroxibenzaldehído tuvo un efecto aditivo sobre *Cannabis sativa* y *Sida acuta*, inhibiendo la germinación en mayor grado que cualquier compuesto individual.

1.3.- Estudios alelopáticos. Evaluación de la actividad de los aleloquímicos

1.3.1.- Diseño de ensayos biológicos

En términos generales, el diseño de los ensayos biológicos, para la evaluación del fenómeno alelopático, se basa en objetivos bien específicos y es dependiente de la dualidad planta receptora/planta donadora y de las características del agente potencialmente alelopático. Estos objetivos incluyen algunas de las siguientes características (Inderjit y Nilsen, 2003):

- ✓ Presencia y liberación de aleloquímicos en la planta denominada donadora.
- ✓ Inhibición de los parámetros de crecimiento de la planta denominada receptora e interferencia del aleloquímico con sus procesos fisiológicos.
- ✓ Destino final del aleloquímico en el suelo.
- ✓ Movimiento del aleloquímico en el suelo y su absorción por la planta receptora.
- ✓ Fenómenos de detoxificación del aleloquímico absorbido por la planta receptora.
- ✓ Efecto del aleloquímico sobre la ecología del suelo y dinámica de nutrientes.
- ✓ Interacción con promotores, inhibidores y sustancias neutras en el ambiente suelo.

Bajo estas directrices, se han desarrollado una gran diversidad de bioensayos para el estudio de los efectos de los aleloquímicos aislados o liberados por plantas, sobre el crecimiento y distribución poblacional de otras especies en su vecindad. En esta dirección, la mayoría de los bioensayos se han centrado en la identificación de aleloquímicos potenciales, evaluación de sus efectos fitotóxicos o sus efectos en el crecimiento de plantas, asociadas o no a la productora (plantas receptoras estándares o malas hierbas), con el objetivo de implementar relaciones estructura - actividad, que incluyen aleloquímicos y análogos sintéticos (Oliveros, 2008).

Muchos de los bioensayos para tales estudios alelopáticos incluyen: germinación de semillas, pruebas de crecimiento de coleóptilo, pruebas de plantas completas, efectos sobre las membranas celulares y otros (Hoagland y Williams, 2003). Estos bioensayos permiten determinar que compuestos muestran actividad alelopática y determinar esa actividad cualitativa y cuantitativamente. Desde el punto de vista metodológico (en el laboratorio), se pueden mencionar los bioensayos en placas de *Petri* (usando como soporte agar, papel

filtro, perlas de vidrio y suelo entre otros), bioensayos hidropónicos y bioensayos en materos con suelo (Pisula y Meiners, 2010).

Un tipo de bioensayo relacionado es el diseño de cocultivo (un tipo de hidropónico), el cual se fundamenta en la importancia del destino de los aleloquímicos en el suelo, permitiendo determinar los niveles de exudados radiculares y el potencial alelopático de manera simultánea de una especie donadora sobre una receptora (Inderjit y Dakshini, 1995). En este tipo de bioensayo se deben considerar diferentes variables como: la especie donadora y la especie receptora (velocidad de crecimiento, los niveles de aleloquímicos liberados a través del exudado de la raíz y densidad de plantas) y la naturaleza química de los compuestos exudados (Belz y Hurle, 2004; Oliveros, 2008).

Uno de los aspectos que deben tomarse en cuenta al momento de diseñar un ensayo para probar la existencia de la alelopatía, es el grupo al cual pertenece la planta, sospechosa de ser alelopática, pues el proceso alelopático en los cultivos y sus residuos es diferente al de las malezas y el de las malezas perennes es diferente del de las malezas anuales, debido a la naturaleza siempre verde. Por lo tanto, el hábitat de la planta debería ser considerado cuando se diseñan los bioensayos alelopáticos (Inderjit y Dakshini, 1995).

En cuanto al tratamiento del material vegetal, en muchos estudios éste es molido para valorar la actividad alelopática o para identificar y aislar los aleloquímicos. Esta molienda produce la liberación de ciertas enzimas, sales, aminoácidos, y compuestos que pueden no ser liberados bajo circunstancias naturales. Los bioensayos realizados con material vegetal macerado de esta manera son de poca relevancia ecológica, pues el procedimiento de extracción causa cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil fitoquímico. Algunos de esos compuestos no pueden ser naturalmente lixiviados o exudados, y por lo tanto, no son fisiológicamente importantes aun cuando puedan ser significativos en los bioensayos de laboratorio. Por lo tanto, la molienda del material vegetal en los estudios alelopáticos debería evitarse (Inderjit y Dakshini, 1995).

Por otro lado, la metodología de extracción de los aleloquímicos es esencial en los bioensayos alelopáticos. La selección del material a extraer (partes vegetales de la planta de sospechada actividad alelopática o su suelo asociado) y del solvente a usar debe

realizarse con criterio. Es necesario establecer no solamente la presencia de estos químicos, en concentraciones biológicamente activas, sino también el nivel de persistencia capaz de afectar a otras plantas en su vecindad. Por lo tanto, el aislamiento e identificación de los aleloquímicos presentes en el ambiente es de gran importancia para poder establecer la presencia de la alelopatía (Inderjit y Dakshini, 1995).

Entre los solventes más usados en los procesos de extracción están agua fría, agua caliente y solventes orgánicos tales como metanol, cloroformo, e hidróxido de sodio. Sin embargo, debe evitarse el uso de agua caliente o de solventes orgánicos o inorgánicos, debido a que hay diferencias cualitativas y cuantitativas entre los aleloquímicos extraídos en los bioensayos del laboratorio y los que se transfieren al ambiente en condiciones naturales (Inderjit y Dakshini, 1995).

En resumen, las siguientes consideraciones pueden reducir la diferencia entre los bioensayos de laboratorio y las interacciones en campo, durante el estudio de la alelopatía:

- 1.- Prestar atención al hábitat y al patrón de ciclo de vida de las plantas alelopáticas.
- 2.- No moler el material vegetal y evitar la extracción con solventes orgánicos.
- 3.- Seleccionar un tipo de suelo similar al de residencia de la planta alelopática.
- 4.- Realizar un análisis químico de los suelos modificados para así seleccionar un suelo cuyas características químicas simulen lo mas cercanamente posible a esas de residencia de la planta alelopática.

El reto que hoy día se presenta es estudiar este sistema con el objetivo de seguir el aleloquímico desde la especie donadora hasta la receptora, de una manera dinámica; es decir, durante el tiempo en que las dos especies estén enfrentadas. Lograr determinar toda la ruta del aleloquímico, significaría dar una evidencia contundente de la translocación de un aleloquímico sintetizado por una especie, liberado al ambiente, detectado en los tejidos de la especie receptora, donde además se registren efectos anormales en sus parámetros de crecimiento. Todo ello representaría una evidencia del fenómeno alelopático, hoy día pendiente de ser demostrado (Oliveros, 2008).

1.3.2.- Medidas cuantitativas de respuestas biológicas

Las técnicas de bioensayos son ampliamente usadas para la determinación cuantitativa de las respuestas biológicas a los aleloquímicos. Leather y Einhellig (1986, 1988) han revisado exhaustivamente la naturaleza y tipos de técnicas de bioensayo usados en alelopatía y se ha demostrado que la respuesta de un organismo a un químico depende, entre otras cosas, de la dosis. Se ha descrito en muchos casos, una respuesta de estimulación del crecimiento a bajas concentraciones del aleloquímico y de inhibición a altas concentraciones (Lovett et al., 1989). La respuesta de las plantas a los aleloquímicos como las fitotoxinas, se relaciona de manera no-lineal, por lo que, los efectos alelopáticos pueden ser adecuadamente cuantificados por modelos matemáticos no-lineales (Belz et al., 2005).

De acuerdo con esos antecedentes y resultados experimentales, Hiradate (2006, 2010), propone que el potencial alelopático de una planta se evalúa sobre las bases de dos indicadores:

- 1) La actividad específica (actividad biológica por unidad de peso del compuesto).
Altos valores de este indicador conducen al descubrimiento de los compuestos más activos con un bajo EC_{50} (concentración específica del aleloquímico que ejerce la mitad del efecto máximo sobre la planta receptora).
- 2) La actividad total (actividad biológica por unidad de peso del organismo que produce el compuesto), es una función del producto entre la actividad específica y el contenido en el organismo.

1.4.- *Pteridium*

El género *Pteridium* está constituido por plantas vasculares sin semilla, conocidas popularmente en Venezuela como el helecho macho. En general, los helechos son un grupo de plantas que aparecieron desde antes del Carbonífero y poseen representantes aun en la actualidad (Raven et al., 1991; Wieckowska et al., 2012).

Este es uno de los géneros de plantas cosmopolitas más exitosas en el mundo (figura 1.13). Al menos tres de sus características pueden explicar este hecho: (1) tiene una remarcada plasticidad morfológica que facilita su adaptación a varios hábitat, (2) esta químicamente

bien defendido frente a herbívoros y otras plantas con un arreglo de toxinas de amplio espectro estructural y (3) invade nuevos territorios tanto por su reproducción sexual, a través de la dispersión de un gran número de esporas microscópicas (figura 1.14), las cuales son llevadas por el viento viajando largas distancias (Tryon 1941; Alonso-Amelot, 2002), como por la extensión de su red de rizomas, los cuales son capaces de mantener repetidos cortes de sus frondes que hayan sido aclarados por el fuego o por aplicaciones de pesticidas (Alonso-Amelot y Rodulfo-Baechler, 1996).

1.4.1.- Clasificación y distribución del helecho macho

Reino: Plantae

División: Pteridophyta

Clase: Filicopsida

Orden: Polypodiales

Familia: Dennstaedtiaceae

Género: *Pteridium*



Figura 1.13: Fronde de *Pteridium*.

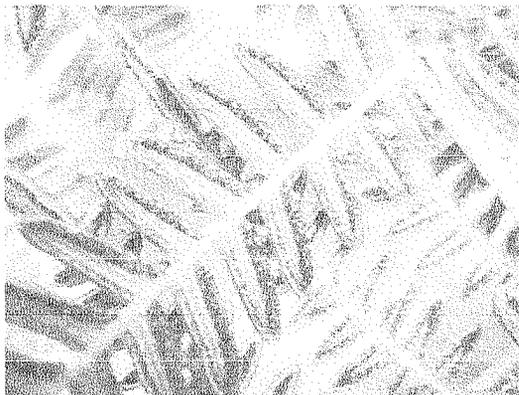


Figura 1.14: Esporas en un fronde maduro de *Pteridium caudatum* (Fotografía tomada por Jorge Luis Ávila).

El *Pteridium* afecta profundamente los ecosistemas intervenidos por la actividad agropecuaria en los cinco continentes, y hasta islas remotas del océano Pacífico (ver tabla 1.2). Crece en regiones templadas y subtropicales en gran parte del mundo, incluyendo la mayoría de Europa, Asia y Norte América en el Hemisferio Norte y Australia, Nueva Zelanda y el norte de Sur América en el Hemisferio Sur.

1.4.2.- Especies del *Pteridium* presentes en Venezuela

El *Pteridium*, helecho macho, helecho de montaña, helecho común, o helecho águila, crece profusamente en las zonas montañosas húmedas y semi húmedas de toda Venezuela (Ortega, 1991), quedando exentos de su abundante presencia algunos lugares como las zonas desérticas, el espinar xerofítico, las selvas húmedas tropicales, las selvas nubladas de montaña (mientras no se les elimine pues cuando esto ocurre crece explosivamente), y las sabanas húmedas bajas hipertérmicas del trópico en las que no puede competir con otras especies vegetales que están mejor adaptadas para soportar los meses de sequía extendida (Alonso-Amelot, 1999).

En Venezuela, el helecho macho se extiende a lo largo de toda la Cordillera Andina, que comienza desde el Táchira y llega a la Península de Paria a través de la Cordillera de la Costa y el Macizo de Turumiquire. Esto incluye las ramificaciones hacia el norte, por la cordillera de Perijá y la Serranía de Coro. Se le ha detectado en varios puntos de Guayana como Los Pijiguaos y la Gran Sabana y algunos tepuyes en el Estado Bolívar, y la Sierra de Imataca (Ortega, 1991).

Los pies de monte se ven igualmente afectados desde los 300 a 500 m sobre el nivel del mar, como se pueden observar a ambos lados de la Cordillera Andina. Montañas geológicamente aisladas y recientes, tales como el cerro Santa Ana en la península de Paraguaná, posee macizos de helecho macho, a pesar de estar rodeado por todas partes de bosque xerofítico en el que no hay estos helechos, y que las montañas más cercanas -la Sierra de Coro- se encuentran a más de cien kilómetros de distancia. Ello demuestra la capacidad invasiva de esta planta por intermedio de sus esporas (Alonso-Amelot, 1999).

En Venezuela se han descrito dos especies neotropicales del helecho macho, *Pteridium caudatum* y *Pteridium arachnoideum*.

A lo largo de los años ha habido discrepancias en cuanto al rango taxonómico que se debía dar a estos helechos que ahora son considerados especies; de modo que en 1976, Cooper-Driver expresó que el considerar al *Pteridium* como un género monoespecífico era demasiado conservador, puesto que, por ejemplo, el *Pteridium arachnoideum* es lo suficientemente distinto para ser considerado una especie separada.

Tabla 1.2: Algunas de las especies de *Pteridium* que han sido reportadas y clasificadas taxonómicamente de acuerdo con estudios morfogénicos.

Especie	Sub-especie	Variedad	Distribución geográfica	Referencias
<i>P. aquilinum</i>	<i>aquilinum</i>	<i>fulvum</i>	Oeste de Europa y Norte de África	Marrs y Watt, 2006; Thomson, 2004
	<i>capense</i>		Sub-Saharan en Africa	Thomson et al., 2005
	<i>centrali-africanum</i>		Sub-Saharan en Africa	Thomson et al., 2005
	<i>decompositum</i>		Hawaii	Thomson et al., 2008
	<i>*feei</i>		Centro América	Thomson et al., 2008
	<i>japonicum</i>		Norte y Este de Asia	Thomson et al., 2008
	<i>laticulum</i>		Norte América	Thomson et al., 2008
	<i>pinetorum</i>		Norte, Centro y Este de Europa	Thomson et al., 2008
	<i>pinetorum</i>	<i>osmundaceum</i>	Norte y Centro de Europa	Marrs y Watt, 2006; Thomson, 2004
	<i>pseudocaudatum</i>		Norte América	Thomson et al., 2008
<i>pubescens</i>		Norte América	Thomson et al., 2008	
<i>wightianum</i>		Sur y Este de Asia	Thomson et al., 2008	
<i>P. arachnoideum</i>			Centro América y Suramérica	Thomson et al., 2008
<i>P. caudatum</i>			Centro América y Suramérica	Thomson y Alonso-Amelot 2002
<i>P. esculentum</i>			Centro América y Suramérica	Marrs y Watt, 2006; Thomson, 2004
<i>P. semihastatum</i>			Asia y Australasia	Thomson et al., 2008

*Este taxón tiene estrictamente dos nombres válidos, *P. feei* y *P. aquilinum* var. *feei*. Sin embargo recientes trabajos moleculares sugieren que este taxón es cercano a las sub-especies de *P. aquilinum* y es probable que sea rediseñado como se muestra provisionalmente aquí.

Por otra parte, criterios morfológicos, ecológicos, bioquímicos y genéticos apoyaron plenamente el rango específico y el nombre *P. caudatum* (L.) Maxon, para esta otra especie y se argumentó en contra del estatus de variedad denominada *P. aquilinum* var. *caudatum*. Además la var. *caudatum* no fue una nominación apropiada al taxón para las

subespecies *P. aquilinum ssp. caudatum* (L.) Bonap., que fue mantenido por Tryon (1941) para agrupar predominantemente a las variedades de helecho del Hemisferio Sur en contraste con las variedades predominantes del Hemisferio Norte que comprenden *P. aquilinum ssp. aquilinum* (Thomson, 2000; Thomson y Alonso-Amelot, 2002).

1.4.3.- Morfología comparativa

Una remarcable plasticidad genética asiste al helecho en su habilidad por invadir nuevos territorios (Parks y Werth, 1993). Esta flexibilidad es reflejada en rasgos morfológicos que son claramente diferenciados en las dos especies neotropicales (Alonso-Amelot, et al., 1995). Este helecho posee frondes de hasta 2 metros, con un rizoma subterráneo desarrollado y con pelos pardos oscuros. Normalmente los frondes son compuestos, es decir la lámina está dividida en foliolos o pinas, que están unidas al raquis (figura 1.15) (Alonso-Amelot y Rodulfo-Baechler, 1996).

Las especies *P. caudatum* y *P. arachnoideum* pueden ser claramente distinguidas por la forma y el color de las pínulas en el fronde maduro. Mientras la lámina foliar del fronde del *P. arachnoideum* muestra generalmente una superficie más oscura con segmentos muy duros y una separación dada por pequeños lóbulos opuestos a la mayoría de los segmentos, el *P. caudatum* posee una coloración verde más ligera con segmentos menos duros y mas espaciados sin lóbulos opuestos; en éste los segmentos y lóbulos parecen fundidos (figura 1.16) (Alonso-Amelot y Rodulfo-Baechler, 1996).

El *P. arachnoideum* desarrolla mucha más densidad que el *P. caudatum* con gran cantidad de biomasa aérea y subterránea. Si estas plantas desarrollan diferentes morfologías es de esperarse que sus estrategias invasivas puedan variar cualitativa y cuantitativamente también. Esto está ejemplificado por la distribución altitudinal de las dos especies. El *P. caudatum* ocupa preferiblemente las altitudes más bajas variando desde el nivel del mar (ocasionalmente) hasta cerca de los 2100 msnm y el *P. arachnoideum* prefiere niveles superiores desde 1300 m hasta 2800 msnm con ocurrencias ocasionales sobre los 3200 msnm (Alonso-Amelot et al., 1995).

El helecho macho se caracteriza por su crecimiento rápido y la facilidad con la que se extiende a nuevos territorios por su modo de reproducción, sexual y asexual y su sistema subterráneo de rizomas. Produce un número prodigioso de esporas microscópicas que

pueden alcanzar los 10 g por fronde en el caso del *P. arachnoideum*, o más de un billón de partículas. Aunque la tasa de germinación de estas esporas es baja, esto es suficiente para colonizar efectivamente nuevos territorios desnudos (Alonso-Amelot et al., 2001).



Figura 1.15:

Características morfológicas del *Pteridium* en forma generalizada; (a) lámina del fronde; (b) raquis; (c) pina; (d) stipe; (e) nectario; (f) cayados con pelos; (g) primordio foliar referido al pequeño retoño; (h)ápice del retoño; (i) línea lateral; (j) raíces petiolares – encontradas en variedad *esculentum*; (k) raíces; (l) rizoma; (m – p) pina mostrando: (m) pínula; (n) nervadura de la pina; (o) pinuleta o segmento; (p) nervadura de la pínula (Marrs y Watt, 2006).

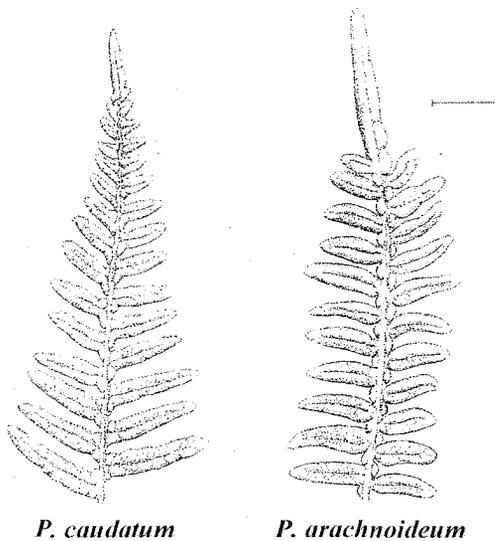


Figura 1.16: Comparación de la morfología de las pinas de las dos especies de *Pteridium* encontradas en Venezuela (Tomada de Alonso – Amelot y Rodulfo –Baechler, 1996).

1.4.4.- Etapas fenológicas

El desarrollo de los frondes de *Pteridium* puede dividirse en cuatro etapas fenológicas (ver figura 1.17) (Alonso-Amelot, et al., 1995).

- **Primera etapa:** Aparece el cayado en la superficie del suelo; es un tejido muy tierno que crece verticalmente (0 – 9 días).
- **Segunda etapa:** Aparece desplegado el primer par de láminas foliares a ambos lados del raquis. Las otras láminas se encuentran todavía expandiéndose en forma de cayados secundarios (10 – 17 días).
- **Tercera etapa:** Aquí ya se encuentra desplegada el segundo par de láminas foliares (20 – 30 días).
- **Cuarta etapa:** Se desarrollan todas las pinnas y se observa toda la fronda completamente extendida a lo largo del raquis (35 días hasta senescencia)

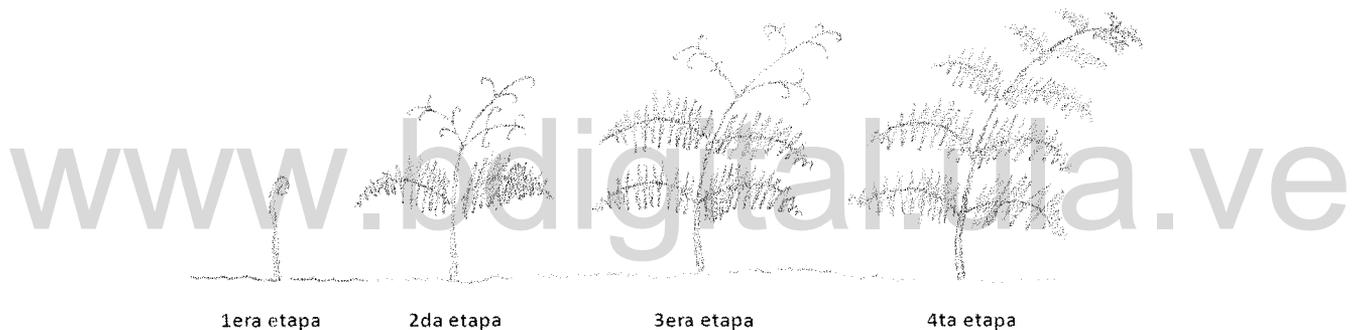


Figura 1.17. *Pteridium caudatum* en las cuatro etapas fenológicas de desarrollo (Tomada de Alonso-Amelot, 1999).

1.4.5.- Toxicidad del *Pteridium* spp.

El helecho macho no es solamente una maleza que crece profusamente, ahogando pastos y algunos cultivos, sino que también al ser ingerido por los animales de cría, *P. aquilinum* produce una variedad de afecciones graves: avitaminosis B1, afecciones hematológicas, ceguera de las ovejas, hemorragia interna, hematuria enzoótica bovina (HEB), entre otras (Alonso-Amelot, 1999).

Esta estrategia de defensa del *Pteridium* está relacionada directamente con los metabolitos secundarios producidos y esto se demuestra con los estudios realizados sobre la toxicidad de este helecho.

1.4.5.1.- Iludanos

Estudios realizados por Niwa y colaboradores (1983) demostraron la presencia del ptaquilósido en el helecho macho (figura 1.18), el cual parece ser el responsable de toda la sintomatología de la Hematuria Enzootica Bovina (HEB), pues al suministrarlo experimentalmente a bovinos por vía oral indujeron tanto lesiones vasculares como los carcinomas (Hirono et al., 1984).

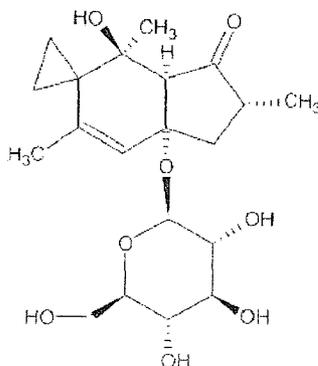


Figura 1.18: Estructura química del ptaquilósido.

1.4.5.2.- Ácidos fenólicos

El *Pteridium* sintetiza un gran número de metabolitos secundarios derivados de las rutas del ácido shikímico y ácido mevalónico, y de la derivatización de ciertos aminoácidos. Varios de los ácidos fenólicos son notorios entre los metabolitos secundarios aromáticos, algunos de los cuales muestran actividad anti-microbiana (Levin, 1971). De especial interés es el ácido clorogénico (figura 1.19), un éster químico del ácido caféico, ampliamente distribuido. Este compuesto inhibe el crecimiento de larvas de Lepidoptera cuando es incorporado a las dietas artificiales (Stevenson et al., 1993).

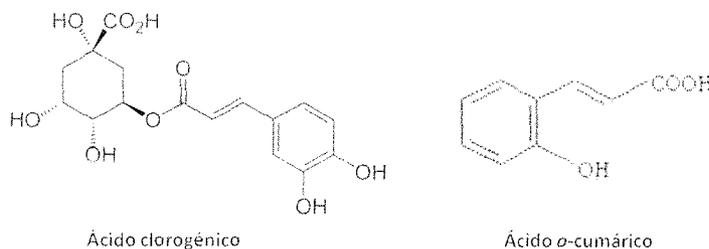


Figura 1.19: Algunos compuestos fenólicos encontrados en *Pteridium*.

El ácido *o*-cumárico y su producto de ciclización, la cumarina, han sido reconocidos también entre la fracción fenólica de *P. aquilinum* en una muestra de la especie neotropical *Pteridium caudatum* (Alonso-Amelot et al., 1995). Ambos grupos, ácidos carboxílicos aromáticos y cumarinas, son conocidas por actuar como fitotoxinas frente a otras plantas (Alonso-Amelot, 2002).

1.4.5.3.- Flavonoides

Por otra parte, los flavonoides son comunes en helechos (Wollenweber, 1989), y el helecho macho no es la excepción en la síntesis de series limitadas de flavonoles (Swain y Cooper-Driver, 1973; Imperato, 1995; Imperato, 1996; Imperato y Minutiello, 1997; Imperato, 1998). Estos compuestos son posiblemente bioactivos frente a microorganismos. En particular, la quercetina, considerada un inductor de tumores de la vejiga ileal urinaria en ratas, antineoplásico y un mutágeno para células procariontas y eucariotas, provoca la ruptura de la hebra de ADN en presencia de compuestos de cobre y de oxígeno, rearreglos de ADN y aberraciones cromosómicas (Alonso-Amelot, 2002).

1.4.5.4.- Taninos

En el entendimiento de los compuestos fenólicos, particularmente los polifenoles o taninos, se ha invertido considerable esfuerzo, debido a que las características de estos compuestos sustentan teorías de defensa, síntesis y acumulación preferencial de metabolitos secundarios. Estos compuestos son modelos dentro de la defensa cuantitativa siendo uno de los más observados en el estudio de la dinámica de defensa basada en carbono (Oliveros et al., 1999). Los taninos condensados derivados de la procianidina y de la prodefinidina son de gran importancia para la defensa química del helecho macho, debido a la gran cantidad almacenada en los frondes. Estos han sido un componente sustancial en las teorías de defensa de las plantas fundamentadas químicamente, ya que ellos se unen fuertemente a las proteínas de la dieta, y reducen la digestibilidad y el valor nutritivo de los tejidos de las plantas devorados por los insectos y vertebrados (Alonso-Amelot, 2002).

1.4.5.5.- Glicósidos cianogénicos

Otra línea de defensa química que hace frente a la herbivoría en el helecho es la actividad cianogénica, la cual es considerada fundamental en algunas plantas y artrópodos. Esta actividad deriva del glicósido mandelonitrilo prunasina, el cual está presente desde las

etapas tempranas de su desarrollo (Kofod y Eyjolfsson, 1966; Berti y Bottari, 1968; Hadfield y Dyer, 1988). La evolución de HCN ha sido probada en gametófitos y esporófitos jóvenes y la capacidad para liberar HCN por simple mordida del tejido del helecho, como ocurriría durante el masticado, es una clara indicación de que los genotipos cianogénicos también contienen prunasinas, esto es una enzima β -glucosidasa, que es almacenada en un compartimiento celular diferente, la cual cuando entra en contacto con la prunasina, consume la porción de glucosa produciendo la inestable mandelonitrilo α -cianohidrina. Este compuesto es luego transformado por la acción de una segunda enzima, oxinitrilasa, en HCN y benzaldehído por β -eliminación (figura 1.20). El aldehído es también tóxico para algunos organismos (Alonso-Amelot y Oliveros, 2000; Alonso-Amelot, 2002).

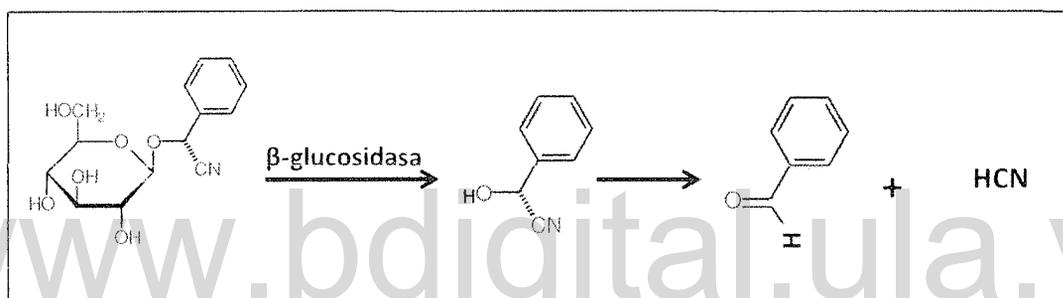


Figura 1.20: Secuencia de reacciones que conducen a la formación de ácido cianhídrico a partir de prunasina.

1.4.5.6.- Fitoecdisteroides

Entre los metabolitos secundarios en *Pteridium* producidos por la ruta del ácido mevalónico están los fitoecdisteroides (figura 1.21) (Takemoto et al., 1968; Takemoto et al., 1973). Estos compuestos son considerados hormonas de muda de artrópodos. Por lo tanto, las larvas de insectos fitófagos que son expuestas a cantidades críticas de ecdisteroides durante la alimentación en principio pueden estar en riesgo de mudar prematuramente y así poner en peligro su desarrollo hasta adultos exitosamente reproductivos. Han sido descubiertos en el *Pteridium* varios fitoecdisteroides: α -ecdisona, pterosterona, ponasterona A, y su glucósido, ponasterósido, estos cubren al *Pteridium* en la única planta vascular conocida que contiene tantos ecdisteroides (Alonso-Amelot, 2002).

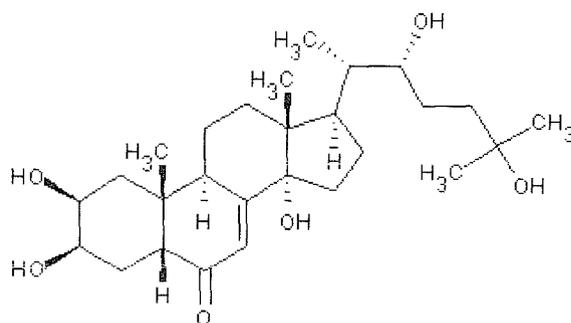


Figura 1.21: Estructura química de la α -ecdisona ($2\beta,3\beta,5\beta,22R$)2,3,14,22,25-Pentahidroxicolest-7-en-6-ona), un fitoecdisteroide encontrado en las pinas de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Kaplanis et al., 1967).

1.4.5.7.- Indanonas

Otra clase de terpenoides aislados del helecho macho está representado por un grupo de sesquiterpenil indanonas llamadas pterosinas y sus glicósidos, los pterosidos (Yoshihira et al., 1978; Fukuoka et al., 1978; Kuroyanagi et al., 1979).

Estos tienen estructuras moleculares relativamente simples, pero pueden guardar una relación cercana con la carcinogénesis del helecho. Tales compuestos no son exclusivos de las especies de helecho macho sino que están ampliamente distribuidas entre los helechos de la familia polypodiaceae (helechos epífitos). El hecho de que las pterosinas surjan de los iludanos reactivos, también presentes en *Pteridium*, aumenta la posibilidad de que algunas de ellas puedan ser artefactos. Sin embargo, las pterosinas del helecho macho han mostrado ser moderadamente citotóxicas y no hubo evidencia de que actúen como agentes alquilantes frente a compuestos citoplasmáticos o nucleares, un prerrequisito de carcinogénesis. Por lo tanto, no se puede mostrar que los extractos del helecho que contienen pterosinas (Pterosina A y B, ver figura 1.22) inducen la toxicidad observada en el ganado cuando los animales comen el helecho. Contrariamente a los taninos que se acumulan en las vacuolas celulares y otras partes de las plantas, las pterosinas en el helecho aparecen en altas concentraciones en los cayados jóvenes y declinan rápidamente con el crecimiento de los frondes hasta la madurez (Alonso-Amelot et al., 1992). Tal reducción vertical en la concentración de pterosinas en relación a la etapa fenológica puede indicar que son producidas temporalmente y desviadas a destinos todavía desconocidos dentro de la planta. Las pterosinas son posiblemente una fuente de carbono que es

consumida con el crecimiento del fronde en lugar de ser acumuladas junto con otros metabolitos secundarios en las vacuolas de las células. Posteriores pruebas bioecológicas de estas indanonas deberían arrojar luz sobre las funciones que cumplen las pterosinas en los helechos (Alonso-Amelot, 2002).

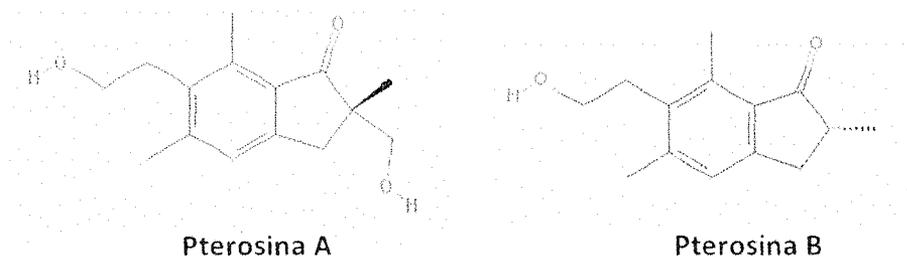


Figura 1.22: Indanonas que han sido reportadas en *Pteridium* spp.

1.5.- Metabolitos secundarios presentes en *Pteridium* spp., asociados a una actividad alelopática

El *Pteridium* spp., aun en climas que varían desde calientes hasta fríos y desde húmedos hasta secos, produce supresión del crecimiento de otras plantas lo cual no puede estar relacionado a la competencia por la luz, humedad del suelo, u otras formas de interferencia física. Su toxicidad, demostrada por experimentos de laboratorio, sugiere fuertemente la hipótesis que la alelopatía es el mecanismo que induce a esta planta al patrón tan extensivamente inhibitorio (Gliessman y Muller, 1972 y 1978).

En la Tabla 1.3 se muestra un resumen de algunos estudios realizados sobre alelopatía del *Pteridium* spp., demostrando que el efecto inhibitorio de los metabolitos secundarios está presente como parte de la defensa metabólica de este helecho.

De esta manera, Stewar (1975) en estudios realizados con los extractos acuosos de frondes senescentes de *Pteridium aquilinum* [L.] Kuhn var. *pubescens* Underw., encontró una reducción en la germinación de *Rubus parviflorus* Nutt. y *R. spectabilis* Pursh.. En los estudios de invernadero, la hojarasca del helecho también redujo la emergencia de las especies receptoras.

Tabla 1.3: Resumen de algunos estudios realizados sobre alelopatía de *Pteridium* spp.

Especie de <i>Pteridium</i>	Parte del helecho	Especie(s) receptora(s)	Actividad alelopática observada	Extracto relacionado con la actividad	País de estudio	Referencia
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn.	Frondes verdes, amarillos y senescentes	<i>Bromus rigidus</i> y <i>Avena fatua</i> (gramíneas)	Efecto tóxico – se sugiere la hipótesis de la alelopatía.	Extractos acuosos	Estados Unidos	Gliessman and Muller, 1972
<i>Pteridium aquilinum</i> [L.] Kuhn var. <i>pubescens</i> Underw.	Frondes senescentes	<i>Rubus parviflorus</i> Nutt. (Rosaceae), <i>R. spectabilis</i> Pursh. (Rosaceae) y <i>Pseudotsuga menziesii</i> [Mirb.] Franco (Pinaceae)	Reducción de la germinación de las especies receptoras	Extractos acuosos	Estados Unidos	Stewart (1975)
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn.	Suelo asociado con el helecho (zona de la rizósfera)	<i>Hordeum vulgare</i> (gramíneas)	Actividad fitotóxica, inhibición crecimiento de la raíz	Solución patrón de ácidos fenólicos (según composición en suelo)	Nueva Zelanda.	Glass, 1976
<i>Pteridium aquilinum</i>	Frondes en hojarasca	Hierbas en el campo	Inhibición y exclusión severa	Lixiviados producidos en el campo luego de las primeras lluvias de la estación de invierno (ácidos fenólicos)	Costa Rica	Gliessman y Muller (1978)
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	Frondes verdes	Plantas cultivadas: <i>Zea maíz</i> , <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Sesamum orientale</i> , <i>Capsicum annum</i> var. <i>groszum</i> , <i>Licopersicum esculentum</i> , <i>Brassica nigra</i> . Malezas: <i>Portulaca oleracea</i> , <i>Momordica charantia</i> , <i>Sida rhombifolia</i> , <i>Neurolaena lobata</i> , <i>Mikania cardifolia</i> .	Efectos inhibitorios sobre la germinación (de los extractos metanólicos).	Extractos acuosos y metanólicos.	México	Nava, et al., 1987
<i>Pteridium esculentum</i> (forst. f.) cockayne	Frondes verdes	<i>Eucalyptus obliqua</i> o <i>Eucalyptus radiata</i>	Redujo la supervivencia de las plántulas a la edad de 10 meses en un 50% (observaciones hechas en campo)	Competitividad del helecho (observaciones luego de chaguado y quema de la parcela estudiada)	Australia	Tolhurst y Turvey (1992)
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn.	Frondes verdes	<i>Populus tremula</i> L. y <i>Pinus sylvestris</i> L.	Efectos inhibitorios de los frondes verdes sobre la radícula, e incremento de la inhibición en los frondes senescentes.	Compuestos volátiles de los frondes, material fresco del helecho, y extractos acuosos.	Norte y Sur de Suecia	Dolling, et al., 1994.
<i>Pteridium arachnoideum</i> (Kaulf.) Maxon	Frondes verdes	<i>Guazuma ulmifolia</i> , <i>Schinus terebinthifolia</i> , <i>Miconia cinnamomifolia</i> , <i>Tabebuia heptaphylla</i> and <i>Enterolobium contortisiliquium</i> , entre otras.	Efecto inhibitorio de la germinación de semillas y morfología de las plantas.	Lixiviados (acuosos).	Brasil	Silva y Belinato, 2010.
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn.	Frondes verdes y rizomas, y hojarasca y suelo.	Vegetales	Inhibición germinación de semillas y de la elongación del hipocótilo y radícula (por los frondes verdes)	Extractos acuosos.	Taiwan	Wang et al., 2011
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn.	Extractos acuosos de helecho	<i>Festuca arundinacea</i> (gramínea) y <i>Trifolium pratense</i> L. (Leguminoseae)	Efecto inhibitorio sobre germinación de las semillas	Extracto acuoso.	Croacia	Kutnjak et al., 2011

Por su parte, el análisis químico de varios tipos de suelo realizado por Whitehead (1964), reveló la presencia de ácidos fenólicos (ácido p-hidroxibenzoico, vanílico, p-hidroxicinámico, ferúlico, en concentraciones de 10^{-5} M) en la solución del suelo asociado con *Pteridium aquilinum* (L. Kuhn). Posteriores estudios hidropónicos usando la composición de ácidos fenólicos reportadas previamente en solución de CaSO_4 , sobre cebada (*Hordeum vulgare*), mostraron una severa inhibición del crecimiento radicular (Glass, 1976).

Nava y colaboradores (1987), encontraron que los extractos acuosos de frondes verdes no tuvieron efectos significativos sobre las especies receptoras (plantas cultivadas y malezas), mientras que los extractos metanólicos inhibieron fuertemente la germinación en mostaza (*Brassica nigra*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*). Sin embargo, con *Pteridium esculentum* (forst. f.) las observaciones hechas en campo, demostraron que esta especie es competitiva con las especies de eucalipto, ya que luego de 10 meses de edad, la superpervivencia de estas plantas fue de un 50% (Tolhurst y Turvey, 1992). Los autores indican que la competencia del helecho fue predominantemente por la luz, lo cual consideran redujo el vigor de las plántulas de eucalipto haciéndolas más susceptibles a la sequía, heladas, insectos y hongos. Así mismo, demostraron con experimentos *in vitro*, que los lixiviados (de los frondes verdes) colectados en campo, no afectaron la germinación de las semillas de estas especies de eucalipto.

Nuevamente, se reportó que los frondes en descomposición (senescentes y hojarasca) parecen ejercer un efecto inhibitorio mayor que los macerados acuosos de frondes verdes de *Pteridium aquilinum* (Dolling et al., 1994). Se observó efecto inhibitorio durante la estación de crecimiento del helecho, cuando éste todavía es inmaduro y vulnerable a la interferencia de otras especies. Un incremento posterior de esta inhibición, durante la etapa de senescencia y descomposición del helecho, sugirió que hay una transformación de los productos naturales o una acumulación de compuestos inhibitorios.

Recientemente, en estudios de campo realizados en Brasil por Silva y Belinato (2010), evaluando el efecto de los lixiviados del *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon, sobre la germinación y morfología de las plántulas de 11 especies de árboles nativas (unas pioneras y otras secundarias en proyectos de reforestación), así como de la supervivencia y

crecimiento después de 12 meses, se reveló que estos lixiviados ejercieron un efecto inhibitorio sobre la germinación de semillas y morfología de las plántulas, siendo las pioneras aparentemente más resistentes que las especies secundarias.

Finalmente, también los estudios recientes de Wang y colaboradores (2011) y de Kutnjak y colaboradores (2011) con los extractos acuosos de frondes verdes de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, demostraron los efectos inhibitorios sobre la germinación de semillas y la elongación de la radícula. Esta actividad observada en todas las especies de *Pteridium* que han sido reportadas por diferentes autores, se ha asociado principalmente a la presencia de taninos, ácidos fenólicos y sus derivados, en los lixiviados y tejidos internos de los frondes de *Pteridium* spp.

1.5.1.- Fenólicos y taninos

Los fenólicos son unos de los muchos metabolitos secundarios implicados en la alelopatía. Los fenólicos y sus parientes oligoméricos y poliméricos, los taninos, son muy estudiados ya que su presencia y concentración en los tejidos de las plantas han sido relacionadas con la reducción en las preferencias de herbivoría, susceptibilidad a la herbivoría por patógenos, bloqueo selectivo de infecciones y alelopatía (Alonso-Amelot et al., 2004).

1.5.1.1.- Ocurrencia

Los metabolitos fenólicos son ubicuos en las briófitas, helechos, gimnospermas y angiospermas. Ellos tienden a acumularse dentro de las células de las plantas de madera y corteza, parénquima y epidermis de la hoja, cutícula, flores, frutos, semillas y exudados (Alonso-Amelot, 2011).

1.5.1.2.- Estructura química y biosíntesis

Los fenólicos en general pueden existir como unidades monoméricas de peso molecular moderado, en agregaciones de unidades monoméricas repetitivas alrededor de una molécula de carbohidrato central, auto ensambladas a través de enlaces C-O y C-C en arreglos oligoméricos, o aun como polímeros de alto peso molecular. El término fenólicos deriva del compuesto base: el fenol (hidroxibenceno). Todos los fenólicos contienen este fragmento molecular al cual varios grupos oxigenados y carbonados pueden unirse, suministrando considerable complejidad, figura 1.23 (Alonso-Amelot, 2011).

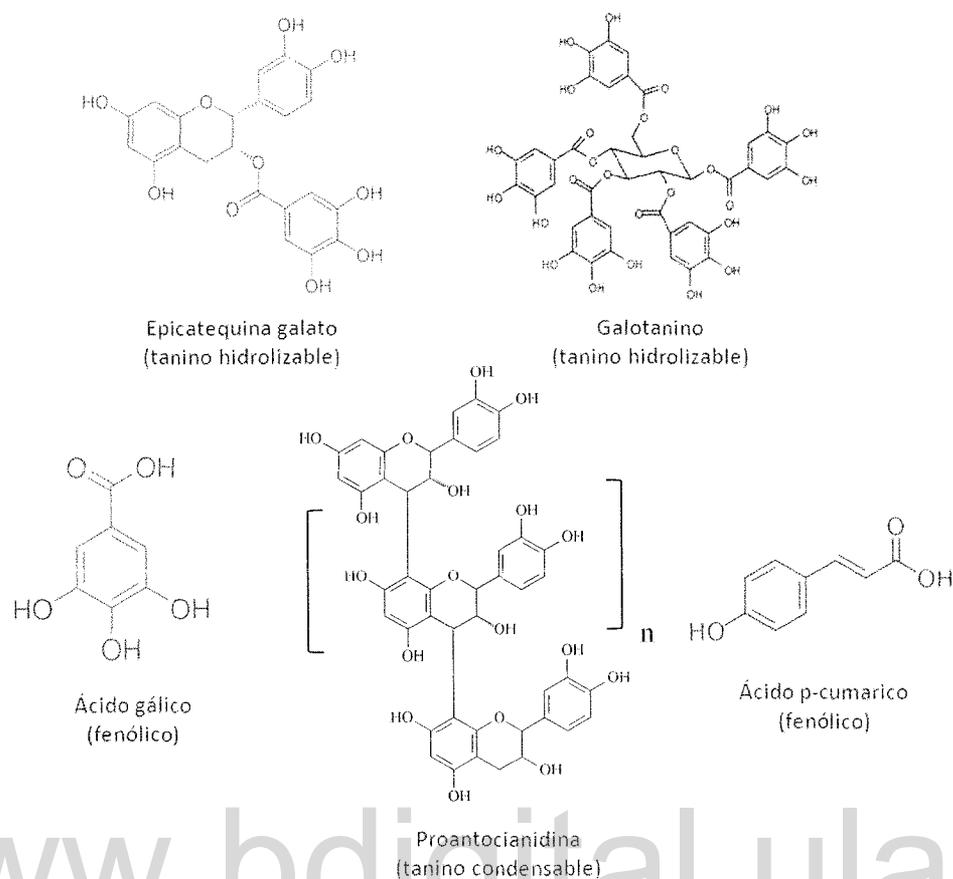


Figura 1.23: Algunos fenólicos y taninos comunes.

1.5.1.3.- Actividad fitotóxica descrita para los fenólicos y taninos

En cuanto a la actividad fitotóxica de los fenólicos y taninos, se ha descrito que los compuestos fenólicos ácido protocatecuico, vanilina, ácido ferúlico y ácido p-cumárico están presentes en gran cantidad en los tallos de *Lespedeza cuneata*. Estos compuestos demostraron afectar el crecimiento de maíz, mostrando efectividad en la inhibición de la actividad de la auxina (Langdale, 1970). Así mismo, el trabajo de Whitehead (1964) y Glass (1976), citado al inicio de este apartado, demuestra el efecto de algunos ácidos fenólicos (ácido p-hidroxibenzóico, vanílico, p-hidroxicinámico, ferúlico) lixiviados y encontrados en el suelo de la rizósfera, asociado con el *Pteridium*, sobre el crecimiento radicular de gramíneas.

Oliveros (1998) le atribuye a los taninos y fenólicos propiedades inhibitorias de la germinación de las semillas y crecimiento de tallo y raíz en varias especies de plantas de

importancia agrícola en la región de los Andes Venezolanos, lo cual se confirmó con los experimentos de laboratorio llevados a cabo en *Pteridium caudatum* (Jiménez, et al., 2008).

1.5.2.- Cumarina

La actividad fitotóxica observada en el *Pteridium*, asociada con un potencial alelopático también pudiera ser atribuida en parte a la cumarina, la cual fue aislada junto con el ácido *o*- cumárico en el *Pteridium caudatum* (Alonso-Amelot et al., 1995).

1.5.2.1.- Ocurrencia

La cumarina fue aislada por primera vez por Vogel en 1820 mediante la extracción de semillas de la tonka o sarrapia (*Dipterix odorata* Wild., Fabaceae) y es reconocida por su aroma dulce de heno. Ha sido identificada en un gran número de plantas pertenecientes a diferentes familias, de esta manera es bien conocida en trébol dulce (*Melilotus alba* y *M. officinalis*), asperilla (*Asperula odorata*), hojas de vainilla (*Trilisa odoratissima*), granos de vainilla (*Vanilla planifolia*), aceites esenciales de casia (*Cinnamorum cassia*) y lavanda (*Lavendula officinalis*), y en bálsamo del Perú (*Myroxylon pereirae*) (IARC 77, 2000).

En la familia Dennstaedtiaceae, además de haber sido aislada en *P. caudatum*, también ha sido observada en el helecho *Dennstaedtia punctilobula* (Bohm y Tryon, 1967; Dustin y Cooper-Driver, 1990; Alonso-Amelot et al., 1995). Un análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) del agua colectada bajo frondes, del helecho verde de la especie *P. caudatum*, revela la presencia de cumarina como el componente mayoritario (Alonso-Amelot, M. E. et al.; Observaciones no publicadas).

Recientemente seis cumarinas secundarias han sido aisladas de las frutas y la corteza de los tallos de *Calophyllum dispar* (Clusiaceae). El género *Calophyllum*, el cual comprende 200 especies, esta ampliamente distribuido en el bosque húmedo tropical donde varias especies son usadas en la medicina popular. Algunos miembros importantes de las cumarinas han sido aislados de fuentes microbianas, por ejemplo, novobiocina y cumermycina de *Streptomyces*, y aflatoxinas de las especies de *Aspergillus* (Lacy y O'Kennedy, 2004).

1.5.2.2.- Estructura química y biosíntesis

La estructura de la cumarina (1,2-benzopirona) consiste de un anillo aromático unido a un anillo de lactona condensada (figura 1.24) (Mirunalini y Krishnaveni, 2011).

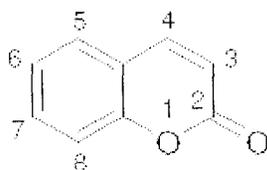


Figura 1.24: Estructura de la cumarina (1,2-benzopirona).

Murray y colaboradores (1982) propusieron que la forma *cis* del ácido *o*-hidroxicinámico lactoniza espontáneamente para formar la cumarina. Además se sugirió que la forma *trans* del mismo ácido, puede ser también precursor de la cumarina. Esto se cree que ocurra a través de la glucosilación del hidroxilo en el ácido *o*-cumárico. Ahora bien la glucosilación de ese ácido ha sido demostrada en los extractos libres de células de la *Molilotus alba* (Dustin y Cooper-Driver, 1990).

Además, existen datos convincentes de que el ácido *trans*- 2- glucosiloxicinámico es un intermediario en la formación de la cumarina en la *Hirochloe odorata* (Brown, 1981). Así se propone que la conversión se llevaría a efecto en la forma planteada en la figura 1.25 (Murray, et al., 1982).

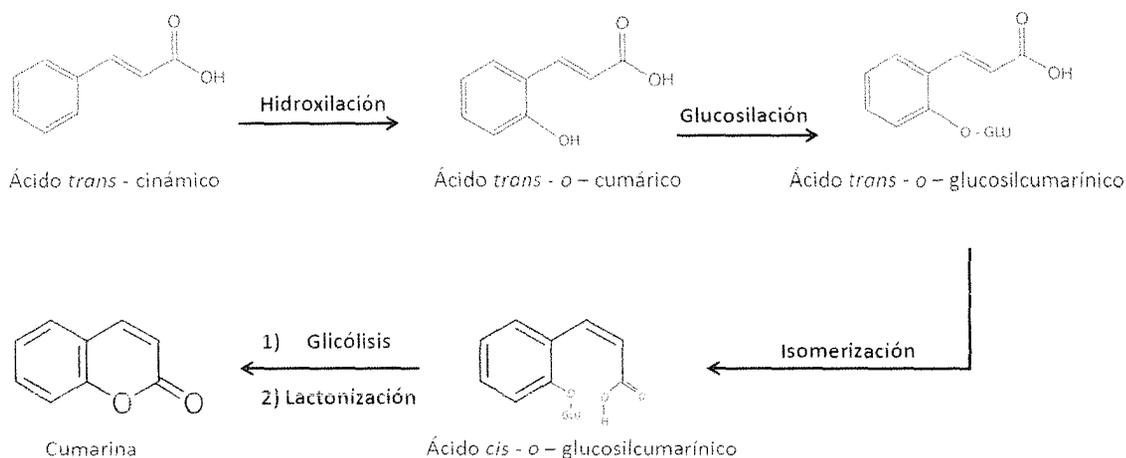


Figura 1.25: Lactonización de ácido *o*-cumárico a cumarina (Murray et al., 1982).

Está bien establecido que las cumarinas derivan de la vía de la L-fenilalanina por la ruta de los fenilpropanoides (como el ácido *trans*-cinámico) y que su síntesis involucra los primeros tres pasos catalíticos de la ruta conduciendo a el 4-cumaroyl CoA activado (figura 1.26). Esto incluye la 4-hidroxilación del ácido cinámico catalizado por un citocromo P450, la *trans*-cinamato 4-hidroxilasa, lo cual constituye posiblemente el paso limitante de la velocidad en la primera parte de la ruta. A pesar de la intensiva investigación casi nada es conocido acerca de los genes y enzimas específicamente involucrados en la biosíntesis de cumarinas (Sher, 2009).

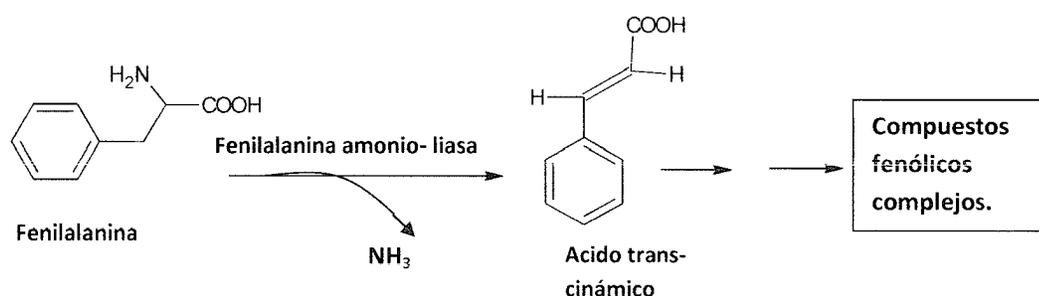


Figura 1.26: Desaminación de fenilalanina a ácido *trans*-cinámico (tomado de Taiz y Zeiger, 1991).

1.5.2.3.- Derivados cumarínicos

Un amplio espectro de derivados cumarínicos (presentes en forma libre o como glucósidos) han sido encontrados en muchas plantas principalmente como metabolitos secundarios (IARC 77, 2000).

Algunos de estos incluyen (figura 1.27): la umbelliferona (7-hidroxicumarina), esculetina (6,7-dihidroxicumarina), herniarina (7-metoxicumarina), psoraleno e imperatorina, bradifacouma, fumarina, difencouma, aurapteno, ensaculina, escopoletina, warfarina (Mirunalini y Krishnaveni, 2011).

Desde el descubrimiento de la cumarina, más de 1000 derivados han sido investigados como derivados cumarínicos de ocurrencia natural aislados de más de 800 especies de plantas. Estos deben sus nombres al "coumarou", el nombre típico de las semillas de tonka (Lacy y O'Kennedy, 2004).

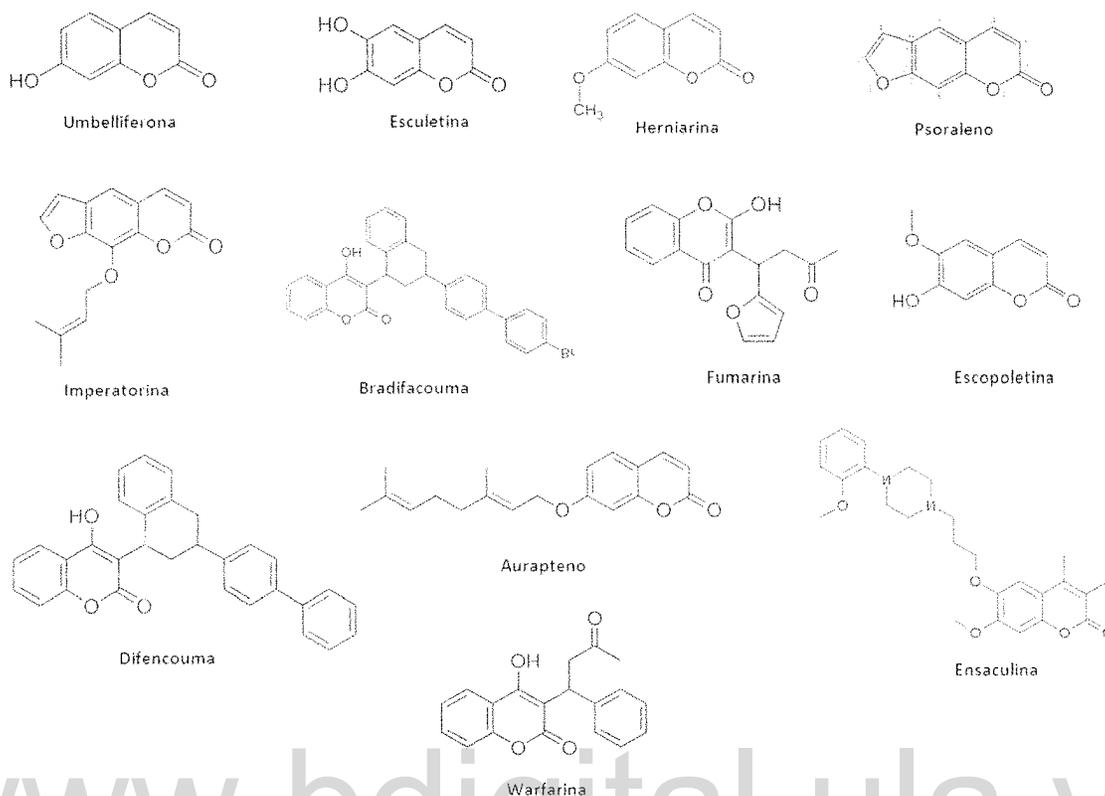


Figura 1.27: Algunos derivados cumarínicos comunes.

Las cumarinas pueden ser categorizadas como sigue (tabla 1.4):

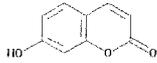
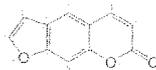
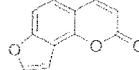
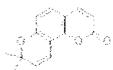
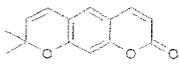
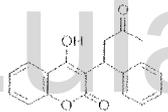
- **Simples:** Estos son los derivados hidroxilados, alcoxilados o alquilados sobre el anillo bencénico del compuesto base de la cumarina junto con sus glicósidos.
- **Furanocumarinas:** Estos compuestos consisten de un anillo furano de cinco miembros unido al núcleo cumarínico, dividido en los tipos lineal y angular con sustituyentes en una o ambas de las posiciones benzoicas restantes.
- **Piranocumarinas:** Los miembros de este grupo son análogos de las furanocumarinas, pero contienen un anillo de seis miembros.
- **Cumarinas sustituidas en el anillo pirona.**

(Ojala et al., 2000).

La mayoría de los derivados cumarínicos tienen al menos, un átomo de oxígeno adicional en una o más de las seis posiciones disponibles, con aproximadamente 35 derivados

oxigenados en la posición siete. Por esta razón, la 7-hidroxycumarina también conocida como umbelliferona, es frecuentemente considerada la “precursora” de las cumarinas más complejas (Trenor et al., 2004).

Tabla 1.4: Los cuatro principales subtipos de cumarinas (tomada y adaptada de Lacy y O’Kennedy, 2004).

Clasificación	Características	Ejemplos
Cumarinas simples	Hidroxiladas, alcoxiladas o alquiladas sobre el anillo de benceno.	 7- hidroxycumarina
Furanocumarinas	Anillo furano de 5-miembros unido al anillo de benceno. Lineal o Angular.	 Psoraleno  Angelicina
Piranocumarinas	Anillo pirano de 6-miembros unido al anillo de benceno. Lineal o Angular.	 Seselina  Xantiletina
Cumarinas sustituidas en el anillo pirona	Sustitución sobre el anillo de pirona, frecuentemente en las posiciones de los carbonos 3 y 4.	 Warfarina

1.5.2.4.- Actividad fitotóxica descrita para la cumarina

En cuanto a su función ecológica, las cumarinas son sintetizadas en casi todas las plantas superiores siendo encontradas sobre la superficie de las hojas, semillas y frutos. Luego de dejar estos órganos, las cumarinas probablemente son difundidas en el suelo y afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. La cumarina, el compuesto más simple de la clase es capaz de promover o inhibir el crecimiento de las plantas, la respuesta observada es específica de la especie y dependiente de la concentración (Ojala et al., 2000).

Dornbos y Spencer (1990), reportaron que la cumarina inhibió la germinación y la longitud de las plántulas receptoras (*Medicago sativa*, *Lolium multiflorum* y *Abutilon theophrasti*), observándose que la longitud de las plántulas decreció sigmoidalmente con el aumento

logarítmico de la concentración de cumarina. Así mismo, Pergo y colaboradores (2008), encontraron que una solución 500 μM de cumarina tuvo poco efecto sobre la germinación y crecimiento de *Senna obtusifolia* L., *Euphorbia heterophylla* L., *Ipomoea grandifolia* L., cuando se comparó con el efecto que tuvo sobre *Bidens pilosa* L. Sobre esta última, la cumarina causó una inhibición que fue dependiente de la dosis cuando se estudió en el rango de concentraciones que va de 10 – 100 μM .

La cumarina, además, parece disminuir la respiración y la fotosíntesis en plantas por inhibición del transporte de electrones, afecta la actividad de las enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno (probado en cultivos en suspensión de células de zanahoria), inhibe la elongación, división y diferenciación celular y rizogénesis. Uno de los efectos más obvios de la cumarina es la inhibición del crecimiento radicular y la modificación de la morfología e histología de la raíz (figura 1.28) (Ojala et al., 2000; Hossain et al., 2008).

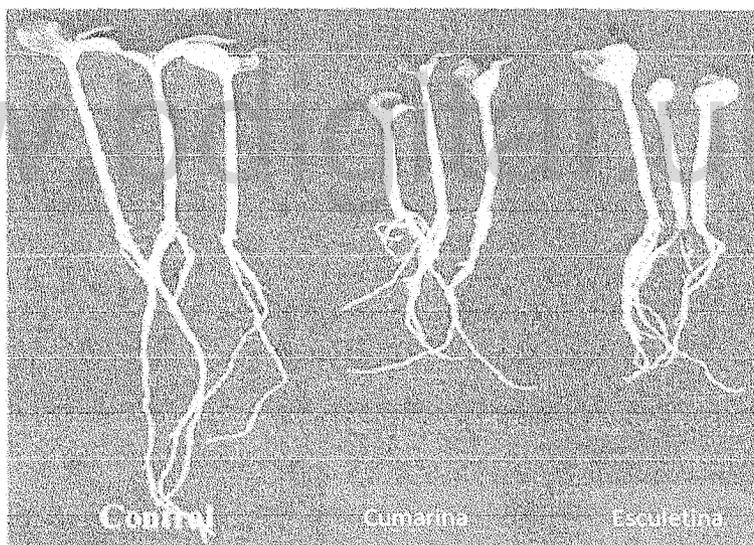


Figura 1.28: Efecto de la cumarina y esculetina sobre el crecimiento de plántulas de calabaza. Las plántulas fueron tratadas con soluciones de 50 μM y la data fue tomada seis días después de la germinación (tomado de Hossain et al., 2008).

Es bien conocido que los cambios en la estructura de la raíz y distribución están usualmente acompañados por cambios en la nutrición mineral, así la cumarina podría afectar la absorción de nutrientes minerales. Abenavoli y colaboradores (2001) reportaron

los efectos de la cumarina sobre el crecimiento y anatomía de la raíz, la absorción y translocación de nitrato, así como la respiración en plántulas de *Triticum durum* (cv. Simeto). Los resultados indicaron que la cumarina, en un rango de concentraciones de 25 – 1000 μM , disminuyó la velocidad de crecimiento relativa de las raíces e incrementó el área de los vasos radiculares. Dentro de este rango de concentraciones la cumarina, por si sola, no afectó significativamente la absorción de nitrato. Pero en las plántulas expuestas simultáneamente a 100 μM de cumarina y 50 μM de nitrato, la absorción de nitrato fue estimulada significativamente y en presencia de nitrato, aun la concentración más baja de cumarina probada estimuló significativamente la translocación de nitrato de la raíz al tallo.

Los efectos de la cumarina a concentraciones bajas, sobre el tamaño de los vasos radiculares, podrían explicar esta observación. Estos autores indican que la cumarina es un compuesto con múltiples objetivos fisiológicos y que sus efectos son generalmente estimulatorios a bajas concentraciones e inhibitorios a altas concentraciones, como también lo han mencionado otros autores (Jansson et al., 1980; Brown, 1981).

En estudios pasados, también se sugirió que la inhibición del crecimiento puede ser causada por la interferencia, inducida por la cumarina, con el metabolismo de la auxina y la distribución subcelular (Goren y Tomer, 1971). Sin embargo, en la búsqueda de conocer el mecanismo de acción de la cumarina en las interacciones planta – planta a través del medio ambiente, un estudio reciente realizado por Yamamoto (2009), demuestra como la cumarina en *Anthoxanthum odoratum* L. es incorporada al suelo desde los residuos vegetales de esta planta, indicando que ésta entra al suelo fácilmente después de la lluvia y para dos tipos de suelo probados, la presencia de microorganismos está relacionada con la desaparición de cumarina del suelo. Es de interés entonces, conocer los posibles productos de degradación de la cumarina en el sistema suelo y si estos poseen algún tipo de fitotoxicidad que pueda reforzar el potencial alelopático de la cumarina.

Pese a la gran cantidad de investigación existente, la presencia de cumarina en *Pteridium* es un hallazgo reciente y la dinámica de ésta durante el desarrollo fenológico, así como su función ecológica en *Pteridium caudatum* aun esta por ser estudiada.

1.6.- Justificación del trabajo

Este trabajo se enmarca dentro de una de las líneas de investigación que el Grupo de Química Ecológica (GQE) desarrolla, cuyo objetivo es el estudio de las plantas del estado Mérida de importancia ecológica y agropecuaria. Se enfoca la atención en los componentes químicos mayoritarios que éstas presentan y su función como mediadores de las interacciones entre plantas por medio del fenómeno alelopático, ya sea por un efecto fitotóxico o estimulante sobre el desarrollo y crecimiento de una especie de planta o comunidades de ellas.

El género *Pteridium* ha sido ampliamente estudiado en el GQE y en diferentes laboratorios del mundo, con la finalidad de comprender su comportamiento ecológico y así poder establecer estrategias para su control, ya que es una maleza de gran impacto negativo en la agricultura, pero que sin embargo cumple una función ecológica en los ecosistemas donde se desarrolla.

1.7.- Hipótesis

La presencia de cumarina en *Pteridium caudatum*, es parte de la defensa química que esta especie pudiera presentar como estrategia competitiva ante otras especies de plantas, y actúa en conjunto con otros metabolitos secundarios como las indanonas, los ácidos fenólicos y taninos, cumpliendo en conjunto una función alelopática.

1.8.- Objetivos

1.8.1.- Objetivo General

Evaluar el contenido de cumarina y otros metabolitos de interés fitotóxico en los extractos acuosos y orgánicos de frondes de *Pteridium caudatum* y su relación con el potencial alelopático que este helecho presenta en su hábitat natural.

1.8.2.- Objetivos Específicos

1) Determinar la presencia de cumarina y fenólicos totales en los extractos acuosos y orgánicos obtenidos a partir de esporas y rizomas de *P. caudatum*.

2) Optimizar una metodología para la extracción de cumarina con solventes orgánicos de *P. caudatum*, de frondes en sus diferentes etapas fenológicas y también en esporas y rizomas, si la cumarina es detectada en estos tejidos.

3) Determinar el contenido de cumarina en macerados acuosos y extractos orgánicos de *P. caudatum* en sus diferentes etapas fenológicas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

4) Determinar el contenido de fenólicos totales en macerados acuosos y extractos orgánicos de *P. caudatum* en sus diferentes etapas fenológicas mediante Espectroscopia Ultravioleta.

5) Determinar el contenido de las indanonas (pterosinas A y B) en los macerados acuosos de *P. caudatum* que están presentes en la primera y segunda etapa fenológica de desarrollo del helecho mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

6) Determinar la presencia y contenido de cumarina en muestras de suelo circundante al *P. caudatum* en la parcela en estudio mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

7) Determinar la actividad fitotóxica de los macerados acuosos de los individuos de *P. caudatum* muestreados en las diferentes etapas fenológicas, utilizando *Lactuca sativa* como especie receptora.

8) Determinar la posible absorción y translocación de cumarina a los tejidos (tallo, raíz, hojas) de *Lactuca sativa* como especie receptora en crecimiento hidropónico.

CAPITULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1.- Materiales, equipos, reactivos y métodos de análisis

2.1.1.- Materiales

Capsulas de *petri*.

Pesa sustancias.

Espátulas.

Fiolas de 25, 50, 150, 250 y 500 mL.

Inyectadoras de 12 y 20 mL.

Matraces aforados de 500, 250, 100, 50, 25 y 10 mL.

Pipetas volumétricas de: 1, 2, 5, 10, 20 y 50 mL.

Pipetas graduadas: 1, 5 y 10 mL.

Embudos de vidrio.

Inyectadora Hamilton de 25 μ L.

Bolsas herméticas con cierre deslizable (Ziploc, 27 x 28 cm).

Sep-Pak Cartridges C18, para fase reversa (Marca WATERS = Sep-Pak C18).

2.1.2.- Equipos

Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), Waters 600E, Millipore, USA.

Detector UV para HPLC, Shimadzu, con arreglo de diodos.

Inyector universal para HPLC, Waters U6K, Millipore.

Columna radial de sílica modificada para fase reversa Resolve C18 de 5 μ m, 10 x 0.8 cm,

Waters, Millipore, USA, con su correspondiente Pre-columna Waters Sentry.

Balanza analítica, HR-200, AND A&D Weighing, USA.

Cartuchos de fase reversa C18, Sep-Pak CLASSIC (Waters, Millipore).

Espectrofotómetro UV-Visible, Hewlett Packard 8453, USA.

Rotavapor Cole-Parmer.

2.1.3.- Reactivos

Tabla 2.1: Características y observaciones de los reactivos.

REACTIVO	ESTADO	FUENTE	PUREZA (%)	OBSERVACIONES
Sulfato amónico férrico	Sólido	SIGMA	98,5 – 102	Dodecahidratado
Ferricianuro de potasio	Sólido	SIGMA	99	-
Tanino de quebracho*	Sólido	Ann Hagerman**	Purificado en el laboratorio	Aproximadamente 100% de pureza
Ácido clorhídrico	Líquido	RIEDEL-DE HAEN AG	37	Grado Analítico
Cumarina	Sólido	SIGMA	> 99	
Pterosina A***	Sólido	Aislado en el GQE	Purificado en el laboratorio	Aproximadamente 99% de pureza
Pterosina B***				
Metanol	Líquido	Fisher ChemAlert	99,9	Grado HPLC
Acetonitrilo	Líquido	Mallingkrodt ChromAR	99,9	Grado HPLC
Agua MilliQ	Líquido	Laboratorio de Instrumental	18,2 MΩ	-
Helio	Gas	AGA	99,995	-
Agar powder	Sólido	HIMEDIA	Extra puro	-
Linurón®	Herbicida Comercial Líquido			

* Nombre IUPAC tanino de quebracho: [3,5-dihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi-6-[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oximetil]oxan-4-il] 3,4,5-trihidroxibenzoato.

** Departamento de Química y Bioquímica Universidad de Miami, USA. Purificado según notas personales.

***Nombre IUPAC Pterosina B: (R)-2,3-Dihidro-6-(2-hidroxietil)-2,5,7-trimetil-1H-inden-1-ona y Pterosina A: (2s)-6-(2-hidroxietil)-2-(hidroximetil)-2,5,7-trimetil-1-indanona

NOTA: Aquí se usara también diclorometano (DCM), etanol (EtOH) y metanol (MeOH) destilados y purificados en el laboratorio.

2.1.4.- Metodología de análisis cromatográfico

Tabla 2.2: Condiciones para el análisis cromatográfico por HPLC de los macerados acuosos* y de los extractos orgánicos de frondes de *Pteridium caudatum* y de los extractos orgánicos de suelo.

Parámetros de análisis		Condiciones
Método de elusión		Isocrático
Composición de Eluentes (%)	Agua	55
	Acetonitrilo	45
Flujo (mL/min)		1
Volumen de inyección (µL)		20
Tiempo de retención de cumarina (min)		6,97
Longitud de onda (λ) de análisis (nm)		275
Columna		C18 Resolve 5 micras

*Condiciones optimizadas en el GQE (Buendía, 2009).

2.2.- Diseño del muestreo

2.2.1.- Sitio de muestreo

Se seleccionó un área de 182 m², en una ladera de montaña, perteneciente a la Universidad de Los Andes y conocida como aula ambiental, localizada a 2 Km al norte de la ciudad de Mérida, al Occidente de Venezuela. En esta parcela se ubica el tanque de agua del núcleo de la Hechicera de la universidad. Se encuentra a aproximadamente 1990 msnm, y está fuertemente colonizada con la especie *P. caudatum*, caracterizándose por ser una población homogénea de esta especie de helecho (ver anexo A, figura A.1).

2.2.2.- Desarrollo del muestreo

2.2.2.1.- Seguimiento del desarrollo de una población seleccionada de *P. caudatum*

Para realizar un muestreo adecuado de los frondes en la población seleccionada de *P. caudatum*, se determinó la longitud del raquis y del estipe de la población normalizada para cada etapa fenológica. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

a) Se realizó la limpieza de la parcela, mediante el corte total de la vegetación presente al ras del suelo.

b) Una vez que comenzaron a emerger los cayados (1era etapa fenológica) de *P. caudatum*, se seleccionaron 60 de ellos, se marcaron y se siguió su crecimiento midiendo la longitud del raquis (Lr) y del estipe (Ls) cada tres días hasta que alcanzaron su completa madurez. Se define como Lr la longitud total del eje central del fronde desde el nivel del suelo y como Ls la longitud desde ese mismo nivel hasta llegar a la ramificación de la primera pina. Las medidas se realizaron en horas de la mañana (entre las 8 am y las 12 m) hasta que los frondes alcanzaron su desarrollo completo (Alonso-Amelot y Calcagno-Pissarelli, 2000) (ver anexo A, figura A.2).

c) El tratamiento de datos se realizó con el Microsoft Excel 2007 y el programa Microcal Origin V5.0 (Microcal Software Inc., One Roundhose Plaza, Northampton, Massachussetts) para:

- Determinar la etapa fenológica donde ocurrió la mayor velocidad de elongación del *P. caudatum*, graficando velocidad de crecimiento en cm/día Vs. tiempo de emergencia en días.

- Construir los histogramas por etapa fenológica de Lr (longitud de raquis en cm) Vs. número de individuos que poseen una dada Lr (realizando los ajustes de la curva gaussiana) para conocer las características de la población normal en cada etapa fenológica para su posterior muestreo y análisis (Anexo A: figura A.3).

2.2.2.2.- Muestreo

Cuando la población alcanzó cada etapa fenológica, y conociendo el rango de Lr de la población normal, se procedió a tomar las muestra a analizar: 10 individuos de 1era etapa y el primer par de pinas de 10 individuos de *P. caudatum* representativos de cada etapa fenológica (2da, 3era y 4ta etapa). Se colocó cada muestra en bolsas herméticas con cierre deslizable (Ziploc, 27 x 28 cm), previamente identificadas y pesadas. Las muestras se conservaron en una cava para su desplazamiento al laboratorio donde se inició su tratamiento para la extracción y determinación del porcentaje de humedad de los frondes. También se muestreó el primer par de pinas de 10 individuos en estado de senescencia (Senesc) y se tomaron 10 muestras de frondes en estado de hojarasca (Hojaras) de la parcela. El muestreo completo se llevó a cabo durante todo el período de desarrollo de la población seleccionada. El porcentaje de humedad se determinó colocando muestras pesadas de cada individuo en un secador de plantas (con flujo de aire a 37 °C) hasta un peso constante.

Así mismo, se tomaron 3 muestras de suelo el día del muestreo de cada etapa fenológica del helecho. Estas fueron colectadas en 3 posiciones distintas dentro de la parcela, esto es, a lo largo de la pendiente del terreno y entre 9 – 15 centímetros de profundidad con un diámetro no mayor a 30 cm. A estas muestras también se les determinó el porcentaje de humedad.

2.2.3.- Medición de las condiciones climatológicas

En colaboración con la Estación Experimental de Santa Rosa de la ULA, localizada a 1,10 Km de la zona de muestreo, se registraron las condiciones climatológicas correspondientes a precipitación y temperatura máxima y mínima durante el período de desarrollo de la población de *P. caudatum*. Estas mediciones se realizaron diariamente desde el mes de mayo de 2010 hasta el final del muestreo en marzo del 2011, en horas de la mañana (entre 7:00 am – 11:00 am) (Anexo A: figura A.4).

2.3.- Preparación de los extractos vegetales a ser analizados

2.3.1.- Protocolo de obtención de los macerados acuosos (MA) de frondes, esporas y rizomas de *P. caudatum*

2.3.1.1.- Frondes

El procedimiento utilizado se basa en los estudios realizados previamente por Buendía (2009), donde se establece el tiempo óptimo de obtención del MA de 24 horas, en una relación de 3 gramos de material vegetal fresco por cada 50 ml de solución a preparar (Anexo B, figura B.1).

Los MA de frondes de *P. caudatum* fueron preparados de acuerdo a la metodología siguiente (Buendía, 2009), denominada MA-1 (figura 2.1):

Se coloca cada muestra de cayado o pinas, según etapa en estudio, de *P. caudatum* (3 g) en una fiola con 40 ml de agua cada una. Se macera sin agitación durante 24 horas. Se filtra por succión, se transfiere a un matraz aforado de 50 ml y se lleva al aforo con los lavados sucesivos del material vegetal extraído. Para la preparación de la alícuota de inyección se aplica el método de elusión del Sep-Pak C18 según el cual el volumen de sembrado del MA es de 10 ml y posteriormente se realizan eluciones sucesivas con 10 mL de soluciones de proporción metanol/agua creciente en este orden:

F1 = 5% MeOH

F2 = 90% MeOH

F3 = 100% MeOH

La fracción enriquecida en el metabolito es F2 (90% MeOH) (Anexo B, figura B.2).

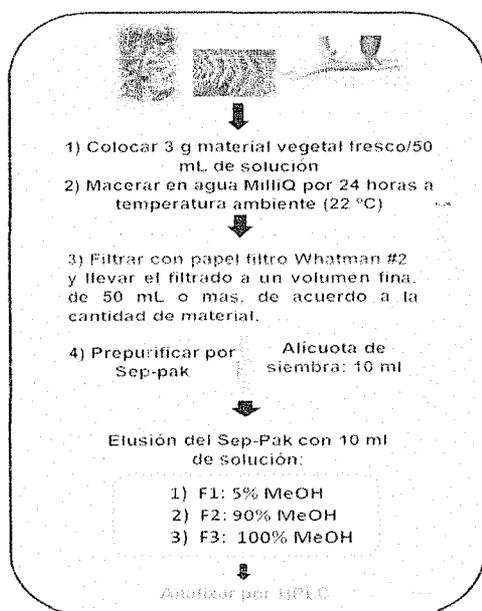


Figura 2.1: Metodología para la obtención de los MA de *P. caudatum*, MA-1 (Buendía, 2009).

Considerando que los MA no presentan una matriz compleja se propuso una nueva metodología que mantiene el tratamiento de preparación y sustituye la prepurificación usando cartuchos Sep-Pak C18 por una filtración simple usando papel Millipore de 0,45 μm de tamaño de poro. Esta metodología es denominada MA-2 (Figura 2.2).

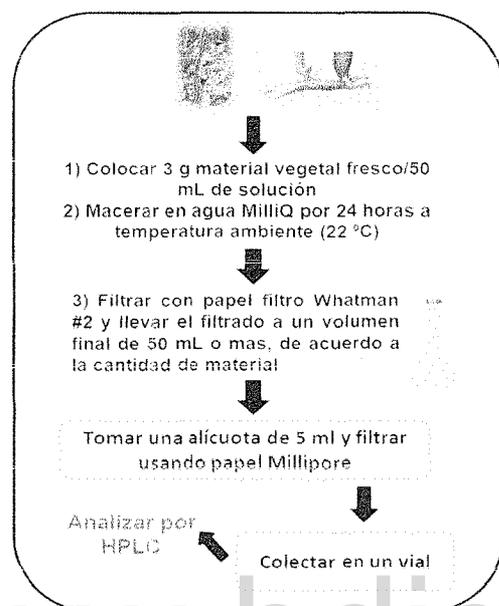


Figura 2.2: Metodología para la obtención de los MA de *P. caudatum* propuesta, MA-2.

La metodología MA-2 se aplicó solo a los individuos muestreados desde la segunda etapa hasta los frondes en hojarasca y para los cayados se decidió aplicar la metodología MA-1 considerando que el uso del Sep-Pak C18 es útil para concentrar estos macerados.

2.3.1.2.- Esporas

Las esporas fueron recolectadas de frondes maduros de *P. caudatum* (Anexo B: tabla B.1). Para esto, los frondes fueron colectados y guardados en bolsas plásticas, se colocaron en el secador de plantas por una (01) semana (el calor y el flujo de aire promueve el desprendimiento de las esporas). Finalmente, las esporas se recogieron y pesaron. De esta muestra, se tomó una porción de 0,52 g y se maceró en agua MilliQ siguiendo la metodología MA-1 figura 2.1.

2.3.1.3.- Rizomas

Se tomaron ocho (08) muestras de rizomas (Anexo B: tabla B.2), se pesaron y se colocaron a macerar en agua MilliQ siguiendo la metodología MA-1 mostrada en la figura 2.1.

2.3.2.- Protocolo de obtención de los extractos orgánicos (EO) de los frondes, esporas y rizomas de *P. caudatum*, previamente macerados en agua

El objetivo de esta sección es extraer la cumarina y compuestos fenólicos que aun se encuentren en los frondes a las diferentes etapas de desarrollo, luego de la maceración acuosa.

2.3.2.1.- Frondes

a) Protocolo de extracción orgánica

Los extractos orgánicos se obtienen usando Etanol : agua (1:1). Los solventes de extracción estudiados fueron etanol (EtOH), metanol (MeOH) y mezcla EtOH: H₂O (1:1), siendo esta última la mas eficiente (Anexo B: tabla B.3). La metodología diseñada fue denominada EO-6 (figura 2.3) y el método de prepurificación del extracto antes del análisis por HPLC, se realizó usando cartuchos Sep-Pak C18.

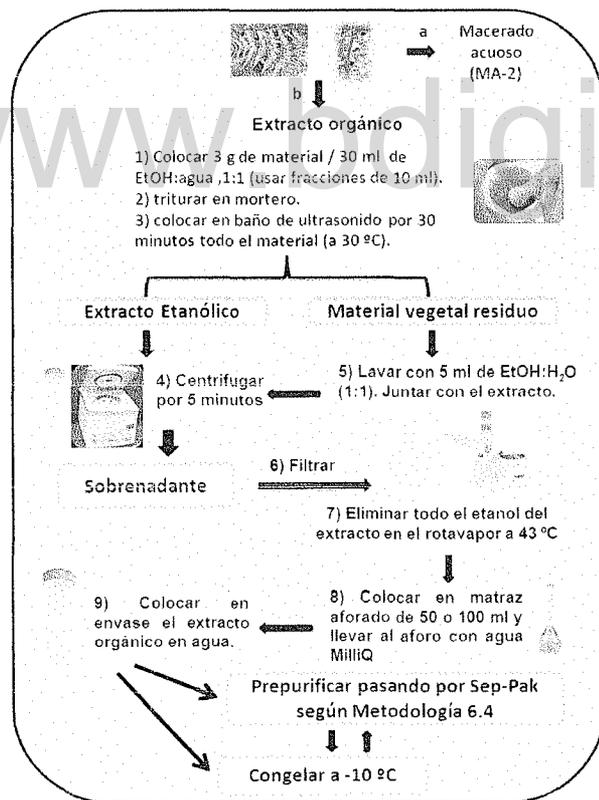


Figura 2.3: Metodología EO-6 para la obtención de los EO de *P. caudatum*. En la figura, la flecha a indica que se realizó un MA a todas las muestras antes de aplicarles esta metodología (flecha b).

El material vegetal, luego de la maceración acuosa, se extrajo en una relación de 3 g de peso fresco (relativo al peso original antes de ser tratado) por cada 30 ml de solvente EtOH

: H₂O (1:1) (3 x 10 mL), mediante trituración en un motero. Posteriormente, todo el material se colocó en un baño de ultrasonido por 30 minutos (T = 30 °C). El extracto etanólico fue decantado del residuo vegetal, se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm, se filtró sobre papel Whatman #2 y se eliminó el solvente a presión reducida a 43 °C. Finalmente, el residuo fue redissuelto en agua MilliQ y llevado al aforo en un matraz de 25 ó 50 ml (masas frescas ≤ 10 g) o 100 ml (masas frescas ≥ 10 g). Los extractos fueron congelados a -10 °C hasta el momento del análisis por HPLC (según condiciones descritas en la tabla 2.2).

La metodología de prepurificación usada fue denominada EO-6.4 (figura 2.4): 1ml del EO se sembró en el Sep-Pak C18, previamente acondicionado. Luego se eluyeron los compuestos retenidos con varios solventes en orden de polaridad decreciente: 5% MeOH (F1); 90% MeOH (F2); 100% MeOH (F3) y 100% MeOH (F3F3) (Anexo B: figura B.3 y tabla B.4).

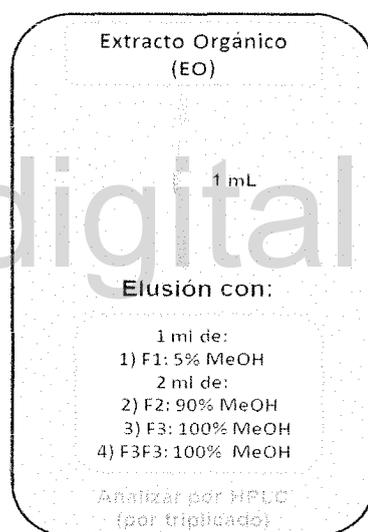


Figura 2.4: Metodología EO-6.4 usada para el pre tratamiento de los extractos orgánicos a través del Sep-Pak C18.

b) Protocolo para la determinación de la eficiencia de extracción de cumarina de los frondes de *P. caudatum* siguiendo la metodología EO-6

Para este experimento se recolectaron en la parcela en estudio tres frondes: uno de 2da etapa, uno de tercera etapa y uno de cuarta etapa. Con las pínulas del primer par de pinas de cada fronde se preparó una muestra compuesta del material vegetal y se tomaron cinco porciones equivalentes (5 réplicas), se pesaron y a cada una de ellas se sometió a

maceración acuosa por 24 horas (metodología MA-2, figura 2.2) y luego a la metodología de extracción EO-6, tres veces de manera sucesiva (ver tabla 2.3).

Tabla 2.3: Material vegetal usado para determinar el porcentaje de extracción de cumarina en la primera extracción (%Ext-Rep x -EXT1) siguiendo la metodología EO-6.

Muestra – nombre*	Masa (g) ($\pm 0,01$)	Nº de veces que se repitió la metodología EO-6	# EXT sucesiva
%Ext-Rep1	16,10	3	%Ext-Rep1-EXT1
			%Ext-Rep1-EXT2
			%Ext-Rep1-EXT3
%Ext-Rep2	16,10	3	%Ext-Rep2-EXT1
			%Ext-Rep2-EXT2
			%Ext-Rep2-EXT3
%Ext-Rep3	16,10	3	%Ext-Rep3-EXT1
			%Ext-Rep3-EXT2
			%Ext-Rep3-EXT3
%Ext-Rep4	16,15	3	%Ext-Rep4-EXT1
			%Ext-Rep4-EXT2
			%Ext-Rep4-EXT3
%Ext-Rep5	16,15	3	%Ext-Rep5-EXT1
			%Ext-Rep5-EXT2
			%Ext-Rep5-EXT3

*Todas las muestras, antes de ser tratadas, fueron sometidas a un MA por 24 horas (figura 2.2). Los EO obtenidos para cada una de las muestras se llevaron al aforo en un matraz de 100 mL.

a) Protocolo para la determinación de la recuperación de cumarina de los EO de los frondes de *P. caudatum* siguiendo la metodología EO-6.4

Para esto se seleccionó un EO de un fronde de segunda etapa fenológica y también se preparó una solución madre de cumarina, pesando 0,0745 g de cumarina disolviendo con agua MilliQ hasta un volumen de 250 mL. La concentración final de cumarina en la solución fue 2039,7 μ M.

Las soluciones que fueron preparadas (por duplicado cada una) para el estudio son (figura 2.5):

- a) **Solución sin patrón.** Esta se preparó añadiendo 370 μ L de agua MilliQ a un matraz de 5 ml y enrazando con el EO del fronde de segunda etapa fenológica de concentración de cumarina desconocida.

- b) **Solución de alta concentración con patrón.** Se preparó añadiendo 370µL de solución madre de cumarina (SIGMA, 99% de pureza) a un matraz de 5 ml y enrazando con el EO del fronde de segunda etapa fenológica (2EFr2).

Finalmente, a estas soluciones se les aplicó el tratamiento según metodología EO-6.4 de elución por Sep-Pak C18 (figura 2.4) y las fracciones F2 fueron analizadas por HPLC según metodología establecida en tabla 4.2.

Por otra parte, para determinar el factor de corrección correspondiente a la cumarina que se pierde en la fracción F3 de 100% MeOH, de acuerdo a la metodología EO-6.4 (figura 2.4 y anexo B, tabla B.4), se midieron las fracciones respectivas obtenidas en los tres primeros individuos de cada etapa que fueron muestreados y se calculó un porcentaje con respecto al área de pico de cumarina eluída en la fracciones F2 de cada EO.

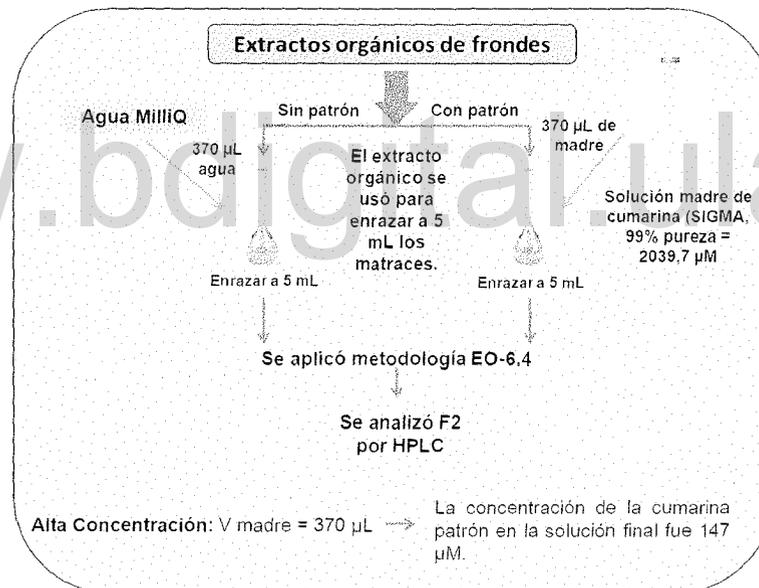


Figura 2.5: Metodología seguida para determinar el porcentaje de recuperación de cumarina, contenida en una solución acuosa de EO de *P. caudatum*, al ser procesada con la metodología EO-6.4 (figura 2.4).

2.3.2.2.- Esporas

Posterior a la extracción acuosa, las esporas fueron maceradas con DCM : MeOH (1:1). Para esto se usó una relación de 0,5229 gramos de esporas / 10 ml del solvente (Anexo B:

tabla B.1). Se realizaron maceraciones sucesivas en un mortero y posteriormente todo el material se extrajo en el baño de ultrasonido por 30 minutos ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

El extracto obtenido fue decantado, se filtró usando papel Whatman #2 y se eliminó el solvente a presión reducida a $43\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, el residuo fue redissuelto en MeOH grado HPLC y llevado al aforo en un matraz de 10 ml. La solución metanólica fue pasada por Sep-Pak C18 y luego se lavó éste con 5 ml de MeOH y se juntaron ambas eluciones. El MeOH fue eliminado hasta un volumen de 5 ml. Finalmente, se realizó el análisis por HPLC de acuerdo con las condiciones definidas en la tabla 2.2 (esta metodología fue denominada EO-2). Esta extracción se realizó con el fin de determinar si existe presencia de cumarina en el tejido interno de las esporas, que no se lixiviable por la lluvia.

2.3.2.3.- Rizomas

Luego de la maceración con agua MilliQ, los rizomas fueron extraídos siguiendo la misma metodología que se aplicó a las esporas (Anexo B: tabla B.2).

2.4.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los MA de *P. caudatum*

2.4.1.- Cumarina

En estudios previos (Buendía, 2009), se demostró la ausencia de efecto de la matriz vegetal al cuantificar la cumarina en los MA (Anexo B: tabla B.5 y figura B.4).

Basados en estos resultados, se realizó la cuantificación utilizando una curva de calibración sencilla.

- **Curva de calibración sencilla #1 de cumarina:** rango de concentración desde 0,1 – 300 μM .

Para la construcción de esta curva (tabla 2.4) se preparó una solución madre (250 mL) de cumarina patrón de concentración $1,056 \times 10^{-3}\text{ M}$ (1056 μM). Se pesaron 38,6 mg de cumarina (SIGMA, 99% de pureza) y se disolvieron con agua MilliQ que se usó como solvente.

La solución madre fue filtrada usando papel Millipore de 0,45 μm de tamaño de poro. Luego se tomaron volúmenes en forma creciente y se fueron añadiendo a matraces de 10 mL que se llevaron al aforo con agua MilliQ. Para el análisis por HPLC se utilizaron las condiciones descritas en la tabla 2.2.

Tabla 2.4: Datos para la construcción de la curva de calibración.

Nº patrón	cumarina [µM]	V [µL] de solución concent.*	Volumen final [mL]
1	0,1	2	10
2	0,5	10	10
3	1,0	20	10
4	5,0	100	10
5	10,0	200	10
6	50,0	1000	10
7	100,0	2000	10
8	300,0	6000	10
9	500,0	11837	25

*La solución madre se usó para preparar el patrón 9 y este fue usado a su vez para preparar los patrones desde el 1 hasta el 8.

2.4.2.- Pterosinas

En los MA de los frondes se detectó la presencia de las pterosinas A y B. Para realizar la cuantificación se construyó una curva de calibración sencilla de la pterosina B (aislada y purificada en el laboratorio de Química Ecológica). La pterosina A se cuantificó relativa a la pterosina B, considerando que, por sus estructuras químicas similares entre sí, su coeficiente de extinción molar es aproximadamente igual.

El rango de concentraciones para la construcción de la curva de pterosina B fue de 0,1 – 20 µM y la preparación de los patrones se describe en la tabla 2.5. Se preparó una solución concentrada de pterosina B (ver datos de la pterosina B en tabla 2.1) de 303 µM, pesando 6,6 mg y disolviendo en metanol grado HPLC hasta un volumen de 100 mL.

Tabla 2.5: Datos para la construcción de la curva de calibración.

Nº Patrón	PteB [µM]	V solución madre [µL]*	V solución final [µL]
1	0,1	3,5	10
2	0,5	16,5	10
3	1,0	16,5	5
4	5,0	33,0	2
5	10,0	66,0	2
6	20,0	132,0	2

*solución madre de 303 µM.

Las condiciones de análisis por HPLC de los patrones construidos para todas las curvas de calibración fueron las descritas en la tabla 2.2.

2.4.3.- Fenólicos totales (FT)

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos (FT) en cada MA obtenido de los frondes, aplicando la metodología desarrollada en nuestro laboratorio (Oliveros, 1998). Este mismo procedimiento se aplicó a los patrones de tanino de quebracho utilizados en la construcción de la curva de calibración. El método de azul de prusia para compuestos fenólicos totales fue el utilizado en este análisis.

El reactivo consiste en una solución de sulfato amónico férrico 0,10 M $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2]$ en HCl 0,1 M y una solución de ferricianuro de potasio 0,008 M $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Se colocó, un volumen apropiado de los MA, en la mayoría de los casos 1 mL, en un erlenmeyer de 125 mL y se adicionaron 50 mL de agua destilada. Luego se agregaron 3 mL de la solución de sulfato amónico férrico con agitación constante, a intervalos de 1 mL /min. Exactamente transcurridos 20 min, se adicionaron, como en el caso del sulfato amónico férrico, 3 mL de ferricianuro de potasio. Transcurridos otros 20 min se leyó la absorbancia a 725 nm.

- *Curva de calibración sencilla de tanino de quebracho:* en el rango de concentraciones de 0,9 - 684 mg/L.

Para la construcción de esta curva se preparó una solución madre de tanino de quebracho (descripción del reactivo en tabla 2.1) pesando 90 mg del tanino y disolviéndolo con agua destilada para llevarlo al aforo en un matraz de 100 mL. La concentración final de esta solución fue de 900 mg/L. La preparación de los patrones se describe en la tabla 2.6.

Tabla 2.6: Datos para la construcción de la curva de calibración.

Nº Patrón	TQ[mg/L]*	V solución madre de 900 mg/L [µL]	V solución final [µL]
1	0,9	5	5
2	9,0	50	5
3	18,0	100	5
4	135,0	300	2
5	324,0	720	2
6	504,0	1120	2
7	684,0	1520	2

* TQ = tanino de quebracho.

El tanino de quebracho es usado en esta cuantificación porque presenta una absorbancia máxima en la misma región del ultravioleta (725 nm) donde absorben la mezcla de todos los compuestos fenólicos presentes en los MA.

2.5.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los EO de *P. caudatum*

2.5.1.- Cumarina

La cuantificación de cumarina en los EO de *P. caudatum* mostró efecto de la matriz vegetal (Ver Anexo B: figura B.5).

Este efecto no se observó al diluir las muestras a concentraciones del orden de 6,0 μM .

Por ello, para determinar el contenido de cumarina, cada fracción F2 (obtenida de aplicar la metodología EO-6.4 de pre purificación a cada EO, figura 2.4) se diluyó añadiendo 50 μL de estas en un matraz de 2 mL y llevándolo al aforo con MeOH grado HPLC. Finalmente, se construyó la curva de calibración sencilla #2.

- **Curva de calibración sencilla #2:** rango de concentraciones de 0,2 hasta 6,0 μM .

Para la construcción de esta curva (ver tabla 2.7) se usó la solución madre de 2039,7 μM preparada en la sección 2.3.2. Se tomaron 4,95 mL de esta solución madre y se colocaron en un matraz de 100 mL y se llevó al aforo con MeOH grado HPLC.

Así, se preparó una solución 100 μM de cumarina que fue microfiltrada usando papel Millipore de 0,45 μm de tamaño de poro y de la cual se tomaron volúmenes en forma creciente que se fueron añadiendo a matraces de 2 mL y se llevaron al aforo con MeOH grado HPLC. Se tomó directamente de estas soluciones patrones para analizar en el HPLC de acuerdo con las condiciones establecidas en la tabla 2.2.

Tabla 2.7: Datos para la construcción de la curva de calibración.

Nº patrón	Cumarina [μM]	V [μL] de solución 100 μM *	Volumen final [mL]
1	0,2	4	2
2	0,4	8	2
3	0,8	16	2
4	1,0	20	2
5	1,5	30	2
6	2,0	40	2
7	2,5	50	2
8	3,0	60	2
9	4,0	80	2
10	5,0	100	2
11	6,0	120	2

*La solución de cumarina 100 μM se preparó a partir de la solución madre de 2039,7 μM .

2.5.2.- Fenólicos totales

Para la cuantificación de los fenólicos totales, en los EO de frondes, se aplicó la misma metodología ya descrita en el apartado correspondiente a los fenólicos totales en la sección 2.4.3.

2.5.3.- Pterosinas

No se realizó un análisis para determinar la presencia de pterosinas en los EO de los frondes de *P. caudatum*.

2.6.- Preparación de los extractos orgánicos de muestras de suelo para determinar presencia de cumarina en un estudio preliminar.

Con el objeto de determinar la presencia de cumarina en el suelo de la parcela en estudio, se muestreó el suelo correspondiente al período de cada etapa fenológica (como se describió en la sección 2.2.2.2).

Para caracterizar el suelo, una parte de cada una de las muestras obtenidas fueron enviadas al laboratorio de análisis de suelo del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA – Mérida) para un análisis de algunos parámetros como son: textura, contenido de fósforo, potasio, calcio, magnesio, porcentaje de materia orgánica y pH.

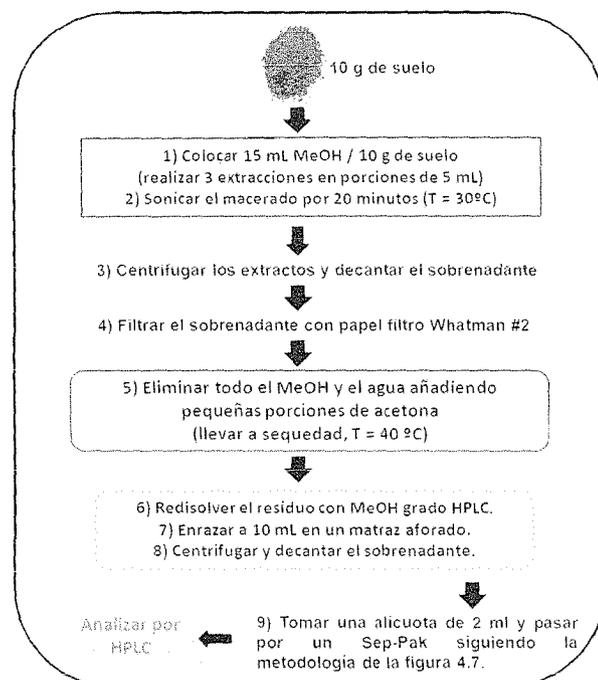


Figura 2.6: Metodología Suelo EO-1, diseñada para la extracción de cumarina de muestras de suelo.

El MeOH fue el solvente seleccionado para la extracción de cumarina de las muestras, de acuerdo con lo reportado por Yamamoto (2009). Las muestras fueron colocadas en baño de ultrasonido para aumentar la eficiencia de la extracción y posteriormente centrifugadas y filtradas (ver figura 2.6: metodología Suelo EO-1).

Antes de analizar los extractos orgánicos de suelo por HPLC, estos fueron prepurificados usando cartuchos Sep-Pak C18 (figura 2.7), con el fin de retener compuestos apolares que pudiesen disminuir la vida media de la columna cromatográfica. El eluato y la fracción F1 obtenida se combinaron y se llevaron a sequedad. Finalmente, el residuo se redisolvió en 1 mL de MeOH y se centrifugó por 5 minutos a 6000 rpm, el sobrenadante se filtró usando papel Millipore de 0,45 μm y se analizó por HPLC siguiendo las condiciones de la tabla 2.2.

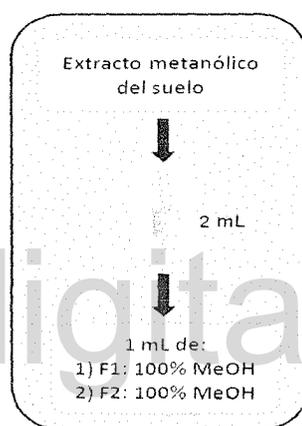


Figura 2.7: Metodología de prepurificación del Sep-Pak C18 de los extractos orgánicos del suelo.

2.7.- Bioensayos

2.7.1.- Estudios de fitotoxicidad sobre lechuga (*Lactuca sativa*) en bioensayos en placas de petri de los MA de *P. caudatum*

En estudios previos se determinó la actividad alelopática de patrón de cumarina comercial (SIGMA, 99% pura) frente a las plantas receptoras (Buendía, 2009):

Tomate: *Solanum lycopersicum*

Lechuga: *Lactuca sativa*

Rábano: *Rhapanus sativus*

Cebolla: *Allium cepa*

Alfalfa: *Medicago sativa* L.

Pepino: *Cucumis sativus* L.

Se encontró que las especies más sensibles a los tratamientos aplicados y que arrojaron la mejor correlación de actividad, en función de la concentración, fueron *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*, siendo esta última la que mostró el mejor perfil cuando se ensayó con los MA de las muestras reales.

Con base en los resultados obtenidos se seleccionó *L. sativa* como planta receptora y fue usada en los bioensayos sucesivos, donde se determinó la actividad fitotóxica de los MA de *P. caudatum* en sus diferentes etapas fenológicas en comparación con el efecto de soluciones patrón de cumarina que variaron entre 0,1 – 200 μM . Para esto se prepararon los medios de cultivo sobre agar en cápsulas de *petri* según protocolo optimizado en el Laboratorio de Química Ecológica. Los parámetros a medir fueron: porcentaje de germinación, longitud de la raíz y longitud del tallo.

2.7.1.1.- Método de preparación de los bioensayos en placas de *petri* con las soluciones de pterosinas A y B y Linurón

Para esto se prepararon soluciones de pterosina A y B (purificadas en el laboratorio), pesando 3,1 mg y 2,7 mg, respectivamente, para obtener una concentración de 50 μM en 250 mL y diluyendo al aforo con agua destilada. Así también, se preparó una solución de la mezcla de las pterosinas (A/B) en una proporción de masas de 0,12; para esto se pesaron 0,3 mg de pterosina A y 2,7 mg de pterosina B y se diluyeron en un matraz aforado de 250 mL con agua destilada. Igualmente, se prepararon 250 mL de una solución de herbicida Linurón (comercial) a una concentración de 50 μM , para lo cual se pesaron 7,6 mg de suspensión. De cada una de las soluciones preparadas se tomaron 60 mL y se le añadieron 0,9 g de agar (de acuerdo a la relación: 1,5 g de agar/100 mL de solución). Simultáneamente se prepararon 500 mL de una solución agar/agua en la relación ya mencionada, que sirvió de solvente para realizar las diluciones necesarias.

Aplicando el método de montaje de los bioensayos, que se describe a continuación, se realizaron 8 diluciones para obtener las concentraciones siguientes: 50 - 25 - 12,5 - 6,2 - 3,1 - 1,6 - 0,8 - 0,4 μM .

Método de montaje de los bioensayos en placas de *petri*

Cada solución de tratamiento (pterosina A, pterosina B, pterosina A+B y Linurón) con agar se sometió a calentamiento, con agitación constante, hasta una temperatura entre 70 - 80 °C. Se tomó de la solución de 50 μM la mitad en volumen, es decir, 30 mL y se

distribuyó en las cápsulas de *petri*; 10 mL por cápsula (3 réplicas). Los otros 30 mL de solución de 50 μ M se diluyeron a la mitad de la concentración inicial añadiendo 30 mL de la solución de agar/agua. Se sometió a calentamiento y nuevamente se tomó la mitad del volumen, 30 mL y se repitió el procedimiento de distribución en las cápsulas de *petri*. Este método se aplicó sucesivamente hasta completar todas las diluciones necesarias para obtener las concentraciones establecidas.

Luego se dejó que cada solución patrón colocada en las placas de *petri* llegara a temperatura ambiente y se procedió a colocar las semillas de *L. sativa* (20 semillas por placa). Finalmente, cada una de las placas se selló con papel *parafilm*, se envolvieron en papel aluminio y se llevaron a las cámaras de crecimiento con sus respectivos controles a una temperatura de 25 ± 1 °C. El tiempo de duración en la cámara fue de 11 días.

2.7.1.2.- Método de preparación de los bioensayos en placas de *petri* con las soluciones de cumarina patrón

Para esto se preparó una solución 200 μ M de cumarina, pesando 7,3 mg de cumarina patrón (SIGMA, 99% pura) y diluyendo a un volumen final de 250 mL con agua destilada. Se tomaron 60 mL de esta solución madre y se le añadieron 0,90 g de agar (de acuerdo a la relación: 1,5 g de agar/100 mL de solución). Simultáneamente se prepararon 500 mL de una solución agar/agua en la relación ya mencionada, que sirvió de solvente para realizar las diluciones necesarias.

Aplicando el método de montaje de los bioensayos, que se describe a continuación, se realizaron 11 diluciones para obtener las concentraciones siguientes: 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,4 – 3,2 – 1,6 – 0,8 – 0,4 – 0,2 – 0,1 μ M.

Método de montaje de los bioensayos en placas de *petri*

Cada solución con agar se sometió a calentamiento, con agitación constante, hasta una temperatura entre 70 - 80 °C. Se tomó de la solución de 200 μ M la mitad en volumen, es decir, 30 mL y se distribuyó en las capsulas de *petri*; 10 mL por cápsula (3 réplicas). El resto de la solución preparada inicialmente se diluyó a la mitad de la concentración inicial añadiendo 30 mL de la solución de agar/agua. Se sometió a calentamiento y nuevamente se tomó la mitad del volumen, 30 mL y se repitió el procedimiento de distribución en las cápsulas de *petri*. Este método se aplicó sucesivamente hasta completar todas las diluciones necesarias para obtener las concentraciones establecidas.

Luego se dejó que cada solución patrón colocada en las placas de *petri* llegara a temperatura ambiente y se procedió a colocar las semillas de *L. sativa* (20 semillas por placa). Finalmente, cada una de las placas se selló con papel *parafilm*, se envolvieron en papel aluminio y se llevaron a las cámaras de crecimiento con sus respectivos controles a una temperatura de 25 ± 1 °C. El tiempo de duración en la cámara fue de 10 días.

2.7.1.3.- Método de preparación de los bioensayos en placas de *petri* con los MA de *P. caudatum*

De cada una de las soluciones obtenidas de los MA de *P. caudatum* (según lo descrito en la sección 2.3.1) se tomaron 30 mL y se les añadió 0,5 g aproximadamente de agar (de acuerdo a la relación 1,5 g de agar/100 mL de solución). A cada solución de tratamiento se le aplicó el método de montaje de los bioensayos descrito a continuación.

Método de montaje de los bioensayos en placas de *petri*

Cada solución de MA con agar se sometió a calentamiento, con agitación constante, hasta una temperatura entre 70 - 80 °C. Se tomaron los 30 mL de cada macerado y se distribuyeron en las capsulas de *petri*; 10 mL por cápsula, 3 réplicas por cada tratamiento. Luego se dejó que cada tratamiento colocado en las placas de *petri* llegara a temperatura ambiente y se procedió a colocar las semillas de *L. sativa* (20 semillas por placa). Finalmente, cada una de las placas se selló con papel *parafilm*, se envolvieron en papel aluminio y se llevaron a las cámaras de crecimiento con sus respectivos controles a una temperatura de 25 ± 1 °C. El tiempo de duración en la cámara fue de 10 días.

2.7.1.4.- Preparación de los controles.

Cada uno de los bioensayos, descritos anteriormente, se acompañó de sus respectivos controles. Para lo cual, de los 500 mL de solución agar/agua preparada se tomaron 30 mL en caliente y se distribuyeron 10 mL en tres cápsulas de *petri* (3 réplicas). Finalmente, se procedió a colocar las semillas de *L. sativa* (20 semillas por placa).

2.7.1.5.- Determinación de la actividad

En cada placa se contabilizó el número de semillas germinadas de *L. sativa* tanto para el tratamiento como para el control, se tomó el promedio y se calculó el porcentaje de germinación de acuerdo con la ecuación 1:

$$\% \text{ actividad sobre germinación} = \left(\frac{NSG_{tratamiento} - NSG_{control}}{NSG_{control}} \right) \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec.1}$$

NSG = Número de semillas germinadas.

Además, para cada semilla germinada se midió la longitud de la raíz y del tallo, se tomó el promedio y se calculó el porcentaje de actividad sobre la elongación del tallo y raíz de acuerdo con la ecuación 2:

$$\% \text{ Actividad} = \left(\frac{L_{tratamiento} - L_{control}}{L_{control}} \right) \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

L= longitud del tallo o raíz.

Valores de % *Actividad* < 0 indica la existencia de un efecto inhibitorio y un valor positivo implica estimulación en los parámetros medidos.

2.7.2.- Estudio preliminar de los efectos de la cumarina patrón sobre lechuga (*Lactuca sativa*) en bioensayos en medio hidropónico.

Estos bioensayos se llevaron a cabo usando *L. sativa* como especie receptora, colocando las plántulas, a las cuales se les haría el seguimiento, en solución nutritiva para el control y en solución nutritiva con cumarina para el tratamiento.

El objeto de este estudio es determinar si hay absorción de cumarina por la planta y si esta ejerce algún efecto apreciable, a diferentes concentraciones de cumarina y tiempos de tratamientos, sobre el crecimiento.

2.7.2.1.- Germinación de semillas de *L. sativa*

a) Esterilización de las semillas: Las semillas fueron esterilizadas en su superficie con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5% v/v. Luego se lavaron varias veces con agua destilada y esterilizada. Se colocaron sobre papel filtro seco en una cápsula de *petri* esterilizada.

b) La esterilización del resto del material: Se esterilizaron las placas de *petri* (16 placas), agua y perlas de vidrio en un autoclave a 200 °C, 100 psi durante 30 minutos. Para ello se lavaron las placas de *petri* y se envolvieron con papel de

aluminio. En una fiola se colocaron 250 ml de agua destilada y se cubrió con papel aluminio. Las perlas de vidrio se colocaron en un vaso de precipitado envuelto en aluminio.

- c) **Germinación de las semillas:** Se colocaron papeles de filtro con 10 ml de agua esterilizada en las cápsulas de *petri* y 30 semillas en cada una. Luego, se sellaron las placas con papel *parafilm*, se cubrieron con papel aluminio y se llevaron a la cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C. El tiempo de crecimiento fue hasta que las plántulas alcanzaron aproximadamente entre los 3 – 4 cm de longitud (tallo + raíz), esto es aproximadamente 13 días en la cámara de crecimiento (germinación + crecimiento).

2.7.2.2.- Montaje de los bioensayos con *L. sativa* en medio hidropónico

Se prepararon soluciones nutritivas según lo descrito por Sandín-España y colaboradores (2003).

La solución stock de Macronutrientes se preparó por separado disolviendo: KNO_3 (19,4 g), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (69,4 g), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (24,6 g) y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (18,4 g) en agua (a 1 litro cada una).

La solución stock de oligoelementos se preparó disolviendo $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,49 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,24 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,296 g), H_3BO_3 (1,86 g), $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,035 g), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,028g) y NaCl (5,85 g) en agua (hasta enrazar a 1 litro).

La solución stock de EDTA – Fe fue preparada disolviendo EDTA (13,05 g) en KOH (1 M, 143 mL). Después se adicionó $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12,45 g) se añadió agua hasta 0,5 L y luego el pH fue ajustado a 5,5 usando KOH diluido.

Finalmente, la solución de nutrientes fue preparada usando las proporciones de las soluciones listas que se indican en la tabla 2.8. La solución correspondiente al tratamiento contiene la misma composición del control añadiéndose además el contenido de cumarina para cada litro de solución necesaria para obtener las concentraciones deseadas en cada bioensayo.

Una vez que las soluciones fueron preparadas, 1 litro de la solución control se colocó en el recipiente correspondiente y de igual forma se hizo con la solución tratamiento.

Tabla 2.8: Solución nutritiva para el control*

Nutrientes		Volumen (ml) de soluciones de nutrientes para 1 litro de solución nutritiva.
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	69,4 g/L	26 ml
Oligoelementos	10 ml/10.000 ml	17 ml
MgSO ₄ x 7H ₂ O	24,6 g/L	15 ml
EDTA-Fe (pH = 5,5)	pH = 5,5	10 ml
KNO ₃	19,4 g/L	1 ml
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	18,4 g/L	0,56 ml

*Para los tratamientos:

Bioensayo 1 y 2: 0,1472 g de cumarina para 1 litro de solución nutritiva a una concentración de 1000 µM

Bioensayo 3: 0,0786 g de cumarina para una concentración de 500 µM y 0,0296 g de cumarina para 1 litro de solución nutritiva a una concentración de 200 µM

En este estudio los dos primeros bioensayos se construyeron usando una sola concentración de cumarina, 1000 µM. En el tercer bioensayo se usaron dos concentraciones, 200 y 500 µM. En todos los casos las plántulas fueron expuestas durante varios días al tratamiento con cumarina en una cámara de crecimiento; una vez cumplido el periodo de ensayo, éstas fueron cortadas, separando tallos de raíces para posteriormente aplicar a cada parte la metodología EO-6 (figura 2.3), utilizada para la extracción y cuantificación mediante HPLC de cumarina. Los extractos obtenidos se filtraron usando papel Millipore de 0,45 µm y luego se analizaron por HPLC. A continuación se describen cada uno de los bioensayos:

a) Bioensayo 1. Evaluación de la absorción de cumarina por las plántulas de *L. sativa*

Este bioensayo se desarrolló con el fin de determinar si existe absorción de cumarina por *L. sativa* a través del tallo o la radícula, con una exposición al tratamiento de concentración 1000 µM entre 2 – 16 días. Para esto, en unos recipientes de vidrio (500 mL, de 7 cm de diámetro), se colocaron perlas de vidrio (6 mm de diámetro) suficientes para cubrir la base, se añadieron 10 ml del tratamiento y se colocaron las plántulas de *L. sativa* (entre 2,5 - 4 cm de longitud inicial) sobre las perlas con la radícula sumergida en la solución (figura 2.8) estando el tallo en contacto con el medio. Luego se colocaron los recipientes en la cámara de crecimiento con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura entre 22 - 26 grados. El muestreo se realizó a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 días. Finalmente se prepararon los extractos de los tallos y raíces y se analizaron por HPLC.

b) Bioensayo 2. Evaluación de la absorción de cumarina por la radícula de *L. sativa*

Con el fin de determinar si la cumarina es absorbida a través de la radícula de *L. sativa* y translocada al tallo, se consideró colocar solamente la radícula en contacto con la cumarina. Para esto, las soluciones nutritivas, control y tratamiento, se colocaron en recipientes de vidrio (500 mL, de 7 cm de diámetro) a los cuales se les colocó una tapa de papel *parafilm* a la cual se le hicieron orificios. Las plántulas (con una longitud entre 3 - 4 cm), fueron introducidas a través de estos orificios, para permitir que la radícula entrara en contacto con la solución del medio (figura 2.8). Luego se colocaron los recipientes en la cámara de crecimiento con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura entre 22 - 26 grados. El muestreo se realizó a los 6 días. Finalmente se prepararon los extractos de los tallos y raíces y se analizaron por HPLC.

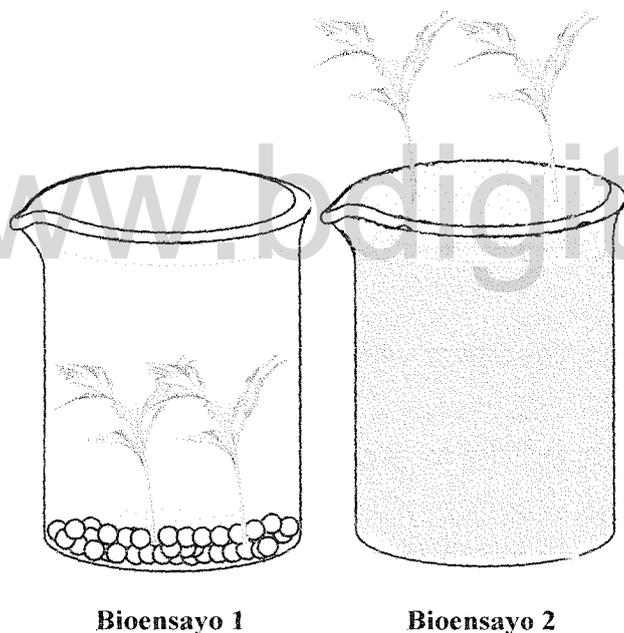


Figura 2.8: Diseño de los bioensayos 1 y 2 para los hidropónicos con *L. sativa*.

c) Bioensayo 3. Evaluación del efecto de la cumarina sobre el crecimiento de *L. sativa*

Este bioensayo se diseñó con el objetivo de evaluar el efecto de la cumarina sobre el crecimiento de las plántulas de *L. sativa* a dos concentraciones diferentes y a tiempos largos de tratamiento.

Se realizaron dos experimentos:

- el experimento 1 con una dosis de 200 μM de cumarina, durante un tiempo de tratamiento de 16 días y
- el experimento 2 con una dosis de 500 μM de cumarina durante 29 días de tratamiento.

El primer experimento se diseñó considerando que 200 μM es el contenido máximo de cumarina encontrado en los MA de los frondes de *P. caudatum*.

En ambos experimentos se tomaron 12 vasos plásticos # 3, y se les realizaron agujeros en la parte baja y en los lados. Luego se colocaron 3 plántulas de *L. sativa* por cada vaso (en estos experimentos, la longitud inicial de las plántulas varió entre 10 – 20 cm, aproximadamente) y se usaron perlas de vidrio (diámetro = 6 mm) como soporte para las plántulas dentro de cada vaso. Al mismo tiempo se tomaron dos recipientes de 35 x 20 x 15 cm a las que se les colocó una tapa de *foame* sujetada con tirro. Cada tapa presentó seis (6) aberturas de un diámetro similar a los vasos plásticos que contienen las plántulas de lechuga. Uno de los recipientes fue etiquetado con el nombre: control y el otro con: tratamiento (figura 2.9).

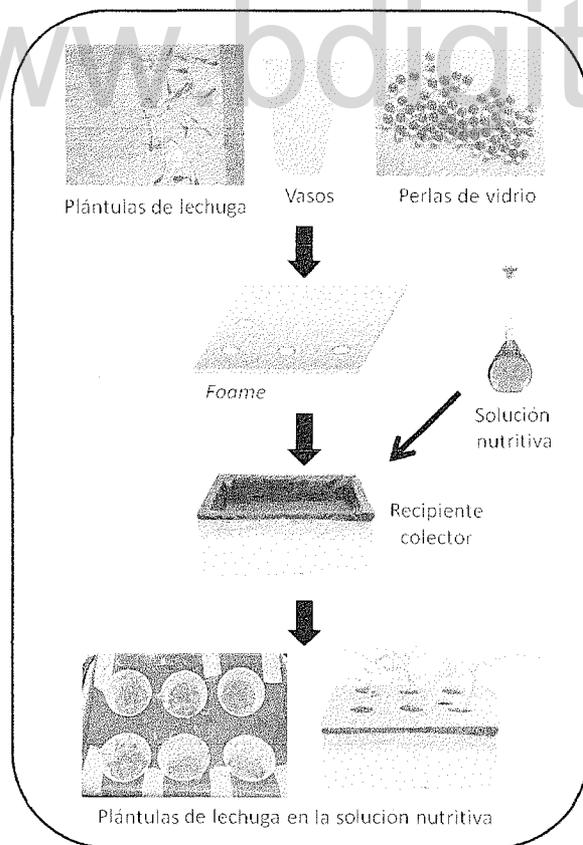


Figura 2.9: Diseño del bioensayo 3 para los hidropónicos con *L. sativa*.

Finalmente, se colocaron 6 vasos en cada recipiente (a través de las aberturas en las tapas de *foame*), de manera que las soluciones tocaran los vasos plásticos y las raíces de las plántulas para que estas pudiesen aprovechar los nutrientes de las soluciones.

Las soluciones de tratamiento y control, en el experimento 2, fueron renovadas al décimo quinto (15) día de estudio.

Una vez finalizado el periodo de estudio, se midió la longitud del tallo y raíz de las plántulas y se prepararon los extractos respectivos para su análisis por HPLC.

2.8.- Análisis estadístico de los resultados

Para el estudio comparativo del contenido de cumarina, pterosinas y fenólicos totales en las diferentes matrices vegetales de cada uno de los MA y EO, se usó un Análisis de Varianza (ANDEVA) y las pruebas de comparación de medias no paramétricas Kruskal-Wallis y Wilcoxon. Los datos se procesaron con el paquete estadístico STATISTIX 7.0.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1.- Análisis del crecimiento del *P. caudatum*

Uno de los parámetros que mejor describe el desarrollo de los frondes es la longitud del raquis (Alonso-Amelot et al., 1999). Los individuos muestreados para su análisis, en cada etapa fenológica, fueron aquellos cuyo Lr se encontraba dentro del rango determinado del histograma de Lr de la población que se distribuye normalmente. Estos frondes fueron considerados como los mejores representantes de la población para cada etapa (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Rango de longitud de raquis seleccionado para el muestreo de los individuos de *P. caudatum* en cada etapa fenológica.

Etapa fenológica	Crecimiento (días)	Rango de Lr (cm) para la selección de los individuos*
Cayado	0	13 - 23
	2	
	5	
Segunda Etapa	8	15 - 70
	12	
	15	
	19	
transición		
Tercera Etapa	22	65 - 120
	26	
	29	
	33	
transición		
Cuarta Etapa	36	110 - 175
	40	
	43	
	47	
	50	
54		

* Ver los histogramas respectivos en el anexo A: figura A.3.

La población de *P. caudatum* alcanzó su madurez entre los 50 y 54 días desde que se observó emergencia del cayado. Sin embargo, el progreso de la elongación del fronde no fue uniforme, tal como muestra la curva de la derivada de Lr respecto al tiempo (Figura 3.1). La máxima velocidad de elongación, calculada como la derivada de la función de crecimiento, se alcanza en el duodécimo día ($4,58 \pm 0,20$) cm/día, correspondiente al inicio de la segunda etapa, donde se comienza a expandir el primer par de pinas

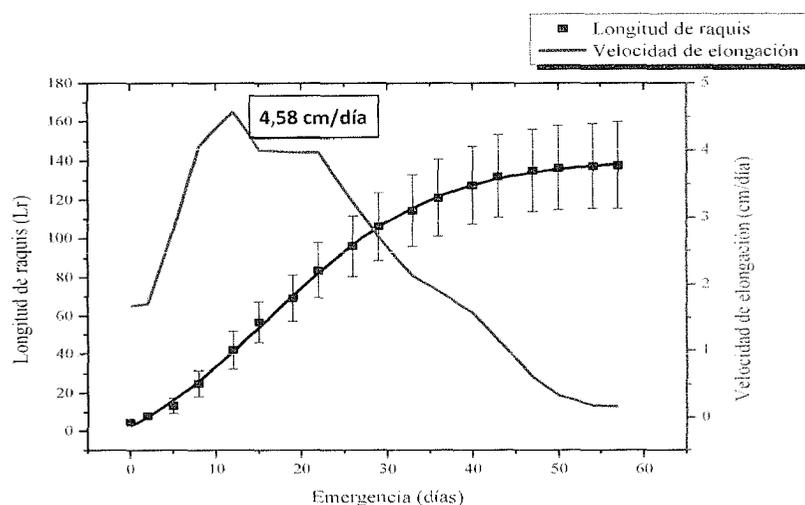


Figura 3.1: Velocidad de crecimiento del fronde de *P. caudatum* a 1990 msnm.

Las barras representan la desviación estándar de los promedios de longitud de raquis para N = 38. Línea negra = ajuste de la función de Boltzmann para la longitud de raquis vs los días de emergencia; Línea azul = velocidad de elongación vs los días de emergencia (corresponde a la derivada de la función de Boltzmann de ajuste para la longitud de raquis).

3.2.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los MA de *P. caudatum*

3.2.1.- Cumarina

3.2.1.1.- Frondes

De acuerdo con lo expuesto en la sección 3.1, se seleccionaron 10 individuos para cada etapa fenológica y se aplicó la metodología de obtención de los MA de los frondes descrita en el capítulo 2, sección 2.3.1 (figura 2.2: Metodología MA-2).

Para la cuantificación de la cumarina, como no hay efecto de la matriz vegetal (anexo B: figura B.4), se construyó la curva de calibración sencilla #1 (figura 3.2).

Esta curva cubre el rango de concentraciones desde 0,1 – 300 μM de cumarina (SIGMA, 99% pureza) y de acuerdo con el análisis estadístico de la recta de regresión se presentan los parámetros del análisis en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Parámetros de análisis de la curva de calibración.

Curva de calibración	Pendiente (m) [UAbs/ μM]	Intercepto (b) [UAbs]	r^2	LD [μM]	LQ [μM]
Calibración sencilla #1	10004,3 \pm 55,5	4093,2 \pm 5922,5	0,9998	0,06	0,20

(R^2 = cuadrado del coeficiente de correlación lineal, LD= límite de detección, LQ= límite de cuantificación)

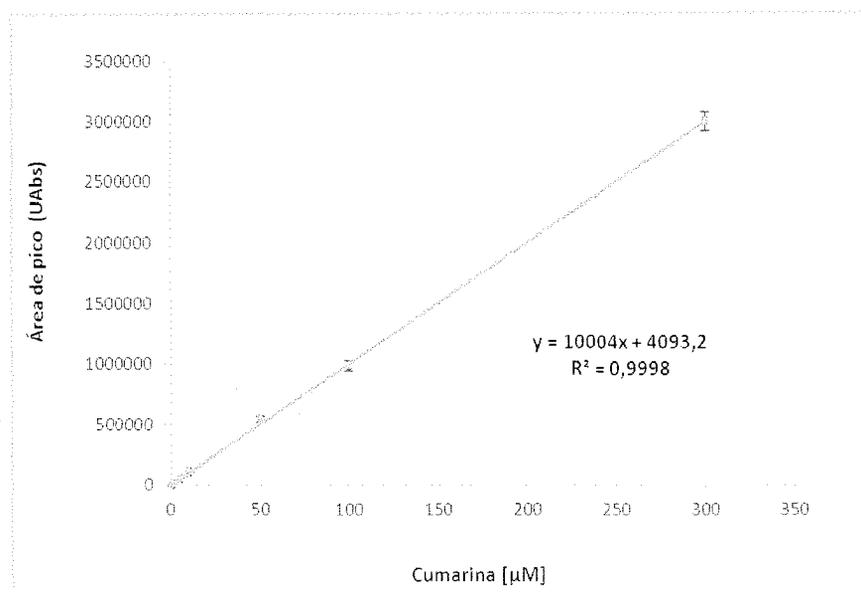


Figura 3.2: Curva de calibración sencilla de cumarina #1 (rango de concentraciones: desde 0 hasta 300 μM) (Las barras representan la desviación estándar para cada patrón (N = 3)).

En los MA de los cayados y de la hojarasca no fue detectada la cumarina. En la figura 3.3 se presenta el contenido de cumarina promedio en las otras etapas de crecimiento (Anexo C, tabla C.1).

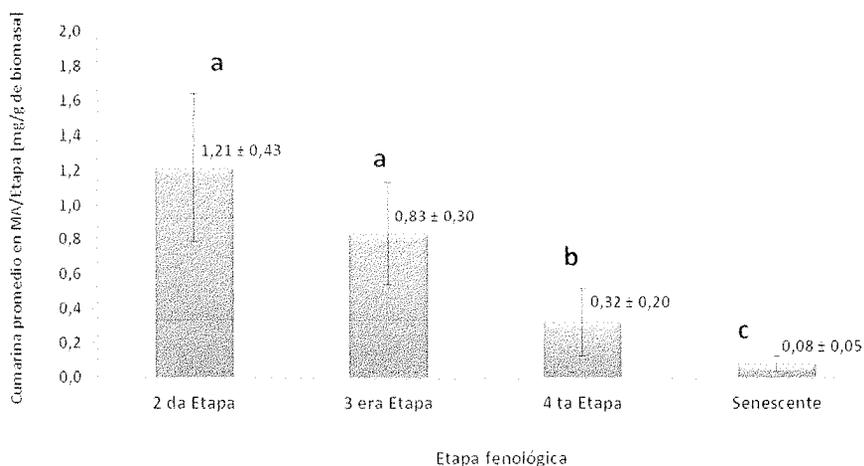


Figura 3.3: Contenido promedio de cumarina en los MA de frondes de diferentes etapas de desarrollo del *P. caudatum*. Las barras indican la desviación estándar de los promedios (N = 10). (Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

La figura 3.3 muestra que el contenido de cumarina disponible para la lixiviación disminuyó con la edad de los frondes. La 2E y 3E presentaron la mayor cantidad de cumarina, sin diferencias entre sí ($P > 0,05$, test de Kruskal-Wallis). En la 4E y senescencia, se redujo significativamente el contenido de este compuesto ($P < 0,05$, Test de Kruskal-Wallis).

En general, se observa que existe una tendencia a disminuir el contenido de cumarina lixiviada a medida que el fronde avanza hacia la madurez con un menor contenido en la senescencia.

Finalmente, para evaluar la actividad fitotóxica de los MA, es importante tener presente que el contenido de cumarina, en términos de concentraciones molares, varía entre 4 – 190 μM en los individuos estudiados (anexo D, tabla D.2 y figura D.1).

3.2.1.2.- Esporas

El análisis de los MA de una muestra de esporas de *P.caudatum* indicó la presencia de cumarina a nivel de trazas, $0 \mu\text{M} \leq [\text{Cumarina}] \leq 0,20 \mu\text{M}$, esto es por debajo del límite de cuantificación LOQ (figura 3.4).



Figura 3.4: a) Cromatograma obtenido para MA de las esporas y b) el espectro ultravioleta del pico a 7,61 min.

La presencia de cumarina se confirmó por coinyección con una muestra patrón, por comparación del tiempo de retención, aumento del área y espectro UV (figura C.1, anexo C).

3.2.1.3.- Rizomas

El análisis de los MA de algunas muestras de rizomas de *P.caudatum* mostró que no hay presencia de cumarina (Anexo B, tabla B.2). Por lo tanto, no se incluyó el muestreo de rizomas en el estudio.

3.2.2.- Pterosinas

3.2.2.1.- Frondes

En cuanto al análisis de las pterosinas, en los MA, se observó la presencia de estos metabolitos en los cayados y en la 2E fenológica.

A continuación se presenta la curva de calibración sencilla para la cuantificación de las pterosinas A y B (figura 3.5).

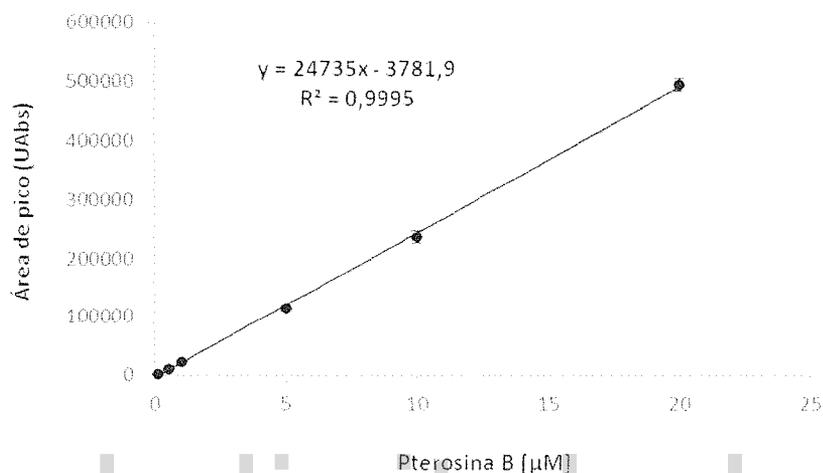


Figura 3.5: Curva de calibración sencilla de pterosina B (0 – 20 µM) (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para cada patrón, N = 3).

En la tabla 3.3 los parámetros de regresión de la curva de calibración.

Tabla 3.3: Parámetros de análisis de la curva de calibración sencilla de la pterosina B.

Curva de calibración	Pendiente (m) [UAbs/ µM]	Intercepto (b) [UAbs]	r ²	LD [µM]	LQ [µM]
Calibración sencilla Pterosina B	24734,6 ± 288,5	-3781,9 ± 2702,2	0,9995	0,030	0,100

(R²= cuadrado del coeficiente de correlación lineal, LD= límite de detección, LQ= límite de cuantificación)

En la figura 3.6 se muestra los resultados del contenido de las pterosinas A y B en los MA de cayados y frondes de 2E fenológica.

Se observa que la pterosina A lixiviada tiende a aumentar con el desarrollo existiendo diferencias significativas entre las etapas (P < 0,05, Test de Wilcoxon). En cuanto a la pterosina B, no hay diferencias significativas entre etapas (P > 0,05, Test de Wilcoxon), aunque parece haber una tendencia a disminuir con el desarrollo.

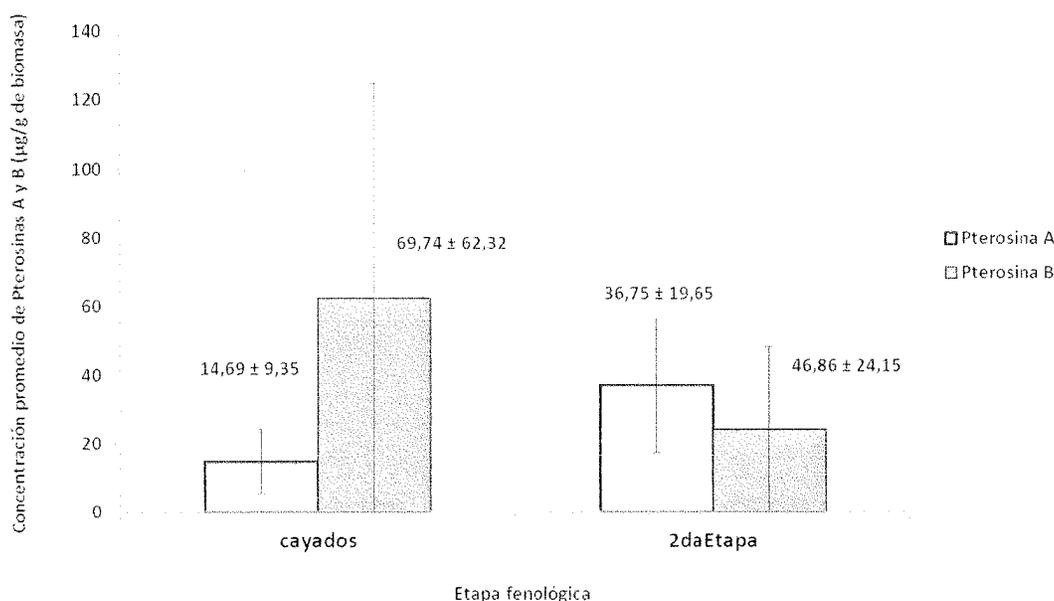


Figura 3.6: Contenido de pterosinas A y B en los MA en cayados y frondes de 2da etapa de *P. caudatum* (Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los promedios, N = 10).

En los MA de las otras etapas fenológicas, no se determinó el contenido de las pterosinas por encontrarse por debajo del límite de cuantificación (LQ < 0,100 µM).

Para evaluar la actividad fitotóxica de las pterosinas, es importante conocer que el rango de concentraciones en que éstas se encuentran presentes en los MA varía entre 0,2 – 6 µM (anexo D, tabla D.3).

3.2.2.2.- Esporas y rizomas

No se detectaron pterosinas A y B en los cromatogramas de los MA de esporas y rizomas.

3.2.3.- Fenólicos totales

3.2.3.1.- Frondes

En la tabla 3.4 se muestran los resultados del análisis de regresión de la curva de calibración sencilla para la cuantificación de fenólicos totales como equivalentes de tanino de quebracho. El rango de concentraciones de la curva fue de 0,9 – 504 mg/L (figura 3.7).

Tabla 3.4: Parámetros de análisis de la curva de calibración sencilla de tanino de quebracho.

Curva de calibración	Pendiente (m) [Abs.L/mg]	Intercepto (b) [Abs]	r ²	LD [mg/L]	LQ [mg/L]
Equivalentes de tanino de quebracho	0,0031 ± 0,0001	0,0274 ± 0,0185	0,9977	0,0135	0,0451

(R²= cuadrado del coeficiente de correlación lineal, LD= límite de detección, LQ= límite de cuantificación)

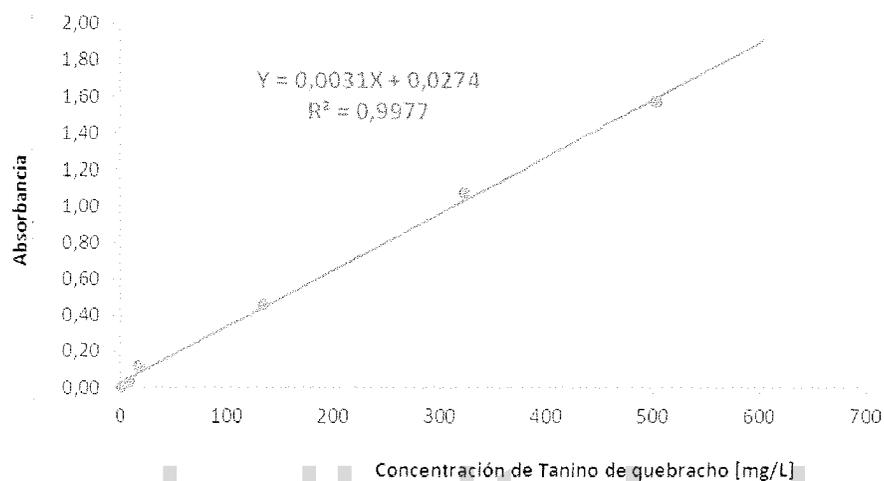


Figura 3.7: Curva de calibración sencilla de fenólicos totales como equivalentes de tanino de quebracho (0,9 – 504 mg/L) (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para cada patrón, N = 3).

En la figura 3.8 se muestra el contenido de fenólicos totales lixiviados por gramo de biomasa por etapa (también ver Anexo C, tabla C.2).

Se puede observar que los cayados y la hojarasca presentaron los menores valores de fenólicos totales (significativamente diferentes, $P < 0,05$, test de Kruskal-Wallis). El contenido de estos compuestos aumentó significativamente en la 2E y 3E fenológica (sin diferencias significativas entre sí, $p > 0,05$, test de Kruskal-Wallis) para luego disminuir progresivamente.

Para poder evaluar la actividad fitotóxica de los MA y determinar posibles correlaciones con estos compuestos, es importante conocer que, en términos de unidades de

concentración en equivalentes de tanino de quebracho, el contenido de fenólicos totales varía entre 0,2 – 721 mg/L en los individuos estudiados (anexo D, tabla D.2 y figura D.2).

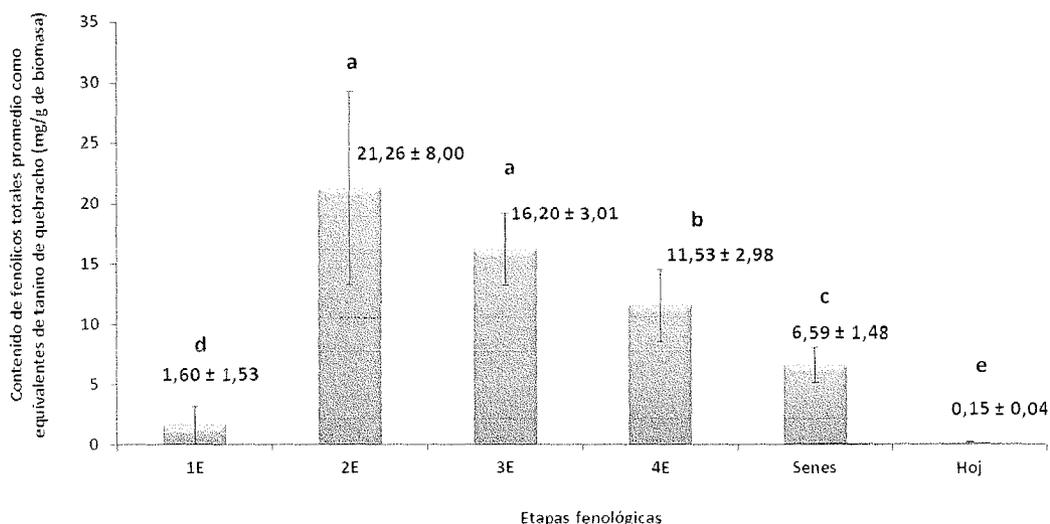


Figura 3.8: Contenido de fenólicos totales (en equivalentes de tanino de quebracho) en los MA de *P. caudatum* en las diferentes etapas fenológicas (Las barras indican la desviación estándar de los promedios, N = 10. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

3.2.3.2.- Esporas y rizomas

Se determinó la presencia de fenólicos en los MA de esporas y rizomas (N = 8) ([Fenólicos totales] << LQ = 0,0451 mg/L).

3.3.- Cuantificación de los metabolitos secundarios de interés en los EO de *P. caudatum*

3.3.1.- Cumarina

3.3.1.1.- Frondes

A) Porcentaje de extracción de cumarina de los frondes de *P. caudatum* siguiendo la metodología EO-6.

La metodología de obtención de los EO es la EO-6, aplicándose solo una vez (EXT1) a cada muestra. La determinación del porcentaje de extracción de cumarina en esa primera extracción es fundamental para validar la metodología diseñada y corregir los resultados

obtenidos. Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.3.2, los porcentajes de extracción son mostrados en la figura 3.9.

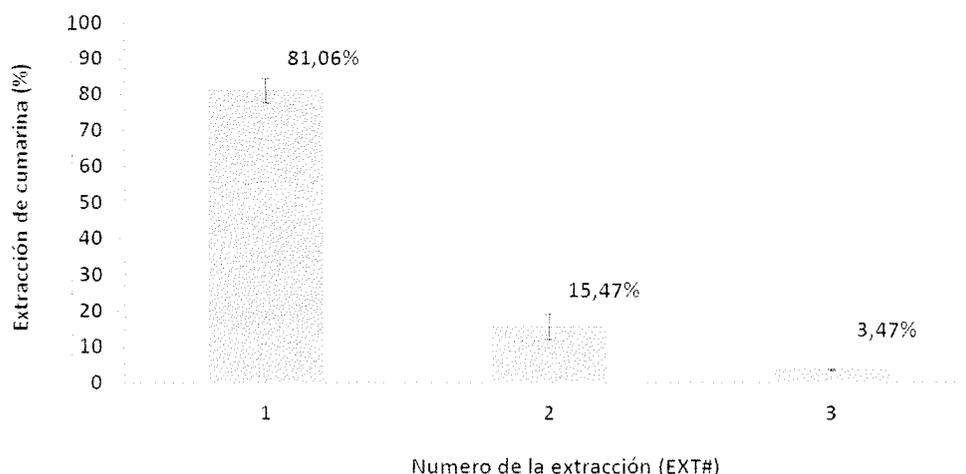


Figura 3.9: Porcentaje de extracción de cumarina realizando extracciones sucesivas (3 extracciones) al material de los frondes de *P. caudatum* (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para $N = 5$).

Con el primer tratamiento de la muestra EXT 1 se obtuvo un $(81,06 \pm 3,44)$ % del total de cumarina presente en los tejidos de los frondes. Este es un porcentaje aceptable de extracción y la diferencia con respecto a un 100% será el factor de corrección que se debe añadir a cada resultado si se desea conocer el contenido de cumarina exacto de cada individuo muestreado.

B) Porcentaje de recuperación (al usar Sep-Pak C18).

Luego de obtener los EO de los frondes estos fueron prepurificados siguiendo la metodología EO-6.4 (ver figura 2.4). El porcentaje de recuperación de la cumarina al pasarla por el Sep-Pak C18 fue de $(99,27 \pm 0,95)$ % confirmando que la fracción F2 es la fracción enriquecida.

Sin embargo, se determinó la cumarina eluída en la fracción siguiente F3 (100% MeOH) que pudo quedar retenida en el Sep-Pak. En la tabla 3.5 se muestra el factor de corrección correspondiente a la fracción F3 que se aplicó a cada etapa fenológica para estimar el contenido de cumarina.

Tabla 3.5: Factor de corrección aplicado al contenido de cumarina detectada en la fracción F2.

Etapa fenológica	Contenido de cumarina en F3 (%)*
Segunda etapa (2E)	0,85 ± 0,03
Tercera etapa (3E)	1,43 ± 0,23
Cuarta etapa (4E)	1,35 ± 1,35
Senescente	0,80 ± 0,07

*Estos valores se calcularon relativos al contenido de cumarina eluida en F2 (el error corresponde a la desviación estándar para N = 2).

C) Contenido de cumarina en los frondes

Se aplicó la metodología de obtención de los EO de los frondes descrita en la sección 2.3.2 (figura 2.3: Metodología EO-6).

Para la cuantificación de la cumarina, conociendo que el efecto de la matriz vegetal con los EO es despreciable al diluir cada fracción F2 en 40 veces, se usó una curva de calibración sencilla (#2). Esta se muestra en la figura 3.10 y en la tabla 3.6 se presentan los parámetros de linealidad correspondientes.

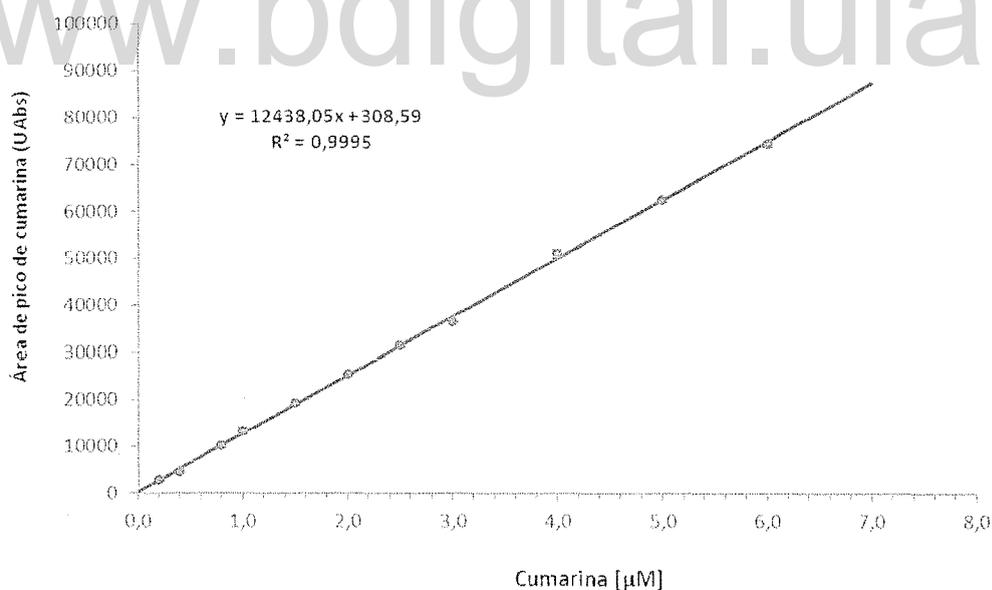


Figura 3.10: Curva de calibración sencilla #2 de cumarina patrón (0,2 - 6,0 µM) (Las barras de error corresponden a la desviación estándar para cada patrón, N = 3).

Tabla 3.6: Parámetros de análisis de la curva de calibración sencilla # 2 de cumarina patrón.

Curva de calibración	Pendiente (m) [UAbs/ μ M]	Intercepto (b) [UAbs]	r^2	LD [μ M]	LQ [μ M]
Calibración sencilla #2	12438,05 \pm 97,19	308,59 \pm 293,53	0,9995	0,06	0,20

(R^2 = cuadrado del coeficiente de correlación lineal. LD= límite de detección, LQ= límite de cuantificación)

Los resultados del análisis de los EO de los cayados indicaron que no se encuentra cumarina presente en los tejidos vegetales de los mismos.

En la figura 3.11 se comparan los valores promedios en contenido de cumarina por cada etapa fenológica (también ver Anexo C, tabla C.1).

No se observa una tendencia clara en la variación del contenido de cumarina en los tejidos de los frondes a medida que se desarrollan. La cantidad extraída en la 2E y 3E fenológica es significativamente diferente ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis) y no existen diferencias entre la 3E y 4E fenológica ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis). El contenido de cumarina en los frondes senescentes es menor que en las demás etapas.

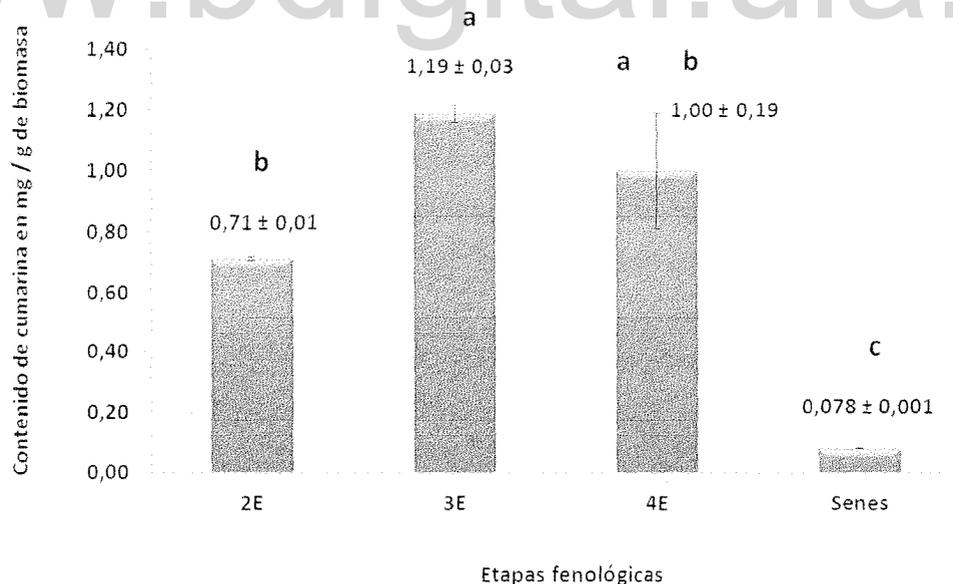


Figura 3.11: Contenido de cumarina en EO de frondes de *P. caudatum*. (Las barras indican la desviación estándar de los promedios, N = 10. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

3.3.1.2.- Esporas

En el EO de la muestra de esporas, se detectó cumarina a nivel de trazas ($< 0,06 \mu\text{M}$) en el tiempo de retención correspondiente a un patrón (7,67 min), como se muestra en la figura 3.12a. Esto se confirmó por coinyección con una muestra patrón, comparación del tiempo de retención, el espectro UV y el área de pico (ver figura C.1 en el anexo C).

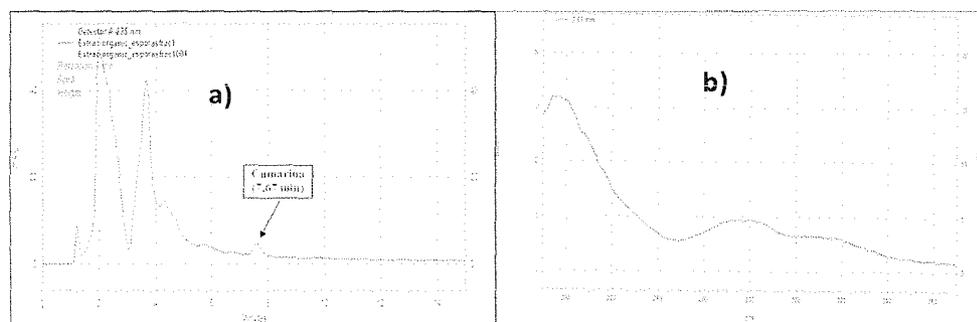


Figura 3.12: a) Cromatograma obtenido para el extracto orgánico de esporas de *P. caudatum*, obtenido con la metodología EO-2 y b) espectro UV del pico de cumarina a un tiempo de retención de 7,67 min.

3.3.1.3.- Rizomas

En las ocho muestras analizadas no se detectó cumarina.

3.3.2.- Fenólicos totales

3.3.2.1.- Frondes

En la figura 3.13 se presentan los resultados de la determinación del contenido de fenólicos totales (como equivalentes de tanino de quebracho) en los EO de *P. caudatum* según la etapa fenológica (ver también Anexo C, tabla C.2).

Se muestra que hubo un mayor contenido de fenólicos totales en las etapas más avanzadas de desarrollo (sin diferencias significativas entre sí, $p > 0,05$, test de Kruskal-Wallis). Este contenido se redujo considerablemente en las muestras de hojarasca en relación con las otras etapas fenológicas ($p < 0,05$, Test de Kruskal-Wallis).

3.3.2.2.- Esporas y rizomas

Se detectó la presencia de compuestos fenólicos en los EO de esporas y rizomas de *P. caudatum* ([Fenólicos totales] \ll LQ = 0,0451 mg/L).

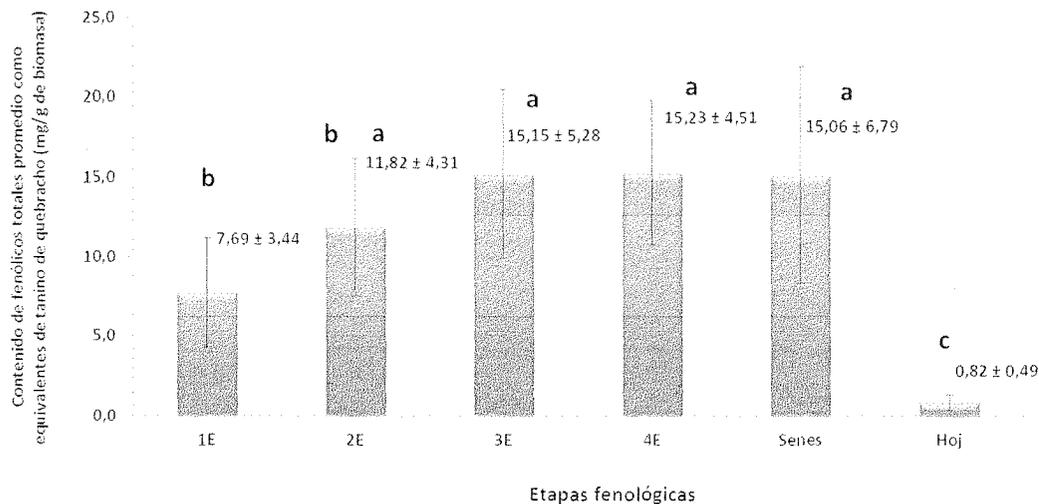


Figura 3.13: Contenido de fenólicos totales en los EO de frondes de diferentes etapas de desarrollo del *P. caudatum*. (Las barras representan la desviación estándar de los promedios, N = 10. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

3.4.- Determinación de la presencia de cumarina en muestras de suelo

Los resultados de los análisis de suelo indican que la cumarina no fue detectada en los extractos obtenidos siguiendo la metodología planteada en la sección 2.6 del capítulo 2.

Por otra parte, los resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de suelo indicaron que el porcentaje de humedad estuvo alrededor de un $(23,2 \pm 5,8)$ %, para todas las muestras tomadas durante el desarrollo de los frondes de *P. caudatum*, desde la 2E hasta los frondes en estado de hojarasca. La muestra tomada al inicio de la emergencia de los cayados (1E fenológica) registró un porcentaje de humedad menor al 1%.

En cuanto al análisis textural se encontró que todas las muestras son del tipo franco-arenoso y arena-francosa, con algunas en franco-arcilloso y arenoso-franco.

En la tabla 3.7 se muestran los valores del resto de los parámetros medidos para caracterizar el suelo en estudio.

Tabla 3.7: Parámetros medidos para caracterizar el suelo de la parcela en estudio.

Parámetro	Potasio (ppm)		Calcio (ppm)	
	Contenido	Contenido promedio	Contenido	Contenido promedio
Etapa en desarrollo♣				
1 era etapa*	34,0		100,0	
2da etapa	80,7 ± 14,2		37,0 ± 19,5	
3 era etapa	93,3 ± 15,0	60,0 ± 24,1 (nivel medio a bajo)	59,7 ± 3,5	73,7 ± 27,0 (nivel bajo)
4 ta etapa	58,3 ± 24,1		61,7 ± 7,5	
Senescente	59,7 ± 30,1		74,7 ± 23,0	
Hojarasca	34,0 ± 16,5		109,3 ± 29,7	
Parámetro	Magnesio (ppm)		Fosforo Olsen (ppm)	
Etapa en desarrollo♣	Contenido	Contenido promedio	Contenido	Contenido promedio
1 era etapa*	49,0		6,0	
2da etapa	47,0 ± 21,8		12,0 ± 1,0	
3 era etapa	53,7 ± 6,0	45,2 ± 6,6 (nivel bajo)	12,3 ± 2,3	10,6 ± 2,4 (nivel bajo)
4 ta etapa	46,7 ± 7,1		11,7 ± 1,5	
Senescente	35,7 ± 18,8		11,3 ± 2,1	
Hojarasca	39,0 ± 7,5		10,0 ± 1,7	
Parámetro	Materia Orgánica (%)		pH (1:2,5)	
Etapa en desarrollo♣	Contenido	Contenido promedio	Valor	Valor promedio
1 era etapa*			4,4	
2da etapa			4,9 ± 0,1	
3 era etapa	Mayor a 6,9 en todos los casos		5,0 ± 0,1	4,8 ± 0,2 (ácido)
4 ta etapa			4,9 ± 0,1	
Senescente			4,7 ± 0,1	
Hojarasca			4,9 ± 0,1	

♣Etapa en desarrollo de los frondes de *P. caudatum* durante el muestreo del suelo.

*En la primera etapa fenológica la N = 1 y en el resto de las etapas N = 3.

3.5.- Bioensayos

3.5.1.- Actividad fitotóxica sobre *L. sativa* en placas de petri de los MA de *P. caudatum*

3.5.1.1.- Actividad fitotóxica de las pterosinas A y B patrones

En la figura 3.14 se muestran los resultados en cuanto a la actividad de las pterosinas A y B patrón sobre la elongación del tallo y la raíz de *L. sativa*, en comparación con la cumarina y un herbicida comercial (Linurón), en el rango de concentraciones presentes en los MA de los frondes de 1E y 2E fenológica de *P. caudatum*.

Los resultados indican que la cumarina inhibe el crecimiento del tallo y de la raíz en mayor proporción que el herbicida, observándose que el efecto inhibitorio para éste es notable a partir de 20 μM . Las pterosinas mostraron un comportamiento similar entre si, frente a la elongación del tallo y de la raíz tanto individualmente como combinadas. No se observó actividad sobre el crecimiento a las concentraciones medidas en los MA de *P. caudatum* (entre 0,2 – 6 μM) (Anexo D, tabla D.3 y tabla D.4).

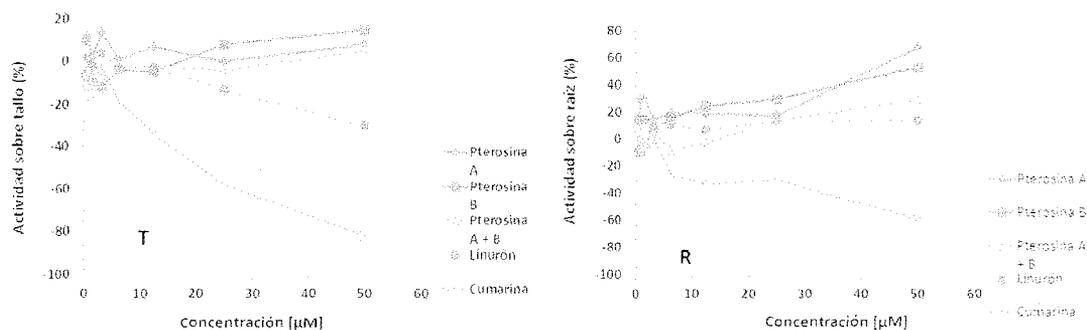


Figura 3.14: Actividad fitotóxica de las pterosinas A, B, cumarina y Linurón sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) de plántulas de *L. sativa*.

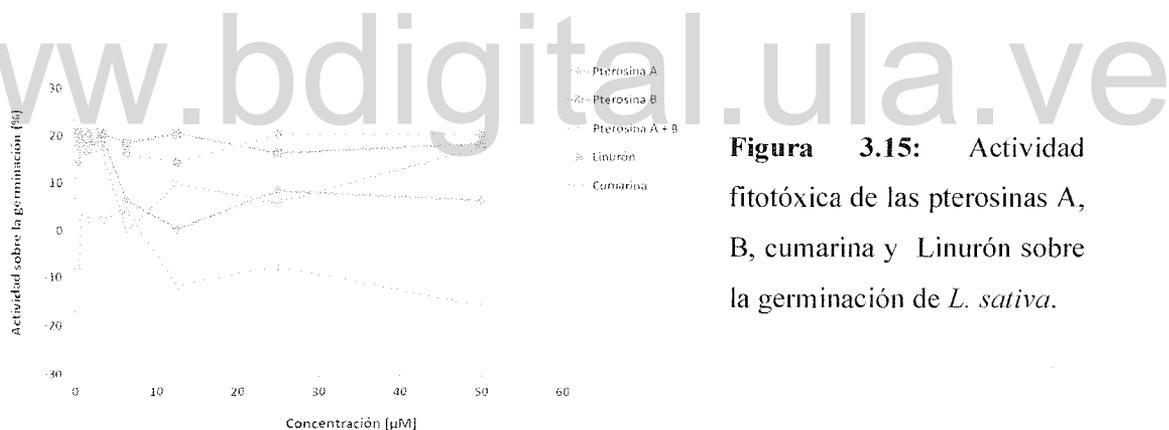


Figura 3.15: Actividad fitotóxica de las pterosinas A, B, cumarina y Linurón sobre la germinación de *L. sativa*.

En cuanto a la germinación (figura 3.15), se observa que solo la combinación de pterosina A y B muestra un efecto inhibitorio y éste no excede el 20%. Sin embargo, en comparación con la respuesta estimuladora de la cumarina y del herbicida Linurón, así como de las pterosinas A y B individualmente, es de importancia el resultado obtenido, aunque no se haya producido por debajo de 6 μM de concentración, que corresponde con los valores determinados en los MA de *P. caudatum* (ver tabla D.3, anexo D).

3.5.1.2.- Actividad fitotóxica de la cumarina patrón

En la figura 3.16 se muestran las correlaciones de la actividad observada sobre la elongación del tallo (T) y de la raíz (R) de *L. sativa*, así como sobre la germinación (G), en función de la concentración de cumarina patrón en el rango de concentraciones de 0,1 – 200 µM (ver sección 2.7.1.2).

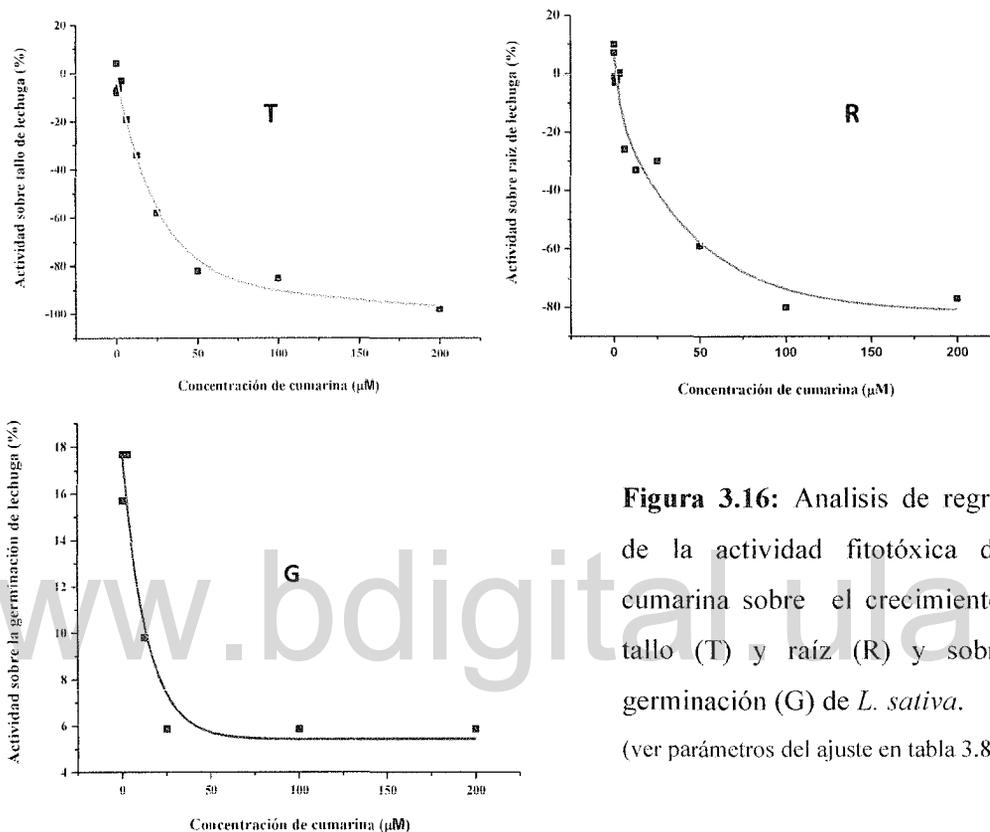


Figura 3.16: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de la cumarina sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) y sobre la germinación (G) de *L. sativa*. (ver parámetros del ajuste en tabla 3.8).

El comportamiento inhibitorio de la respuesta es un decrecimiento exponencial de la actividad con el aumento de la concentración de cumarina, de acuerdo con el análisis de regresión. La función matemática que mejor se ajustó a esta respuesta es la siguiente:

$$y = y_0 + A * e^{\frac{-x}{t}} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

Y = actividad.

Y_0 = Actividad máxima (cuando la dosis tiende al infinito).

A = Amplitud del rango de actividad desde concentración cero a un valor infinito (%).

t = tiempo de respuesta.

X = Concentración o dosis.

Esto se demuestra con el coeficiente de correlación (r^2), del ajuste de la curva a los datos obtenidos siendo para el tallo y la raíz 0,98 y 0,94, respectivamente (tabla 3.8). En esta tabla también se muestran los parámetros que toma la función (Y_0 , A, t_1) para cada grupo de datos.

3.5.1.3.- Actividad fitotóxica de los MA de *P. caudatum*

Con cada MA de los individuos muestreados de 2E, 3E y 4E fenológica de *P. caudatum*, así como para individuos senescentes, se realizó un bioensayo de fitotoxicidad, según lo descrito en la sección 2.7.1.3, usando como especie receptora lechuga. Los resultados detallados de los bioensayos se muestran en el anexo D (Tabla D.2).

En la figura 3.17 se muestran los gráficos de correlación de la actividad fitotóxica de los MA de los frondes de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo y la raíz y sobre la germinación de *L. sativa*, en función de la concentración de cumarina en los MA.

En estos resultados se observa, que la respuesta del crecimiento del tallo y la raíz de *L. sativa* es de carácter inhibitoria, con un decrecimiento de tipo exponencial de la actividad con el aumento de la concentración de cumarina, siguiendo una tendencia similar en los MA de los frondes de 2E, 3E y 4E. Sin embargo, los frondes senescentes se salen de la tendencia general de las otras etapas fenológicas (puntos dentro del óvalo en el gráfico), pues aunque presentan menor concentración de cumarina la respuesta es mucho más inhibitoria con estos que con los frondes de las otras etapas fenológicas que presentaron las mismas concentraciones.

En cuanto a la germinación, el efecto de los MA sobre este parámetro no es claro en relación a la cumarina presente, pues existe una dispersión de los datos y no hay una tendencia en la respuesta de acuerdo a la concentración. Sin embargo, un aspecto notable es que la mayoría de los individuos, en todas sus etapas, mostraron una respuesta estimuladora sobre la germinación.

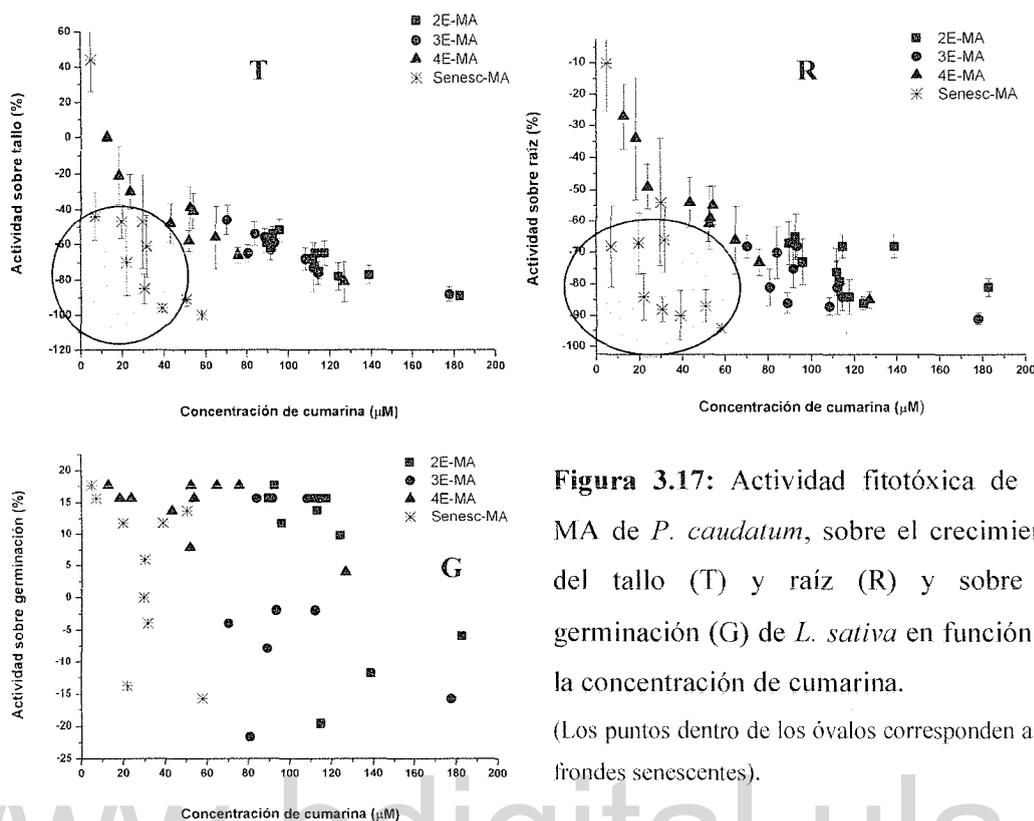


Figura 3.17: Actividad fitotóxica de los MA de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) y sobre la germinación (G) de *L. sativa* en función de la concentración de cumarina. (Los puntos dentro de los óvalos corresponden a los frondes senescentes).

Como la actividad fitotóxica medida sobre el crecimiento de *L. sativa* puede no ser solo debida a la cumarina presente en los MA, es importante evaluar esta actividad tomando en cuenta el contenido de compuestos fenólicos que se encuentran presentes y que, de acuerdo con los antecedentes, se les ha reportado actividad fitotóxica (Oliveros, 1998; Jimenez et al., 2008).

En la figura 3.18 se muestra la correlación de la actividad de los MA de los frondes de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo y la raíz, así como sobre la germinación de *L. sativa*, en función del contenido de fenólicos totales (ver anexo D, tabla D.2).

En este caso, se observa que la respuesta del crecimiento del tallo y la raíz de *L. sativa* es inhibitoria y se ajusta a un decrecimiento exponencial con el aumento del contenido de fenólicos totales, aunque existe una dispersión alta en los datos. Los MA de los frondes senescentes (ovalo en la figura 3.18) presentan el mayor contenido de fenólicos totales y la actividad inhibitoria se ubica en los valores maximos observados formando parte de la tendencia general dentro de un rango de actividad entre -100 a -50 % (puntos dentro de los recuadros).

En cuanto a la germinación (G), existe una alta dispersión de los datos y no hay una tendencia en la respuesta acorde al contenido de fenólicos totales.

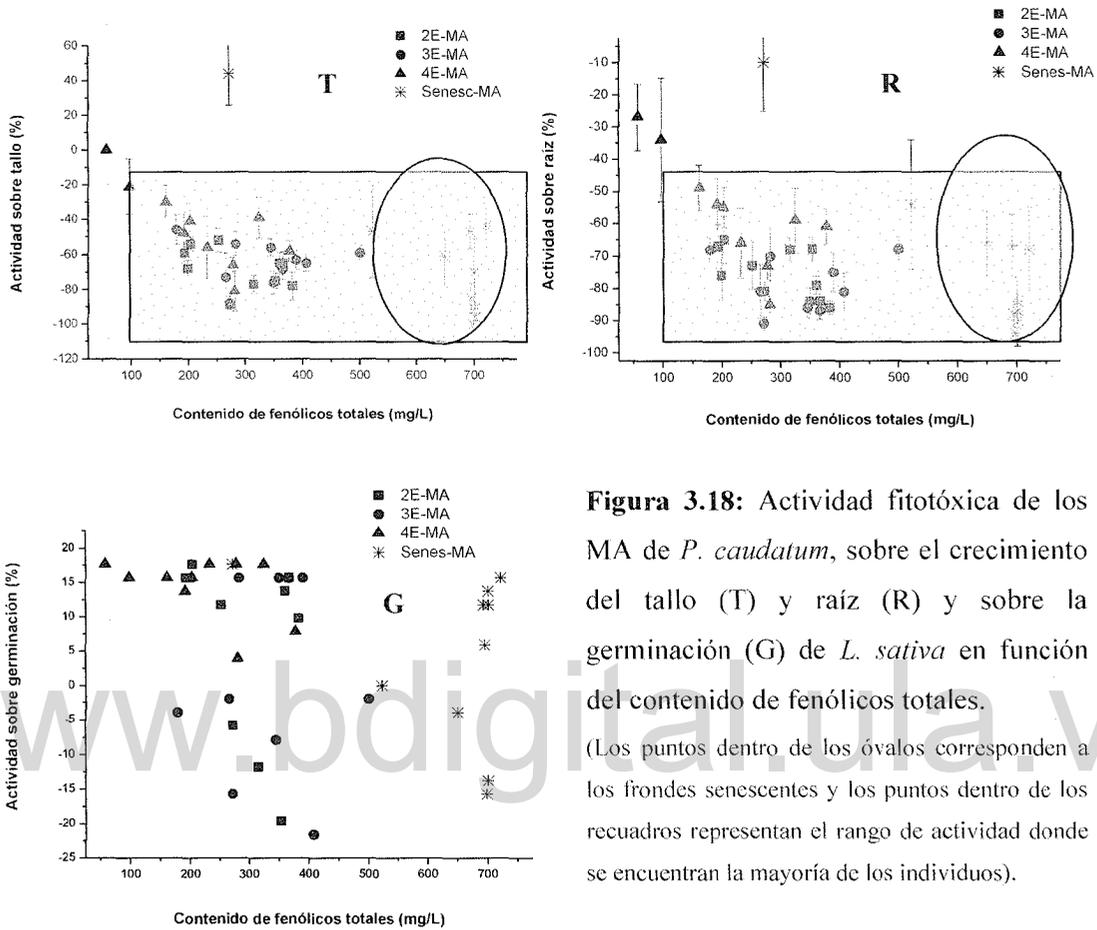


Figura 3.18: Actividad fitotóxica de los MA de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) y sobre la germinación (G) de *L. sativa* en función del contenido de fenólicos totales.

(Los puntos dentro de los óvalos corresponden a los frondes senescentes y los puntos dentro de los recuadros representan el rango de actividad donde se encuentran la mayoría de los individuos).

Con el fin de establecer el nivel de correlación de la actividad observada para el crecimiento del tallo y la raíz de *L. sativa* con la concentración de cumarina y el contenido de fenólicos totales, se realizó el análisis de regresión aplicando la ecuación matemática 3 (Ec. 3) para evaluar el ajuste de la curva a los datos obtenidos y establecer una comparación con el ajuste obtenido para la cumarina patrón (figura 3.16).

En la figura 3.19 se muestran los gráficos del ajuste de la curva de la actividad mostrada por los MA de los frondes de 2E, 3E y 4E fenológica y de los frondes senescentes.

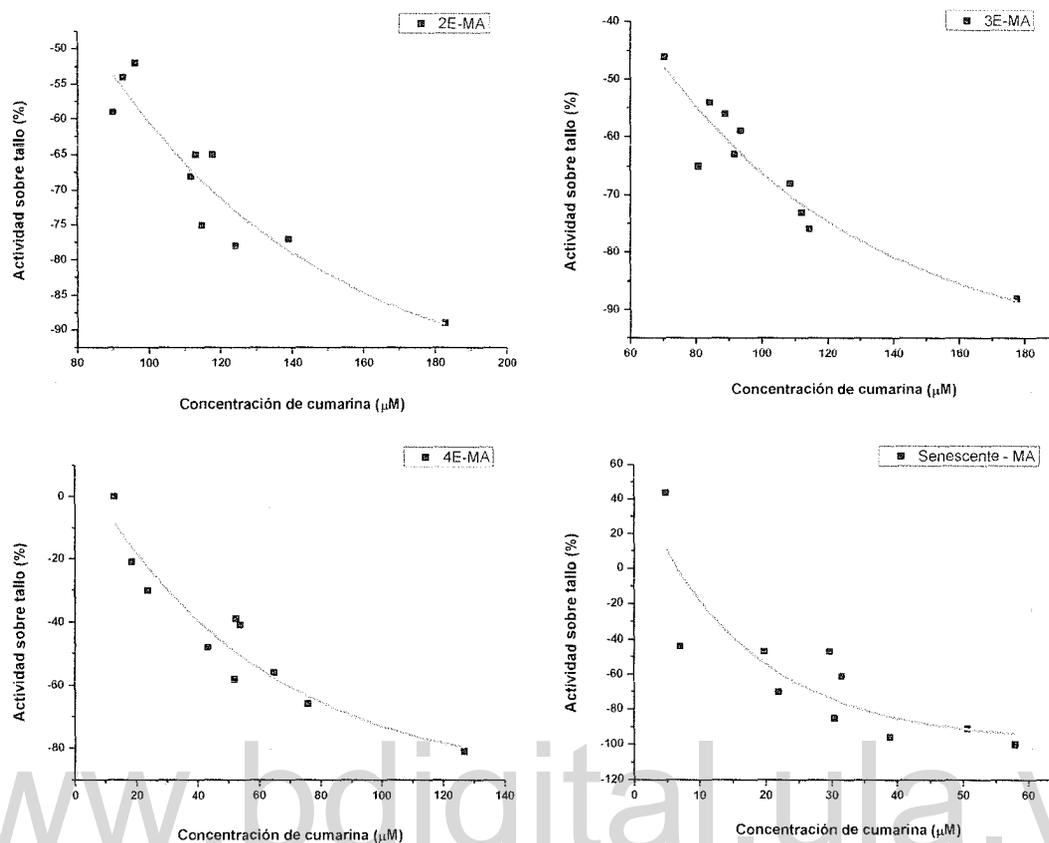


Figura 3.19: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de los MA de los frondes de 2E, 3E y 4E y de los frondes senescentes de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo de *L. sativa* en función de la concentración de cumarina.

Los valores de los parámetros de ajuste de la actividad en función de la concentración de cumarina se presentan en la tabla 3.8. Solo se muestran los ajustes para la respuesta del tallo, pues en la raíz, al estudiar los resultados para cada etapa por separado, no hubo correlación debido a la alta dispersión de los datos.

De acuerdo los parámetros de ajuste de las curvas a los datos en todas etapas, se observa que los MA muestran una actividad fitotóxica mayor que la mostrada por la cumarina patrón de acuerdo con Y_0 . Así también, la amplitud del rango de la actividad (A) de los MA es superior, lo cual va en concordancia con lo observado en Y_0 , pues a mayores valores de este parámetro, la amplitud aumenta.

Tabla 3.8: Parámetros de ajuste de la función matemática que mejor describe la actividad y coeficientes de correlación para la actividad en función de la concentración de cumarina.

CUMARINA								
Etapa fenológica	TALLO				RAIZ			
	Y0	A	t	r ²	Y0	A	t	r ²
Cum-patrón	-94,36	92,92	28,21	0,98	-78,70	80,99	32,22	0,94
2E	-99,55	193,79	62,43	0,86	NO HAY CORRELACIÓN			
3E	-98,11	148,42	65,04	0,87				
4E	-91,19	103,18	57,78	0,90				
Senes	-98,53	145,65	16,88	0,73				
2E-3E-4E	-101,94	100,27	97,68	0,87				
					-86,64	72,96	51,22	0,83

*Ecuación 3: $y = y_0 + A * e^{-\frac{x}{t}}$

Finalmente, en el caso del tiempo de respuesta, es notable que el tallo de *L. sativa* responde mas lentamente al efecto de los MA de los frondes en desarrollo de *P. caudatum* que a la cumarina patrón. Exceptuando de este hecho a los frondes senescentes donde la velocidad de respuesta es mucho mayor.

La raíz de *L. sativa* no mostró un comportamiento que permitiera lograr un coeficiente de correlación aceptable para los MA de los frondes verdes y los senescentes en comparación con la cumarina patrón.

3.5.2.- Efectos de la cumarina patrón sobre lechuga (*Lactuca sativa*) en bioensayos en medio hidropónico

3.5.2.1.- Absorción de cumarina por las plántulas de *L. sativa*

Los resultados de este estudio indican que la cumarina es absorbida tanto por la radícula como por el tallo de las plántulas, pues esta fue detectada en los tejidos aun después del lavado de las mismas con agua destilada.

En la figura 3.20 se muestra el contenido de cumarina encontrado en el tallo de *L. sativa* durante cada día del tratamiento. El ajuste de la curva, en un análisis de regresión, indica que la máxima absorción de cumarina por las plántulas se alcanza en el séptimo día, la cual crece durante los primeros 6 días y luego de alcanzar un valor máximo, decrece desde el octavo día hasta alcanzar valores mínimos entre los días 14 y 16.

De acuerdo con esto, parece que la cumarina es absorbida por las plántulas de *L. sativa* a través del tallo.

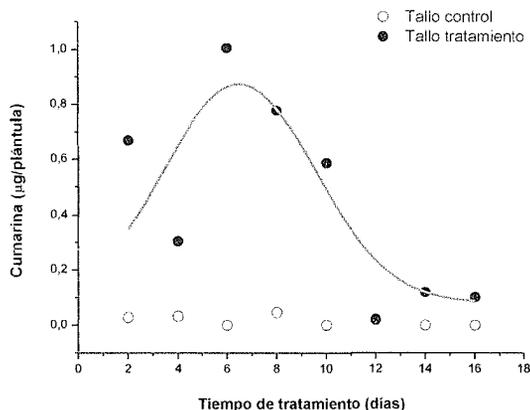


Figura 3.20: Contenido de cumarina encontrada en los tallos de *L. sativa* a diferentes días de estudio.

En cuanto a la raíz, en la figura 3.21 se muestra el contenido de cumarina encontrado en estos tejidos de las plántulas. De acuerdo con esto, la absorción máxima se alcanza al octavo día de tratamiento y presenta un comportamiento gaussiano como el observado en el tallo. Igualmente, parece que las plántulas también absorben la cumarina a través de estos tejidos, a menos que exista algún proceso de translocación interno. La relación de contenido máximo de cumarina encontrada en los tejidos de las plántulas de *L. sativa* es 3,9 veces más alta en tallo que en raíz, lo que podría ser una resultado lógico, siendo la raíz un órgano de tránsito, más que de almacenamiento, de agua y nutrientes.

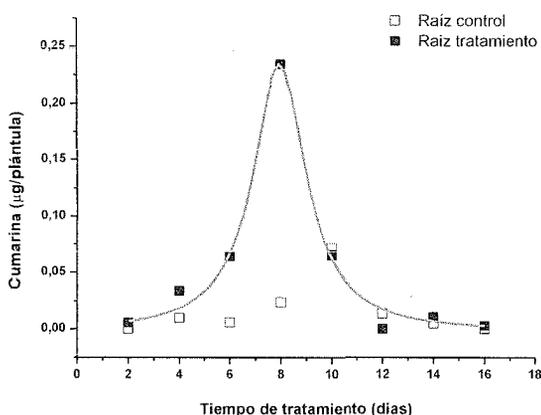


Figura 3.21: Contenido de cumarina encontrada en las radículas de *L. sativa* a diferentes días de estudio.

En general, en este experimento es importante señalar que las plántulas se marchitaron a partir del doceavo día de tratamiento, tomando una coloración marrón, dificultando su manipulación.

3.5.2.2.- Absorción de cumarina por la radícula en *L. sativa*

Este bioensayo se diferencia del anterior en que las plántulas solo estuvieron en contacto con la cumarina a través de la radícula. Los resultados demuestran que la cumarina no fue detectada en las plántulas, a pesar de que las muestras fueron concentradas (x 4) para el análisis por HPLC. Esto indica que posiblemente la cumarina no es absorbida por la radícula.

3.5.2.3.- Efecto de la cumarina sobre el crecimiento de *L. sativa*

En este estudio preliminar, el efecto de la cumarina, a dos concentraciones diferentes y a tiempos prolongados de tratamiento, ha sido notable. Aunque estadísticamente a 200 μM de cumarina y 16 días de tratamiento (figura 3.22), no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento, en la figura 3.23 se puede apreciar de manera cualitativa que hubo un efecto en el desarrollo.

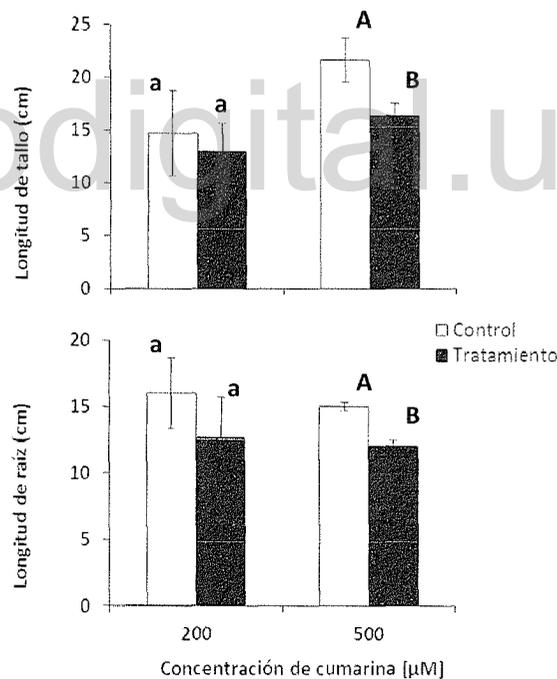


Figura 3.22: Efecto sobre el crecimiento de *L. sativa* de la cumarina patrón en bioensayos en medio hidropónico (N = 3 en el estudio a 200 μM ; N = 5 y N = 3 en control y tratamiento del estudio a 500 μM respectivamente; letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p < 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).



Figura 3.23: Plántulas de *L. sativa*, control y tratamiento, luego de 16 días expuestas a una concentración de cumarina de 200 μM .

Para el experimento a 500 μM , se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento a 29 días de exposición (figura 3.22).

En este caso es posible apreciar las diferencias en el crecimiento del tallo y la radícula en la figura 3.24. La radícula de *L. sativa* fue afectada tanto en longitud como en firmeza, pues durante la manipulación fue evidente el grado de hinchamiento de las mismas en comparación con las del control y su rompimiento era muy fácil.

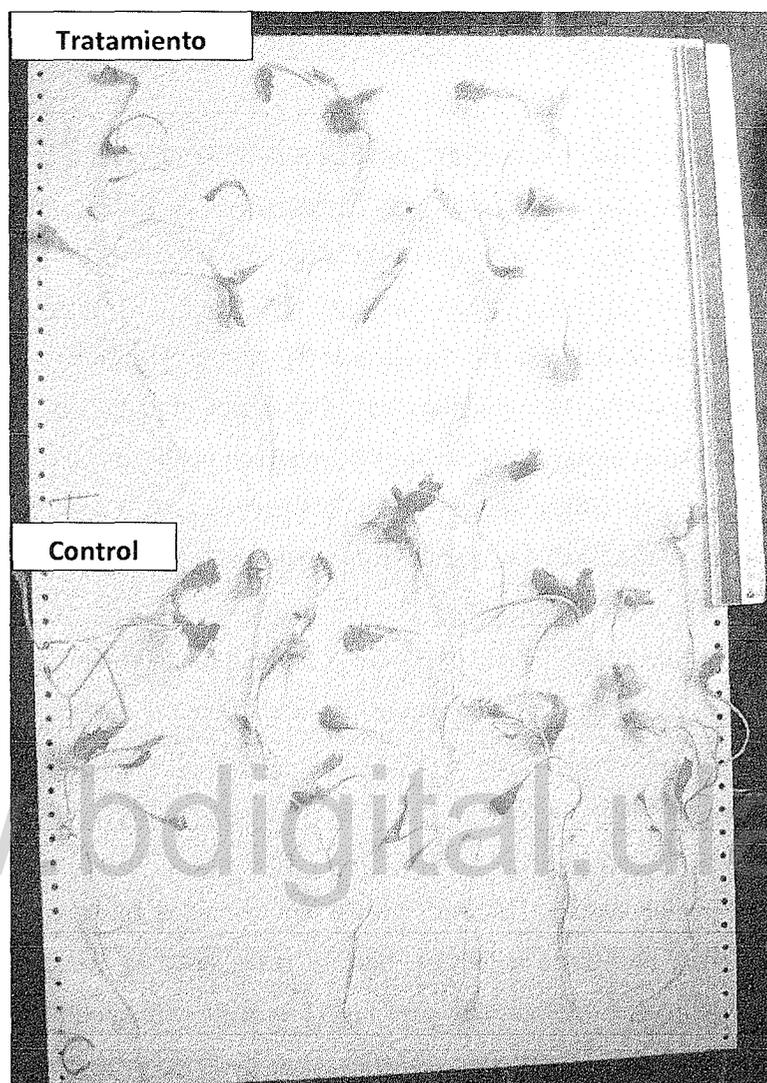


Figura 3.24: Plántulas de *L. sativa*, control (C) y tratamiento (T), luego de 29 días expuestas a una concentración de cumarina de 500 μ M.

Tanto la concentración como el tiempo de exposición fueron cambiadas, por lo cual un estudio mas exhaustivo manteniendo constante el tiempo de exposición y evaluando el crecimiento en función de la concentración cumarina, reflejaría a partir de que nivel es apreciable el efecto que este compuesto ejerce sobre el desarrollo de *L. sativa*.

En ambos experimentos se analizaron los extractos orgánicos de las plántulas y no fue posible la detección de cumarina en los tejidos.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1.- Seguimiento del desarrollo de una población de *P. caudatum*

Con el fin de normalizar la población de *P. caudatum* de estudio, para la posterior selección de los individuos a estudiar, se realizó el seguimiento del desarrollo tomando como parámetro principal la elongación del raquis (Lr). En el neotrópico, las especies del género *Pteridium* se distribuyen principalmente en zonas expuestas a la intervención humana (Alonso-Amelot y Rodolfo-Baechler, 1996), sin embargo, el sitio de trabajo seleccionado, además de presentar la ventaja de contar con una población homogénea de *P. caudatum*, también se encuentra delimitado, minimizando la intervención humana.

Los resultados obtenidos indican que la población de *P. caudatum* (1990 msnm) es comparable, en cuanto a la velocidad de elongación del fronde, con otra población previamente estudiada a una altitud de 1950 msnm (Alonso-Amelot et al., 1999). Se observa que la velocidad de elongación aumenta paulatinamente durante el desarrollo del cayado (1era etapa), alcanzando un máximo al inicio de la 2E fenológica para luego disminuir progresivamente a lo largo del desarrollo del fronde hasta la cuarta etapa fenológica.

Alonso-Amelot y colaboradores (1999) describen una velocidad máxima de elongación de $4,11 \pm 0,16$ cm/día alcanzada a los 10 días. En este caso, la máxima velocidad de elongación fue de $4,58 \pm 0,20$ cm/día, para los 12 días de crecimiento; en ambos casos corresponde al final de la primera etapa, cayados, (cuando toda la energía de desarrollo del fronde emergente está concentrada en el crecimiento del eje vertical), e inicio de la segunda etapa (donde se inicia la expansión de la primera lámina foliar). Es de suma importancia que la planta alcance una altura adecuada antes de desplegar sus frondes para asegurar una óptima recepción de la luz y así favorecer la fotosíntesis necesaria para completar su desarrollo (Alonso-Amelot et al., 1999).

Los frondes de *P. caudatum* alcanzaron su desarrollo completo entre los 50 y 54 días con una longitud de raquis máxima de $137,7 \pm 22,12$ cm. En comparación con el anterior estudio en el cual alcanzó una longitud de raquis de $(94,47 \pm 1,68)$ cm entre los 40 y 45 días, esta población alcanzó una altura mayor lo cual puede estar asociado con la mayor velocidad de elongación de 4,58 cm/día observada al inicio del crecimiento de los frondes.

Las diferencias observadas pueden estar asociadas con el tipo de suelo y las condiciones climatológicas. Es importante notar que el desarrollo de la población es posterior a un corte total de la vegetación en la parcela. El estudio de Alonso-Amelot y colaboradores (1999) fue realizado en una población que emergió después de un incendio que eliminó toda la vegetación. Esto produce una diferencia sustancial en la composición del terreno y en las diferentes competencias entre especies. Al final del estudio, se observó una población homogénea en cuanto a la etapa fenológica pues todos los individuos se encontraron completamente desarrollados, con escasa presencia de nuevos cayados o frondes en etapas inferiores de desarrollo.

4.2.- Cuantificación de cumarina, pterosinas y fenólicos totales en *P.caudatum*

4.2.1.- Cumarina

Los estudios realizados hasta la fecha en el género *Pteridium* han estado enfocados en los metabolitos secundarios más abundantes y en cuanto al *P.caudatum*, ha sido más lo reportado con respecto a los metabolitos secundarios presentes pertenecientes a la familia de los terpenos como el ptaquilosido y las pterosinas, a la familia de los compuestos fenólicos y de los compuestos nitrogenados como la prunasina (glicósido cianogénico), pues son los compuestos que han sido asociados a interacciones bióticas y carcinogenicidad, produciendo un impacto ecológico más evidente (Alonso-Amelot et al., 1995; Alonso-Amelot, 1999; Oliveros et al., 1999; Alonso-Amelot y Oliveros, 2000; Alonso-Amelot, 2002; Rasmussen et al, 2003). La cumarina fue reportada por primera vez en los frondes de *P.caudatum* en el trabajo de Alonso-Amelot y colaboradores (1995).

El estudio desarrollado aquí se ha centrado en la variación cuantitativa de la cumarina, de acuerdo con el desarrollo fenológico en el *P.caudatum*, tanto en los macerados acuosos (MA) como en los extractos orgánicos (EO) del primer par de pinas de los frondes.

Para evaluar la posibilidad de que las precipitaciones, antes de cada muestreo, pudieran influir en los resultados debido a la lixiviación de los metabolitos y, en consecuencia, producir una disminución de su concentración, se relacionó la precipitación promedio de cinco días antes de cada muestreo con el contenido de cumarina en los MA de los frondes (Figura A.5, Anexo A). Como se observa en la figura 4.1, las precipitaciones no parecen producir una disminución del contenido de cumarina en los MA, sino que por el contrario este es mayor en los muestreos donde ocurrió mayor precipitación, lo cual pudiera indicar

que el contenido de cumarina se relaciona con la etapa de crecimiento y además la posible existencia de un eficiente mecanismo de reposición del metabolito en la superficie foliar.

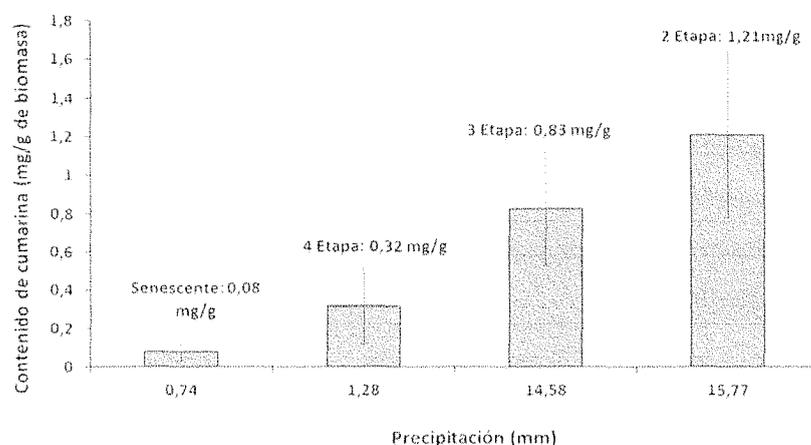


Figura 4.1: Correlación de las precipitaciones en los cinco días previos a la fecha de muestreo y el contenido de cumarina en los MA de los frondes según su etapa fenológica.

En la tabla 4.1 se resumen el contenido de los metabolitos analizados. El hecho de que no se encontrara cumarina en los MA ni en los EO de los cayados, estaría indicando que su producción se inicia en etapas posteriores, quizás con el despliegue del primer par de pinas. El contenido total de cumarina (MA + EO), en el primer par de pinas, es máximo cuando el fronde se encuentra en sus etapas fenológicas 2 y 3 (figura 4.2 y anexo C, tabla C.3), sin diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis). El contenido máximo de cumarina es de $2,02 \pm 0,33$ mg/g de biomasa.

Este disminuye significativamente ($p < 0,05$; test de Kruskal-Wallis) al llegar a la cuarta etapa, para casi desaparecer durante la senescencia. Podría explicarse este hecho por la disminución de la actividad fotosintética en la pina madura, a la movilización de la cumarina o a la transformación de ésta en otros metabolitos. Es necesario otros estudios para poder concluir al respecto.

En cuanto a los MA, los resultados indican que la cumarina extraída (que sería la lixiviada por las precipitaciones) disminuye a medida que el fronde avanza hacia su madurez (figura 4.2). En los frondes verdes, la proporción de cumarina potencialmente lixiviable respecto a la cumarina que se extrae de los tejidos (MA/EO) disminuye inversamente proporcional a la madurez de la pina: 2E (1,71) > 3E (0,70) > 4E (0,32).

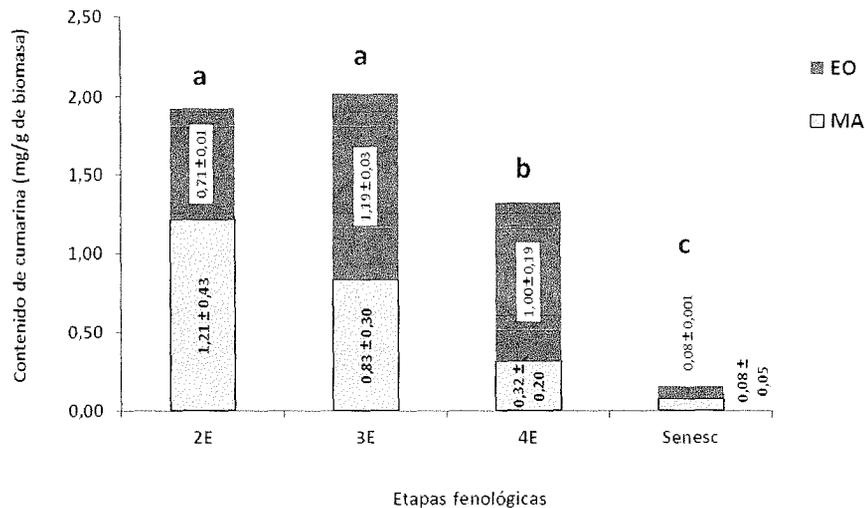


Figura 4.2: Contenido de cumarina promedio en MA y en EO de los frondes de *P. caudatum* muestreados (la desviación estandar corresponde a N=10; Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

La producción y acumulación de lignina que ocurre durante el proceso de maduración de las pinas de los frondes, la cual provee de mayor rigidez a las paredes celulares (Alonso Amelot et al., 2001; Cseke et al., 2006) podría estar impidiendo que la cumarina y otros metabolitos secundarios que se encuentran dentro de las células, sean lixiviados con facilidad.

Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que al estar expuestas las pinas a la precipitación durante su desarrollo, parte de la cumarina sea lixiviada y por ello se observa un menor contenido en los MA.

En cuanto al contenido de cumarina en los MA y EO de los frondes senescentes, éste resultó igual. En esta etapa de desarrollo la biosíntesis de cumarina se ha detenido, debido a que ya no ocurre el proceso fotosintético.

Finalmente, la cumarina no fue detectada en los MA ni en los EO de los rizomas, lo que permite deducir que no es almacenada en estos tejidos. Sin embargo, en los MA y EO de las esporas ésta sí fue detectada, por lo que su presencia en estas estructuras se puede asociar a que parte de la cumarina del fronde en su etapa madura (que es cuando inicia la esporulación) las impregna, o a que es almacenada para darles protección una vez que estas esporas se desprenden del fronde y caen en el suelo, donde la disponibilidad de recursos y

la influencia de otros organismos pueden afectar el desarrollo exitoso de estas estructuras reproductoras. En cuanto a los compuestos químicos mayoritarios, que son exudados por los rizomas y los que podrían estar presentes en las esporas de las especies de *Pteridium*, se conoce muy poco sobre la fitoquímica.

Como lo han mencionado algunos autores (Jansson et al., 1980; Brown, 1981), la cumarina es un compuesto con múltiples efectos fisiológicos sobre las especies de plantas receptoras y son generalmente de carácter estimulatorio a bajas concentraciones e inhibitorios a altas concentraciones. Resta evaluar la actividad fitotóxica de este compuesto en los MA para poder establecer correlaciones claras.

4.2.2.- Pterosinas

Se determinó el contenido de pterosinas A y B en los MA de *P. caudatum* en sus dos primeras etapas de desarrollo. Se observó en el caso de la pterosina B un decrecimiento: cayados = $69,74 \pm 62,32 \mu\text{g/g}$ de biomasa y en frondes de 2da etapa = $46,86 \pm 24,15 \mu\text{g/g}$ de biomasa, aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas. En cuanto a la pterosina A se observó un aumento del contenido al avanzar el desarrollo de los frondes de cayados ($14,69 \pm 9,35 \mu\text{g/g}$ de biomasa) a 2da etapa ($36,75 \pm 19,65 \mu\text{g/g}$ de biomasa).

Ya en trabajos previos (Alonso-Amelot et al., 1992; Alonso-Amelot et al., 1995) se determinó que el contenido de pterosina B disminuyó en los frondes a medida que estos avanzaban hacia la madurez. Sin embargo, la pterosina A mostró un contenido casi constante en los frondes durante los primeros 20 días de desarrollo, luego disminuyó para finalmente aumentar cuando el fronde llegó a su completo desarrollo (Alonso-Amelot et al., 1992).

4.2.3 Fenólicos totales

Los compuestos fenólicos son sintetizados en plantas no solo bajo determinantes genéticos, demandas fisiológicas y necesidades de defensa controladas por la evolución, sino también por la influencia del estrés ambiental tales como perturbaciones, sequías y la radiación electromagnética. Se ha demostrado que la síntesis y acumulación de los derivados fenólicos en los frondes de los helechos está regulada por la radiación solar total que incide sobre la planta (Alonso-Amelot et al., 2007).

En este estudio, la población de *P. caudatum* seleccionada se encontraba completamente expuesta, sin interferencias que pudieran afectar la incidencia de la radiación solar.

De manera análoga, al estudio de la cumarina, en esta parte del trabajo, se pretende aportar evidencias que permitan comprender la dinámica de lixiviación de compuestos fenólicos a lo largo del desarrollo del fronde. En la tabla 4.1 se aprecia que los compuestos fenólicos están presentes en todas las etapas fenológicas y que además el contenido es mucho mayor al de la cumarina. En rizomas y esporas se encuentra a nivel de trazas. Estos metabolitos son clasificados dentro de las defensas cuantitativas o “reductoras de la digestibilidad” ya que su efecto sobre los herbívoros incrementa con la concentración, es decir, que el efecto depende de la dosis. En términos de protección de la alta radiación solar, los fenólicos totales también cumplen una función muy importante (Fox, 1981).

La figura 4.3 muestra una tendencia similar a la figura 4.1, indicando que las precipitaciones previas al muestreo no parecen producir una disminución del contenido de fenólicos totales en los MA, lo cual pudiera indicar, igualmente, que el contenido de fenólicos totales se relaciona con la etapa de crecimiento y además la posible existencia de un eficiente mecanismo de reposición de estos metabolitos en la superficie foliar.

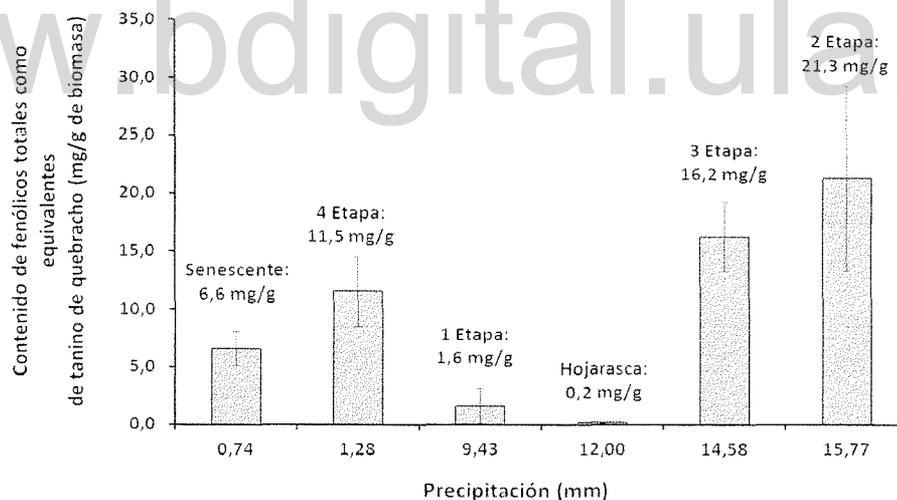


Figura 4.3: Correlación de las precipitaciones en los cinco días previos a la fecha de muestreo y contenido de fenólicos totales en los MA de los frondes por etapa fenológica.

Los individuos de la 1E fenológica y de la hojarasca se salen de la tendencia general observada para el resto de los frondes en desarrollo y en senescencia.

Tabla 4.1:Contenido de cumarina, pterosinas y fenolicos totales en los MA y EO de *P. caudatum*.

Metabolito ^a	Etapa fenológica ^c											
	Cayado (1E)		2E		3E		4E		Senescente		Hojarasca	
	MA	EO	MA	EO	MA	EO	MA	EO	MA	EO	MA	EO
Cumarina (mg/g)	ND	ND	1,20 ± 0,43	0,71 ± 0,01	0,81 ± 0,30	1,19 ± 0,03	0,3 ± 0,2	1,00 ± 0,19	0,08 ± 0,05	0,08 ± 0,001	ND	ND
Pterosina A (µg/g)	14,69 ± 9,35	NE	36,75 ± 19,65	NE	ND	NE	ND	NE	ND	NE	ND	NE
Pterosina B (µg/g)	69,74 ± 62,32	NE	46,86 ± 24,15	NE	ND	NE	ND	NE	ND	NE	ND	NE
Fenólicos totales (mg ^b /g)	1,60 ± 1,53	7,69 ± 3,44	21,26 ± 8,00	11,82 ± 4,31	16,20 ± 3,01	15,15 ± 5,28	11,53 ± 2,98	15,23 ± 4,51	6,59 ± 1,48	15,06 ± 6,79	0,15 ± 0,04	0,82 ± 0,49

a= Contenido expresado en peso por g de biomasa; b = mg como equivalentes de tanino de quebracho. c = en esporas (MA y EO); cumarina y fenólicos totales a nivel de trazas y pterosinas ND; En rizomas (MA y EO); fenólicos totales a nivel de trazas, cumarina y pterosinas ND.

NE = no estudiada; ND = no detectada. MA = macerado acuoso. EO = extracto orgánico. 2E = segunda etapa. 3E = tercera etapa. 4E = cuarta etapa.

El contenido total de fenólicos totales (MA + EO), en el primer par de pinas, es máximo cuando el fronde se encuentra en sus etapas fenológicas 2, 3 y 4 (figura 4.4 y anexo C, tabla C.3), sin diferencias significativas entre si ($p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis). El contenido máximo es de $33,08 \pm 12,31$ mg/g de biomasa. Este disminuye significativamente ($p < 0,05$; test de Kruskal-Wallis) al llegar a la senescencia, para casi desaparecer en la hojarasca. Al igual que en el caso de la cumarina, este hecho podría explicarse por una disminución de la actividad fotosintética en la pina madura.

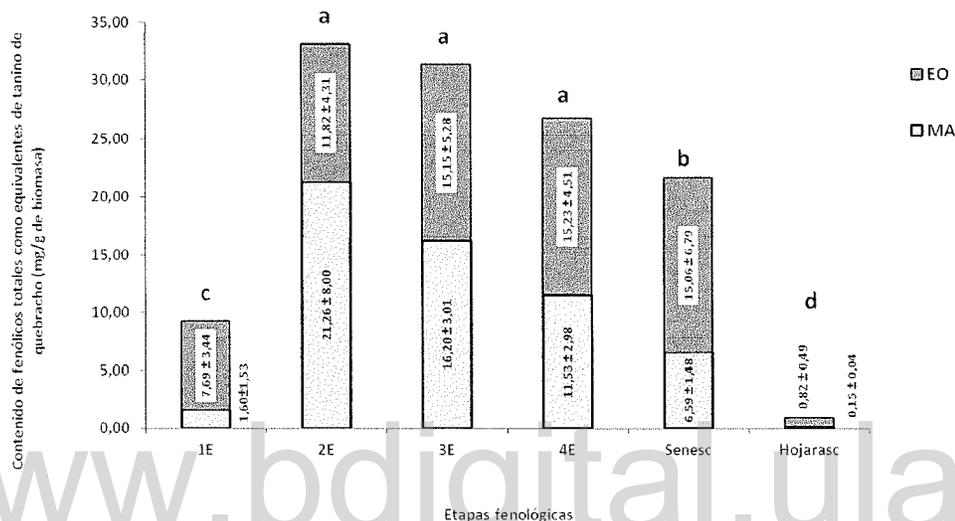


Figura 4.4: Contenido de fenólicos totales en MA y en EO de los frondes de *P. caudatum* (la desviación estandar corresponde a N = 10; Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

En las primeras etapas el contenido extraído en los MA de los compuestos fenólicos es mayor que el que se mantuvo almacenado dentro de los tejidos (2E y 3E fenológicas; figura 4.4), pero en las últimas etapas, esto se invierte. Nuevamente se observa que la proporción de los fenólicos potencialmente lixiviables respecto a los que se mantiene en los tejidos (MA/EO) disminuye inversamente proporcional a la madurez de la pina: 2E (1,80) > 3E (1,07) > 4E (0,76) > Senescente (0,44) > Hojarasca (0,18). Igualmente, estos resultados pueden estar asociados con la lignificación de las paredes celulares.

Es de interés señalar que a partir de la 3E fenológica, los fenólicos totales que serían potencialmente lixiviables en el primer par de pinas de los frondes fué mayor al mostrado por la cumarina.

Esto pudiera ser debido a diferentes factores como:

- a.- Un mayor efecto de la lignificación de la hoja sobre el lixiviado de la cumarina de la superficie foliar.
- b.- Mayor hidrosolubilidad de los fenólicos totales respecto a la cumarina.
- c.- Diversa localización de los metabolitos en la superficie foliar.

Es importante notar que el contenido interno (EO) de fenólicos totales se mantiene constante a partir de la tercera etapa hasta la senescencia (en 15 mg/g; figura 4.4). Como ya se mencionó, a diferencia de la cumarina, los compuestos fenólicos de alto peso molecular (taninos), son defensas cuantitativas, no son móviles, por lo que se mantienen en las hojas que envejecen y se pierden cuando la hoja muere.

Pese a que son metabolitos con diferencias notables en cuanto a estructura y función, existe una correlación positiva entre el contenido de cumarina y fenólicos totales presentes en los MA como se observa en la figura 4.5.

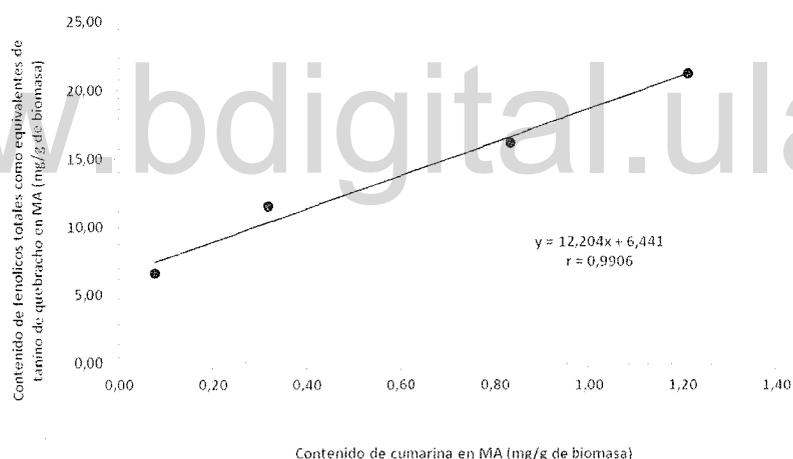


Figura 4.5: Correlación entre la cumarina y fenólicos totales en los MA de *P. caudatum*, desde el despliegue del primer par de pinas (2E fenológica) hasta senescencia.

Esto demuestra que efectivamente la madurez de la pina determina la cantidad de los metabolitos lixiviables, aunque este proceso sea diferente dependiendo de la naturaleza química de los mismos. Los resultados obtenidos en este estudio, están en consonancia con los resultados obtenidos por Alonso-Amelot y colaboradores (2004), observándose que el contenido de fenólicos totales encontrados en los frondes verdes es más alto que el de los cayados.

Se debe mencionar que los cayados contienen otra variedad de compuestos de defensa como glicósidos cianogénicos, ptaquilósido y otros xenobióticos (Alonso-Amelot et al., 2001; Alonso Amelot et al., 2004), siendo la principal fuente de energía en esta etapa inicial de desarrollo los carbohidratos de reserva que son almacenados en los rizomas como fuente de carbono (Marrs y Watt, 2006).

4.3.- Determinación de la presencia de cumarina en las muestras de suelo.

El análisis por HPLC del suelo, para la determinación de cumarina, indicó que este metabolito, presente en los frondes de *P. caudatum* y que es potencialmente lixiviable con las precipitaciones en el campo, no se encuentra presente. Esto podría ser debido a que se encuentra a nivel de trazas, por debajo del límite de detección (0,001 mg de cumarina/Kg de suelo seco) o a que la metodología de extracción no ha sido la mas adecuada para su estudio.

El que la cumarina se encuentre a nivel de trazas puede ser justificado tomando en cuenta todos los procesos físicos, químicos y biológicos a los que se somete cualquier metabolito secundario cuando es incorporado al ambiente. Como reporta Yamamoto (2009), una de las características químicas que afecta la recuperación de cumarina es el contenido de materia orgánica del suelo, pues niveles altos, podrían disminuir la recuperación de este aleloquímico, lo cual puede asociarse con procesos de retención que podrían afectar la extracción de cumarina y a su vez con la presencia de microorganismos.

Se ha sugerido que la concentración de un aleloquímico en la solución del suelo es un factor determinante de la actividad fitotóxica, y son los factores del suelo los principales responsables de la concentración de un aleloquímico en este sistema cuyo comportamiento se verá afectado por la adsorción, desorción y degradación (Kobayashi, 2004).

En el suelo muestreado para este estudio el porcentaje de materia orgánica es clasificado como muy alto (> 6,9) (Peña, 2011).

Un gran contenido de materia orgánica podría absorber la cumarina, explicando así los bajos niveles de su extracción. Esta absorción podría estar asociada en parte a la naturaleza química de la materia orgánica presente compuesta por sustancias húmicas. El humus ha sido definido por Navarro y Navarro (2003) como la totalidad de materia orgánica que por ser difícilmente degradable se ha acumulado en el mismo después de un conjunto de

descomposiciones y transformaciones químicas y bioquímicas. Este consta de una gran variedad de moléculas orgánicas con diferentes grupos funcionales, muchos de ellos de naturaleza aromática con diferentes grupos funcionales reactivos que podrían establecer interacciones importantes con un aleloquímico como la cumarina, afectando así su extracción.

Yamamoto (2009) expresa en su estudio que la dinámica de la cumarina en suelo depende de si el suelo fue esterilizado. Sus resultados indican que el porcentaje de recuperación de cumarina en los suelos esterilizados se mantuvo a un nivel constante en el tiempo, suponiendo entonces que los microorganismos están involucrados en la desaparición de la de la misma. Esto fue demostrado cuando el porcentaje de recuperación de cumarina fue evaluado en el suelo a diferentes temperaturas (15 y 25 °C), indicando también que los microorganismos están involucrados en los procesos, pues a mayor temperatura, menor fue el rendimiento de extracción.

Los estudios realizados por Kunc (1974), sugieren que la cumarina puede ser degradada por los microorganismos del suelo e indica que esta biotransformación se lleva a cabo a través de una reacción de oxidación. Los productos originados en estas biotransformaciones deben ser estudiados en la búsqueda de las relaciones estructura – actividad para definir los requerimientos estructurales que expliquen las actividades medidas (Oliveros, 2006).

Por otra parte, y no de menor importancia, la posible pérdida de la cumarina por escorrentía y drenaje del suelo, pudo afectar la permanencia de la cumarina en las zonas del terreno de estudio, lo cual está determinado por la inclinación y la textura del suelo.

Finalmente, los altos valores de materia orgánica podrían estar afectando la acidez del suelo, un factor que puede determinar la recuperación de cumarina y los niveles de nutrientes esenciales en el suelo. En este estudio, se registró un valor promedio de $4,8 \pm 0,2$. La ionización de los grupos ácidos, fenólicos, alcohólicos entre otros, producen iones H^+ y bajan el pH del suelo. Como reporta Marrs y Watt (2006) parece que el *Pteridium* ayuda a que el suelo mantenga niveles constantes de materia orgánica, de pH y otros elementos. Ha sido reportado que para suelos muy ácidos ($pH < 5$) pueden observarse deficiencias de fósforo, calcio, magnesio y potasio, reduciendo también, en algunos casos,

la actividad microbiana (Peña, 2011). Los suelos de esta parcela presentan valores bajos de estos nutrientes (figura 3.7), lo cual va en concordancia con lo reportado.

4.4.- Actividad fitotóxica sobre *L. sativa* de los MA de *P. caudatum*

La tendencia observada en cuanto a la actividad de los MA de los individuos de *P. caudatum* a lo largo de su desarrollo, desde la 2E hasta el desarrollo completo del fronde (figura 4.6), indica que la cumarina juega una función primordial en la actividad fitotóxica del helecho, lo cual corrobora la actividad descrita para este compuesto (Dornbos y Spencer, 1990; Pergo, et al., 2008).

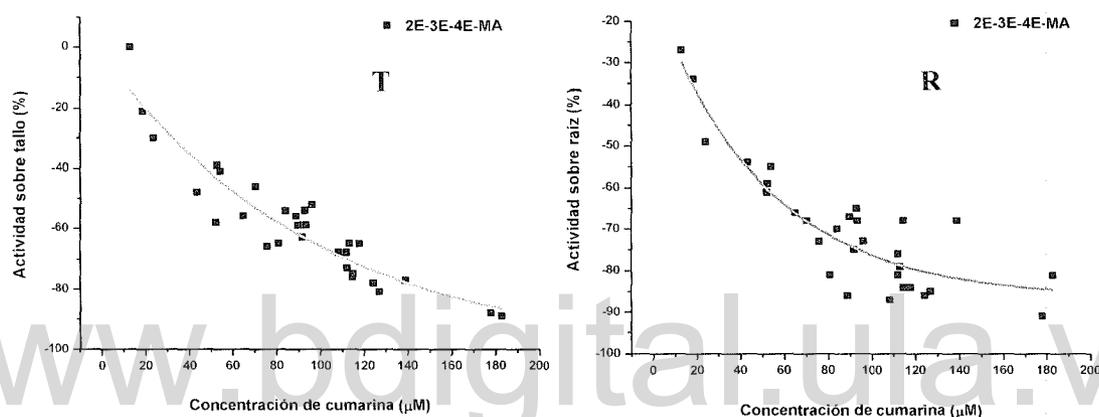


Figura 4.6: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de los MA en función de la concentración de cumarina para la 2E, 3E y 4E de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) de *L. sativa*.

Sin embargo, en los frondes senescentes a pesar de que el contenido de cumarina disminuye drásticamente en comparación con la etapa fenológica que le precede (4E) (figura 3.17, T y R), la actividad inhibitoria es alta, evidenciándose que esta fitotoxicidad es debida al alto contenido de compuestos fenólicos (figura 3.18), posiblemente acumulados durante su crecimiento y que forman parte de su defensa cuantitativa. Este resultado está en concordancia con lo descrito para *P. aquilinum* en California (Gliessman y Muller, 1972) y en Suecia (Dolling et al., 1994) donde los frondes senescentes parecen ejercer un efecto inhibitorio mayor que los lixiviados de los frondes verdes sugiriendo que, efectivamente, hay una transformación de los productos naturales o una acumulación de otros compuestos inhibitorios.

Es importante notar que el efecto de la cumarina patrón y de los MA sobre la elongación del tallo y la radícula de las plántulas es similar (figuras 3.16 y 4.6). Sin embargo, la dispersión observada en los MA comprueba nuevamente que otros metabolitos secundarios, como los fenólicos, pudieran estar actuando en conjunto (Glass, 1976, Jiménez et al., 2008).

También se debe tener en cuenta que el tiempo de respuesta, de la actividad de cumarina sobre el tallo de *L. sativa*, es mayor para los frondes verdes que para el patrón, lo cual implica que cambios drásticos en la concentración de cumarina de los MA pueden producir cambios leves en la actividad fitotóxica (parámetro t en la tabla 3.8), esto es, una velocidad de respuesta menor. Nuevamente, la presencia de otros metabolitos secundarios también activos o no y las características físicas del lixiviado de los frondes podrían estar afectando este parámetro.

Las pterosinas A y B no produjeron efectos fitotóxicos sobre la germinación y el crecimiento de *L. sativa* en el rango de concentraciones en que se encuentran presentes en los MA del *P. caudatum*.

En cuanto al contenido de compuestos fenólicos en los frondes verdes y senescentes se observa una tendencia que, pese a existir una muy baja correlación, indica que estos compuestos pueden estar cumpliendo una función en la actividad fitotóxica del helecho, siendo los frondes senescentes los que mostraron los valores más altos de inhibición (figura 3.18 y 4.7).

Pese a la concentración mucho menor de cumarina, respecto a los compuestos fenólicos totales (ver anexo D, Tabla D.2), los resultados indican que la actividad fitotóxica observada se debe principalmente al contenido de cumarina lixiviada de los frondes verdes en desarrollo.

En cuanto al efecto sobre la germinación, no se observó un efecto contundente (ver figuras 3.17 y 3.18).

Es importante mencionar, que con las experiencias realizadas, no se puede establecer con claridad si la actuación de la cumarina y los fenólicos totales sobre *L. sativa* se da de manera aditiva o sinérgica. Sin embargo, algo que sí es evidente en este estudio, es que la cumarina presente en los MA, correlaciona similarmente con la cumarina patrón en cuanto

a la actividad mostrada, por lo que podría establecerse la importancia como aleloquímico de este compuesto en las estrategias de defensa metabólica que el *P. caudatum* usa como una de las vías para mantener su éxito invasivo y su desarrollo exitoso en un hábitat determinado.

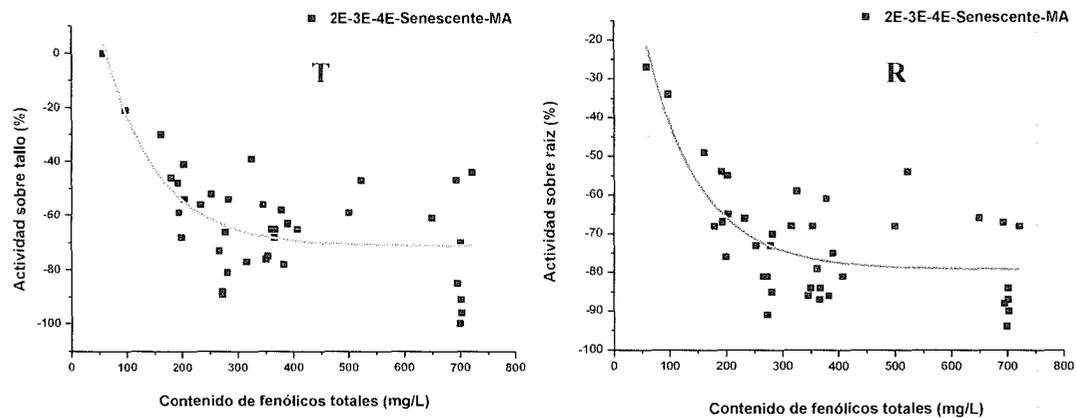


Figura 4.7: Análisis de regresión de la actividad fitotóxica de los MA en función del contenido de fenólicos totales para la 2E, 3E y 4E y senescente de *P. caudatum*, sobre el crecimiento del tallo (T) y raíz (R) de *L. sativa*.

Finalmente, este estudio indica claramente, que al llegar el fronde a su etapa senescente, sus lixiviados afectaran a su entorno debido al alto contenido de compuestos fenólicos.

4.5.- Absorción y translocación de la cumarina por *L. sativa* en crecimiento hidropónico

Los resultados de los bioensayos hidropónicos aportan indicios preliminares que son de interés en el estudio de la función como aleloquímico de la cumarina.

Del bioensayo I (absorción de cumarina por las plántulas de *L. sativa*) es importante resaltar, que por falta de soporte de las plántulas (debido al diseño del experimento), algunas partes foliares entraron en contacto con la solución de tratamiento, lo cual podría explicar la posible absorción de cumarina, además de a través de la radícula, por el tallo, generando un efecto fitotóxico sobre las mismas que les produce la muerte (una concentración de 1000 μ M).

Esta absorción sigue un comportamiento gaussiano en función del tiempo para ambos tejidos (tallo y raíz). Por lo tanto, es posible que luego de la absorción, la cumarina sea expulsada como una respuesta de la planta a la toxicidad producida por el compuesto. Para

ambos tejidos, el máximo de absorción coincide entre el séptimo y octavo día de tratamiento. De acuerdo con los resultados, no se puede demostrar la translocación de la cumarina hacia el tallo.

Por otro lado, en las plántulas sometidas al bioensayo 2 (absorción por la radícula en *L. sativa*), la cumarina no fue detectada en el tallo de éstas, y por lo tanto, no parece ser translocable desde la raíz al tallo. Así mismo, la cumarina tampoco se encontró presente en los tejidos de la radícula contradiciendo, en parte, los resultados obtenidos en el bioensayo 1.

Como ya lo han reportado otros autores (Ojala et al., 2000; Hossain et al., 2008), uno de los efectos más obvios de la cumarina es la inhibición del crecimiento radicular y la modificación de la morfología e histología de la raíz. En el estudio hidropónico desarrollado por el bioensayo 3, se determinó que la cumarina no inhibió el crecimiento de las plántulas de *L. sativa* a 200 μM (por 16 días) y pero si lo hizo a 500 μM (por 29 días), donde afectó notablemente el desarrollo radicular (figuras 3.22 y 3.24). En general, el efecto sobre el crecimiento de *L. sativa* depende de la concentración de cumarina y posiblemente del tiempo de tratamiento en el hidropónico. Sin embargo, a 200 μM , concentración máxima de los MA de *P. caudatum*, se aprecian cambios cualitativos en el crecimiento respecto al control (figura 3.23). En este bioensayo, la cumarina no fue detectada en las plántulas, lo cual confirma que este compuesto no parece ser translocable o que la misma podría estar siendo modificada estructuralmente como un proceso de detoxificación en la plántula, como se reporta en el caso de L-DOPA (Hachinoe et al., 2004).

Tomando en cuenta la baja polaridad de la cumarina se podrían justificar los resultados que indican que esta no ha sido absorbida y translocada a través de la raíz hacia el tallo de *L. sativa*, pues es requisito indispensable, si no existe una metabolización previa, que los compuestos absorbidos tengan cierto grado de solubilidad en agua, que permita la migración a través de los diferentes conductos vegetales. La benzoxazolin-2(3H)-ona (BOA), un productos de descomposición de la 2,4-dihydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-on (DIBOA), considerado un aleloquímico encontrado principalmente en las gramíneas, por ejemplo presenta una polaridad que le permite ser absorbida y translocada a los tejidos

de *Raphanus sativus* cv que son considerados posibles objetivos fisiológicos (Chiapusio et al., 2004). Entonces, de acuerdo con esto, se plantea que la cumarina podría estar afectando algún parámetro fisiológico que altera el desarrollo del tallo de las plántulas, en los bioensayos hidropónicos, de una manera indirecta, como por ejemplo afectando la absorción de algún nutriente esencial (Abenavoli et al., 2001).

Sin embargo, considerando los resultados del bioensayo 1, se propone la hipótesis de que la cumarina estaría ejerciendo un efecto fitotóxico en la planta receptora a través de los tallos y hojas de las plantas expuestas en el campo a los lixiviados de la planta donadora, que en este estudio es el *P.caudatum*.

Así también, existe la posibilidad de que una vez absorbida por los tallos y hojas haya sido translocada a los tejidos radiculares, esto es tomando en cuenta los resultados de los dos bioensayos donde se demuestra que aparentemente la cumarina no es absorbida por la raíz y considerando que la cumarina fue encontrada en un contenido 3,9 veces mas alto en el tallo que en la raíz de las plántulas de *L. sativa*.

Aunque la existencia de estudios que toman en cuenta los lixiviados de las partes foliares son bastante escasos, es importante mencionar por ejemplo, que en la aplicación de herbicidas postemergentes (como el 2,4-D), las hojas son una de las principales rutas de entrada de estos compuestos y la eficiencia del proceso definirá el nivel de control (Goncalves et al., 2005). Este podría ser el caso de la cumarina, que además de afectar el crecimiento a través de la radícula de *L. sativa*, posiblemente de una manera indirecta, también lo este haciendo mas directamente sobre los tallos y hojas. Se requiere de un nuevo diseño de bioensayo que permita evaluar con mayor certeza estas conclusiones preliminares y así establecer con mayor claridad la función ecológica que la cumarina esta cumpliendo en el *P.caudatum*.

Conclusiones

I.- Distribución de la cumarina y los compuestos fenólicos en *P. caudatum*

1) La cumarina no fue detectada en los rizomas de *P. caudatum*, sugiriendo que no es almacenada en estos tejidos. Sin embargo, se detectó a nivel de trazas en las esporas, indicando que pudiera cumplir una función ecológica durante el proceso de dispersión y germinación de las mismas.

2) La cumarina no se detectó en los cayados o individuos de la 1E fenológica de *P. caudatum*, lo que indica que para la biosíntesis de este compuesto es necesario el despliegue del primer par de pinas durante la 2E que corresponde con el inicio de la actividad fotosintética.

3) El contenido total de cumarina (MA + EO) es máximo cuando el fronde se encuentra en sus etapas fenológicas 2 y 3 ($p > 0,05$) (máximo de $2,02 \pm 0,33$ mg/g de biomasa). Éste disminuye al llegar a la cuarta 4E, para casi desaparecer durante la senescencia. Sin embargo, los compuestos fenólicos alcanzan los valores máximos cuando el fronde se encuentra en sus etapas fenológicas 2, 3 y 4 ($p > 0,05$) (máximo de $33,08 \pm 12,31$ mg/g de biomasa) y disminuye al llegar a la senescencia, para casi desaparecer en la hojarasca. En ambos casos, este hecho podría explicarse por una disminución de la actividad fotosintética en la pina madura y además, en el caso de la cumarina, a su movilización o transformación.

4) El contenido de compuestos fenólicos totales es mucho mayor al de la cumarina en todas las etapas, pues a diferencia de ésta, los fenólicos de alto peso molecular (taninos) son defensas cuantitativas, no son móviles, por lo que se mantienen en las hojas que envejecen y se pierden cuando la hoja muere.

II.- Dinámica de liberación por lixiviación de cumarina y compuestos fenólicos de *P. caudatum*

1) La cumarina y los compuestos fenólicos que serían potencialmente lixiviables disminuyen a medida que el fronde avanza hacia su madurez, lo cual pudiera ser consecuencia de la mayor lignificación de las paredes celulares de las células vegetales.

2) En los frondes verdes, la relación entre la cumarina lixiviada y almacenada en los tejidos, expresada como MA/EO, sigue el siguiente orden decreciente a medida que la pina envejece 2E (1,71) > 3E (0,70) > 4E (0,32). Sin embargo en cuanto a los compuestos fenólicos dicha relación sigue el orden MA/EO: 2E (1,80) > 3E (1,07) > 4E (0,76) > Senescente (0,44) > Hojarasca (0,18). Esto indica que los compuestos fenólicos están presentes en los MA en una proporción mayor que la cumarina debido posiblemente, entre otras cosas, a su mayor hidrosolubilidad.

III.- Actividad fitotóxica

A.- Actividad fitotóxica en placas de *petri*

A.1.- Pterosinas

1) Las pterosinas A y B no produjeron efectos fitotóxicos sobre la germinación y el crecimiento de *L. sativa*, en el rango de concentraciones presente en los MA de *P. caudatum*. Sin embargo, a concentraciones superiores a 10 μ M, la combinación de Pterosina A/Pterosina B en una relación de 0,12, produjo inhibición de la germinación de *L. sativa*, hasta un máximo de inhibición del -20% respecto al control.

A.2.- Cumarina y compuestos fenólicos

1) Para el caso de la actividad fitotóxica debida a la cumarina, la tendencia observada indica, que ésta juega una función primordial en el potencial alelopático del *P. caudatum*. Sin embargo, los compuestos fenólicos pudieran estar actuando en una manera conjunta (sinérgica ó aditiva). Aunque el contenido de cumarina es bajo en los frondes senescentes, la actividad inhibitoria de los MA obtenidos a partir de estas, es alta, evidenciándose que la actividad es debida al contenido de compuestos fenólicos presentes, posiblemente acumulados durante su crecimiento y que forman parte de su defensa cuantitativa.

2) La velocidad de respuesta de la actividad de cumarina sobre el tallo de *L. sativa*, es menor para los frondes verdes que para la cumarina patrón, lo cual se puede asociar con la complejidad del lixiviado de *P. caudatum* en cuanto a sus características físicas y químicas, las cuales podrían afectar su interacción con los tejidos expuestos de la planta receptora.

3) Aunque no se puede establecer con claridad si la actuación de la cumarina y los compuestos fenólicos totales sobre *L. sativa* se da de manera aditiva o sinérgica, es evidente, que la cumarina presente en los MA, correlaciona similarmente a la cumarina patrón en cuanto a la actividad mostrada, por lo que podría establecerse la importancia como aleloquímico de este compuesto en las estrategias de defensa metabólica que el *P. caudatum* usa como una de las estrategias que operan para mantener su éxito invasivo y prevalencia en un habitat determinado.

B.- Actividad fitotóxica en bioensayos hidropónicos

1) Los bioensayos en medio hidropónico, sugieren que la cumarina es absorbida por los tallos y hojas de *L. sativa* que se encontraron expuestas al medio de tratamiento, ejerciendo un efecto fitotóxico, y de allí podría ser translocada a la radícula, posiblemente como parte del proceso de detoxificación. No se demostró el proceso contrario, es decir, absorción a través de la raíz y translocación al tallo. A 200 μM de cumarina, que es la concentración máxima presente en los MA de *P. caudatum*, se aprecian cambios no significativos en el crecimiento de *L. sativa* respecto al control.

2) En los bioensayos donde solo la radícula estuvo expuesta a la cumarina, se plantea que esta podría estar afectando algún parámetro fisiológico que altera el crecimiento de las plántulas de una manera indirecta, como por ejemplo afectando la absorción de algún nutriente esencial (Abenavoli et al., 2001).

IV.- Análisis del suelo en población de *P. caudatum*

1) El análisis de la solución del suelo por HPLC, para la determinación de cumarina, mostró, bajo las condiciones de análisis, que este metabolito no se encuentra presente al menos en niveles iguales o mayores al límite de detección de 0,06 μM de cumarina/100 gramos de suelo seco. Este resultado se asoció con varios factores como: metodología no óptima para la extracción de cumarina de este tipo de matriz, procesos de retención o absorción en el suelo, degradación microbiana ó pérdida por escorrentía y drenaje. Es necesario futuros estudios de optimización de las condiciones de extracción y de análisis cromatográfico para la detección y cuantificación de cumarina en esta matriz.

V.- Conclusión general

Se confirma la hipótesis planteada de que la presencia de cumarina en *Pteridium caudatum*, es parte de la defensa química que esta especie presenta como estrategia competitiva ante las otras especies de plantas (como la *L. sativa*) y actúa en conjunto con otros metabolitos secundarios como los ácidos fenólicos y taninos, cumpliendo en conjunto una función alelopática.

www.bdigital.ula.ve

Referencias Bibliográficas

Abenavoli, M. R., de Santis, C., Sidari, M., Sorgonà, A., Badiani, M., Cacco, G. (2001). Influence of Coumarin on the Net Nitrate Uptake in Durum Wheat. *New Phytologist*, 150 (3): 619-627.

Alias, J. (2006). Influencia de los factores climaticos en la sintesis y actividad de compuestos fitotoxicos seecretados por *Cistus ladanifer* L. Universidad de Extremadura., Departamento de Física. Área de Ecología.

Alonso-amelot, M. E., Pérez-mena, M., Calcagno, M. P., Jaimes-Espinoza, R. and Castillo, U. (1992). Ontogenic variation of biologically active metabolites of *Pteridium aquilinum* (L. Kuhn) pterosins A and B, and ptaquiloside in a bracken population of the tropical Andes. *Journal of Chemical Ecology*, 18(8): 1405-1420.

Alonso-Amelot, M. E., Rodolfo-Baechler, S., and Jaimes- Espinoza, R. (1995). Comparative dynamics of ptaquiloside and pterosin B in the two varieties (*caudatum* and *arachnoideum*) of neotropical Bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(7): 709 – 716.

Alonso-Amelot, M. E., and Rodulfo-Baechler, S. (1996). Comparative spatial distribution, size, biomass and growth rate of two varieties of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) in a neotropical montane habitat. *Vegetatio*, 125: 137 – 147.

Alonso-Amelot, M. E. (1999). Helecho macho, salud animal y salud humana. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 16: 528-541.

Alonso-Amelot, M. E., Calcagno-Pisarelli, M. P. y Perez-Inojosa, M. (1999). Growth and selective defensive potential in relation to altitude in neotropical *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Bracken Conference Manchester*: 43 – 47.

Alonso-Amelot, M. E. and Oliveros, A. (2000). A Method for the Practical Quantification and Kinetic Evaluation of Cyanogenesis in Plant Material. Application to *Pteridium aquilinum* and *Passiflora capsularis*. *Phytochemical Analysis*, 11: 309–316.

Alonso-Amelot, M. E. y Calcagno-Pisarelli, M. P. (2000). Growth and selective defensive potential in relation to altitude in neotropical *Pteridium aquilinum* var *caudatum*. *Bracken Fern, Toxicity, Biology, and Control*. International Bracken Group Special Publication, Manchester, Inglaterra. Pp: 43 - 47.

Alonso-Amelot, M. E., Oliveros, A., Calcagno, M. P., and Arellano, E. (2001) Bracken adaptation mechanisms and xenobiotic chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 549-553.

Alonso-Amelot, M. E. (2002). The chemistry and toxicology of bioactive compounds in Bracken fern (*Pteridium* spp.), with special reference to Chemical Ecology and Carcinogenesis. *Studies in Natural Products Chemistry*, 26: 685 – 739.

Alonso-Amelot, M. E., Oliveros, A., and Calcagno-Pisarelli, M. P. (2004). Phenolics and condensed tannins in relation to altitude in neotropical *Pteridium* spp. A field study in the Venezuelan Andes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 969 – 981.

Alonso-Amelot, M. E., Oliveros-Bastidas, A. y Calcagno-Pisarelli, M. P. (2007). Phenolic and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 1 – 10.

Alonso-Amelot, M. E. (2011). Tannins and phenolics in animal nutrition chemistry and challenges. NOVINKA, Nova Science Publishers, Inc. New York.

Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2(3): 119-145.

Bais, H. P., Loyola-Vargas, V. M., Flores, H. E. y Vivanco, J. M. (2001). Root-Specific Metabolism: The Biology and Biochemistry of Underground Organs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 37(6): 730-741.

Bais, H. P., Walker, T. S., Stermitz, F. R., Hufbauer, R. A., and Vivanco, J. M. (2002). Enantiomeric-Dependent Phytotoxic and Antimicrobial Activity of (±)-Catechin. *A*

Rhizosecreted Racemic Mixture from Spotted Knapweed. *Plant Physiology*, 128: 1173–1179.

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S. y Vivanco, J. M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57:233–66.

Balakumar, T., Vicent, H. B., Paliwal, K., (1993). On the interaction of UV-B radiation (280 – 315 nm) with water stress in crop plants. *Physiologia Plantarum*, 87: 217 – 222.

Bananomi, G., Sicurezza, M., Caporaso, S., Esposito, A., & Mazzoleni, S. (2005). Phytotoxicity Dynamics of Decaying Plant Materials. *New Phytologist*, 169(3): 571 - 578.

Barthelemy, D. and Caraglio, Y. (2007). Plant Architecture: A Dynamic, Multilevel and Comprehensive Approach to Plant Form, Structure and Ontogeny. *Annals of Botany*, 99: 375–407.

Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256: 2166-2174.

Belz, R. G. and Hurle, K. (2004). A Novel Laboratory Screening Bioassay for Crop Seedling Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 30 (1): 175-198.

Belz, R. G., Hurle, K., and Duke, S. O. (2005). Dose-Response—A Challenge for Allelopathy? *Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine*, 3(2): 173–211.

Berti G, Bottari F. (1968). Constituents of ferns. *Programme of Phytochemistry*, 1: 589-685.

Bertin, C., Yang, X., & Weston, L. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256: 67 - 83.

Bohm, B. A., and Tryon, R. M. (1967). Phenolic compounds in ferns. A survey of some ferns for cinnamic acid and benzoic acid derivatives. *Canadian Journal of Botany*, 45: 586–593.

Brown S.A. (1981). Coumarins. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. *The Biochemistry of Plants*, 7: 269-299. New York, USA: Academic Press Inc.

Buendía, D. (2009). Determinación cuantitativa de cumarina en *Pteridium caudatum* y estudio de su actividad fitotóxica. Tesis de Grado, Departamento de Química. Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida - Venezuela.

Butnariu, M. (2012). An analysis of *Sorghum halepense*'s behavior in presence of tropane alkaloids from *Datura stramonium* extracts. *Chemistry Central Journal*, 6 (75): 1 – 7.

Cen, Y.P. y Bornman, J.F. (1993). The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 87: 249 – 255.

Chaves, N., (1994). Variación cualitativa y cuantitativa de los flavonoides del exudado de *Cistus ladanifer* L. como respuesta a diferentes factores ecológicos. PhD Thesis. Universidad de Extremadura. Badajoz, Spain.

Chaves N., y Escudero, J. C., (1997). Allelopathic effect of *Cistus ladanifer* on seed germination. *Functional Ecology*, 11: 432 – 440.

Chiapusio, G., Pellissier, F. y Gallet, C. (2004). Uptake and translocation of phytochemical 2-benzoxazolinone (BOA) in radish seeds and seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 55 (402): 1587–1592.

Chou, C.H. 1999. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, 18: 609-636.

Cipollini, D., Stevenson, R. y Cipollini, K. (2008). Contrasting effects of allelochemicals from two invasive plants on the performance of a nonmycorrhizal plant. *International Journal of Plant Sciences*, 169(3): 371–375.

Cooper-Driver, G. (1976). Chemotaxonomy and phytochemical ecology of bracken. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 73: 35 – 46.

Cseke, Kirakosyan, Kaufman, Warber, Duke, & Brielmann (2006). *Natural products from plants*. Second edition. Taylor y Francis Group. Estados Unidos de América, USA.

Dayan, F., (2006). Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. *Planta*, 224: 339 – 346.

Dewick, P. M. (1988). Isoflavonoids, in *The Flavonoids: Advances in Research since 1980* (J. B. Harborne, ed), 125 – 209, Chapman and Hall. London.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Second Edition, p.p: 7 – 12. John Wiley & Sons, Ltd. ISBNs: 0471496405.

Dolling, A., Zackrisson, O., and Nilsson, M.C. (1994). Seasonal variation in phytotoxicity of Bracken (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). *Journal of Chemical Ecology*, 20(12): 3163 – 3171.

Dornbos Jr., D. L. and Spencer, G. F. (1990). Natural products phytotoxicity. A bioassay suitable for small quantities of slightly water-soluble compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 16 (2): 339-352.

Dudareva, N., Pichersky, E. y Gershenzon, J. (2004). *Biochemistry of Plant Volatiles*. *Plant Physiology*, 135: 1893–1902.

Dustin, C. D., y Cooper-Driver, G. A. (1990). Meeting of the International Society of Chemical Ecology. Quebec (Canada) (Citado por Jaimes-Espinoza, 1990).

Fox, L. (1981). Defense and Dynamics in Plant-Herbivore Systems. *American Zoologist*, 21: 853 – 864.

Friedman, J. (1995). Allelopathy, autotoxicity, and germination. pp. 629-644. In: J. Kigel; G. Galili. (eds.). *Seed Development and Germination*. New York, Marcel Dekker.

Fukuoka, M., Kuroyanagi, M., Yoshihira, K., Natori, S. (1978). Chemical and toxicological studies on Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* var. *laticulm*. II. Structures of pterosins, sesquiterpenes having 1-indanone skeleton. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 26(8): 2365 – 2385.

Gatti, A. B., Ferreira, A. G., Arduin, M. y Gualtieri de Andrade, S. C. (2010). Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artistolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta Botanica Brasilica*, 24(2): 454-461.

Glass, A. D.M. (1976). The allelopathic potential of phenolic acids associated with the rhizosphere of *Pteridium aquilinum*. *Canadian Journal of Botany*, 54: 2440 – 2444.

Gliessman, S. R., and Muller, C. H. (1972). The phytotoxic potential of Bracken, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Madroño*, 21: 299 – 303.

Gliessman, S. R. and Muller, C. H. (1978). The allelopathic mechanisms of dominance in bracken (*Pteridium aquilinum*) in Southern California. *Journal of Chemical Ecology*, 4(3): 337-362.

Goncalves, C., Tornisielo, V. L., Filho, R. V. y de Souza, A. L. (2005). Absorption and Translocation of 2,4-D in Plants of *Memora peregrine*. *Journal of Environmental Science and Health*, B40: 137–143.

Goren R. and Tomer E. (1971). Effects of seselin and coumarin on growth, indoleacetic acid oxidase, and peroxidase, with special reference to cucumber (*Cucumis sativa* L.) radides. *Plant Physiology* 47: 312-316.

Hachinohe, M., Sunohara, Y. y Matsumoto, H. (2004). Absorption, translocation and metabolism of L-DOPA in barnyardgrass and lettuce: their involvement in species-selective phytotoxic action. *Plant Growth Regulation* 43: 237–243.

Hadfield, P. R. H., Dyer, A. F. (1988). Cyanogenesis in gametophytes and young sporophytes of bracken. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16: 9 - 13.

Hanson, B. (2010). Effect of Soil, Environment, and Chemistry on Herbicide Persistence. Presentacion PDF, UC Davis Weed Research and Information Center, UC Davis Statewide Integrated Pest Management Program.

Harper S.H.T. y Lynch J.M. (1982). The role of water-soluble components in phytotoxicity from decomposing straw. *Plant Soil*, 65: 11–17.

Kofod, H., y Eyjolfsson, R. (1966). The isolation of the cyanogenic glycoside prunasin from *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. *Tetrahedron Letters*, 7(12): 1289-1291.

Herns, D. A., y Mattson, W. J. (1992). The dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3): 283 - 335.

Hiradate, S., Furubayashi, A., and Fujii, Y. (2005). Changes in Chemical Structure and Biological Activity of L-DOPA as Influenced by an Andosol and Its Components. *Soil Science & Plant Nutrition*, 51(4): 477-484.

Hiradate, S. (2006). Isolation Strategies for Finding Bioactive Compounds: Specific Activity vs. Total Activity. *Natural Products for Pest Management*, Chapter 9, 113–126. Copyright, American Chemical Society.

Hiradate, S., Ohse, K., Furubayashi, A., and Fujii, Y. (2010). Quantitative Evaluation of Allelopathic Potentials in Soils: Total Activity Approach. *Weed Science*, 58(3): 258-264.

Hirono, I., Y. Kono, K. Takahashi, K. Yamada, H. Niwa, M. Ojika, H. Kigoshi, K. Nijima y Y. Uosaki. (1984). Reproduction of acute bracken poisonin in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. *Veterinary Record*, 115: 375-378.

Hoagland, R.E. y Williams, R.D. (2003). Bioassays: useful tools for the study of allelopathy. Macia, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, M.G., Cutler, H.G., Editors. CRC Press, Boca Raton, Fl. Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals, 315-351.

Hossain, Md. D., Li, J., Guo, S., Fujita, M. (2008). Suppressive Effects of Coumarins on Pumpkin Seedling Growth and Glutathione S-Transferase Activity. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 11 (3): 187 – 192.

IARC (2000). Coumarin. IARC Monographs, 77, 193 – 225. Lyon, IARC Press.

Imperato, F. (1995) Flavonol glycosides from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry*, 40: 1801-1802.

Imperato, F. (1996). Kaempferol 3-*o*-(5"-feruloylapioside) from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 43: 1421-1423.

Imperato, F. y Minutiello, P. (1997) Kaempferol 3-*o*-(6"-caffeoylglucoside) from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 45: 199-200.

Imperato, F. (1998) Kaempferol 7-*o*-rhamnoside-4'-*o*-glucoside from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 47: 911-913.

Inderjit, y Dakshini, K. (1995). On Laboratory Bioassays in Allelopathy. *The Botanical Review*, 61 (1): 28 - 44.

Inderjit. (1996). Plant Phenolics in Allelopathy. *Botanical Review*, 62 (2): 186 - 202.

Inderjit y Nilsen, E. T. (2003). Bioassays and Field Studies for Allelopathy in Terrestrial Plants: Progress and Problems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(3): 221–238.

Inderjit. (2005). Soil microorganisms: An important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil*, 274: 227 - 236.

Jansson E. y Svensson S. (1980). Coumarin effects on Glycine max hypocotyl explants. *Physiologia Plantarum*, 48: 486 -490.

Jiménez A., Oliveros A., Ávila JL., y Carrera C. (2008). Evaluación del potencial fitotóxico y alelopático de *Pteridium aquilinum*. LVIII Convención Anual de AsoVAC. Yaracuy. Venezuela.

Jose, S. y Gillespie, A. R. (1998). Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. I. Spatio-temporal variation in soil juglone in a black walnut-corn (*Zea mays*L.) alley cropping system in the midwestern USA. *Plant and Soil*, 203(2): 191-197.

Kaplanis, J.N., Thompson, M.J., Robbins, W.E. y Bryce, B.M. (1967). Insect hormones: alpha ecdysone and 20-hydroxyecdysone in bracken fern. *Science*, 157(3795): 1436-1438.

Khalid, S., Ahmad, T. y Shad, R. A. (2002). Use of allelopathy in agricultura. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1 (3): 292 – 297.

Kobayashi K. (2002). Behaviors and phytotoxic activities of herbicides in soil. *Journal of Weed Science and Technology*, 47: 89–96 (in Japanese).

Kobayashi, K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biology and Management*, 4: 1–7.

Kohli, R.K., Parveen, C. y Anita, K. (1988). Impact of *Eucalyptus* on *Parthenium*-a weed. *Indian Journal of Range Management*, 9: 63-67.

Kong, C. H., Liang, W. J., Xu, X. H., Hu, F., Wang, P. y Jiang, Y. (2004). Release and activity of allelochemicals from allelopathic rice seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2861–2865.

Kunc, F. (1974). Microbial decomposition of coumarin in soil. *Folia Microbiologica*, 19: 209 – 217.

Kuroyanagi, M., Fukuoka, M., Yoshihira, K., and Natori, S. (1979). Chemical and toxicological studies on Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* var. *latisculum*. III. Further characterization of pterosins and pterosides, sesquiterpenes and the glucosides having 1-indanone skeleton, from rhizomes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 27(3): 592 – 601.

Kutnjak, H., Leto, J., Šdepanovid, M., Bošnjak, K., Perčulija, G., Ključević, D., Knežević, M. y Vranid, M. (2011). Allelopathic inhibitory effect of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn on germination of *Festuca arundinacea* Schreb. and *Trifolium pratense* L. 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture. Opatija, Croatia (752-754).

Lacy, A. y O’Kennedy, R. (2004). Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 3797-3811.

Lambers, H., Chapin III, F.S., Pons, T.L., (1998). *Plant physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York.

Langdale, G. W. y Giddens, J. E. (1970). Phytotoxic phenolic compounds in *sericea lespedeza* residues. *Dissertation Abstracts*, 30 (8): 3454.

Leather, G. R. y Einhellig, F. A. (1986). Bioassay in the study of allelopathy. In: Putnam AR and Tang CS (ed.), *The Science of Allelopathy*, pp 133–145. John Wiley and Sons, New York.

Leather, G. R., y Einhellig, F. A. (1988). Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology*, 14: 1821–1828.

Levin, D. A. (1971). Plant Phenolics: An Ecological Perspective. *The American Naturalist*, 105(942): 157-181.

Liebl R.A. y Worsham A.D. (1983). Inhibition of pitted morning glory (*Ipomea lacunose* L.) and certain other weed species by phytotoxic compounds of wheat (*Triticum aestivum* L.) straw. *Journal of Chemical Ecology*, 9: 1027–1043.

Lovett, J.V, Ryuntyu, M.Y, y Liu, D.L. (1989). Allelopathy, chemical communication, and plant defense. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 1193–1201.

Mann, J. (1980). Secondary Metabolism. En J. Mann, *Secondary Metabolism* (págs. 6 - 23). Great Britain.: St. Edmundsbury Press.

Marrs, R. H. y Watt, A. S. (2006). Biological flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Journal of Ecology*, 94: 1272 – 1321.

Matsuyama, M. Hiradate, S., Nakatani, K. y Fujii, Y. (2000). Developments of new bioassay and analysis method for volatile allelochemicals. *Weed Research Japan*, 45: 80–81.

Mirunalini, S., Krishnaveni, M. (2011). Coumarin: A Plant derived Polyphenol with wide Biomedical Applications. *International Journal of PharmTech Research*, 3(3): 1693-1696.

Molina, A., Reigosa, M. J. y Carballeira, A. (1991). Release of allelochemical agents from litter, throughfall, and topsoil in plantations of *Eucalyptus globulus* labill in Spain. *Journal of Chemical Ecology*, 17(1): 147 – 160.

Murray R, Mendez, J. y Brown, S. (1982). *The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry*. John Wiley & Sons, New York. 702 p.

Nava, R., Edda, F., V. y Del Amo, R. S. (1987). Allelopathic effects of green fronds of *Pteridium aquilinum* on cultivated plants, weeds, phytopathogenic fungi and bacteria. *Agricultura, Ecosystems and Environment*, 18: 357 – 379.

Navarro, S. y Navarro, G. (2003). *Uimica Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. 2da Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-España. 53 – 77.

Niwa, H., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K., Ohba, S., saito, Y., Hirono, I., y Matsushita, K. (1983). Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var *latiusculum*. *Tetrahedron letters*, 24: 5371-5372.

Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K. y Vuorela, P. (2000). Short communication. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 299–305.

Oliveros B., Alberto de J. (1998). Dinámica de glicósidos cianogénicos, taninos y fenólicos en el helecho macho (*Pteridium aquilinum*) en el estado Mérida. Trabajo de ascenso, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, ULA – Mérida. p.p.32 – 46.

Oliveros, A., Calcagno, M.P., Alonso-Amelot, A. y Arellano, E., y Rudman, I. (1999). Química Fenólica a través del raquis en *Pteridium aquilinum* var. *arachnoideum* en la región de los Andes Venezolanos. IV Congreso Venezolano de Química. Mérida – Venezuela.

Oliveros B., A. (2006). Estudios alelopáticos en gramíneas. Benzoxacinoides como aleloquímicos. Trabajo para obtener el título de Doctor, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz – España. p.p.335 – 351.

Oliveros, A. (2008). El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Revista Química Viva*, 7(1): 2 - 34.

Oliveros-Bastidas, A. de J., Macías, F. A., Carrera Fernández, C., Marín, D. y Molinillo, J. M. G. (2009). Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova*, 32(1): 198-213.

Ortega, F. (1991). El género *Pteridium* en Venezuela: taxonomía y distribución geográfica. *Biollania*, 7: 47-56.

Parks, J. C. y Werth, C. R., (1993). A study of spatial features of clones in a population of Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, 80(5): 537-544.

Peña, C. (2011). Análisis físicos y químicos de suelos. Laboratorio de Química Agrícola, IIAP. Taller Introducción a la química agrícola. Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias.

Pergo, É. M., Abraham, D., Soares, P.C., Aparecida K. K., Da Silva, L. J., Voll, E., y Ishii-Iwamoto, E. L. (2008). *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. *Journal of Chemical Ecology*, (34): 499–507.

Pisula, N. L. y Meiners, S. J. (2010). Relative allelopathic potential of invasive plant species in a young disturbed woodland. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 137(1): 81–87.

Pramanik, M.H.R. (2000). Effects of temperature and photoperiod on phytotoxic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) in hydroponic culture. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 1953 – 1967.

Putnam, A.R. y Tang, C.S. (1986). Allelopathy: state of the science. Pp. 1-19. In: A.R. PUTNAM; C.S. TANG. *The Science of Allelopathy*. New York, John Wiley & Sons.

Quintero C. y Bowers M. D (2011). Changes in plant chemical defenses and nutritional quality as a function of ontogeny in *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Oecologia*, 168(2): 471-481.

Rasmussen, L. H., Jensen, L. S., y Bruun Hansen, H. C. (2003). Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *Journal of Chemical Ecology*, 29(3): 771 – 778.

Raven P., Ray, E., y Eichhorn S. (1991). *Biología de las plantas*. Tomo I. Editorial Reverté, S.A. España. P-353.

Reigosa, M.J., Sanchez-Moreiras, A. y Gonzales, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Science*, 18: 577-608.

Rietveld, W. J. (1983). Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of Chemical Ecology*, 9(2): 295 – 308.

Rice, E. L. (1984). *Allelopathy*. New York, Academic Press. pp. 353.

Rivoal A., Fernandez C., Lavoit A.V., Olivier R., Lecareux C., Greff S., Roche P. and Vila B. (2010). Environmental control of terpene emissions from *Cistus monspeliensis* L. in natural Mediterranean shrublands. *Chemosphere*, 78(8): 942-949.

Sandín-España, S. Llanos, J. O. Magrans, J. L. Alonso-Prados y J. M. García – Baudín (2003). Optimization of hydroponic bioassay for herbicide tetraloxydim by using water free from chlorine P. European Weed Research Society. *Weed Research*, 43: 451 – 457.

Sampietro, D. (2000). Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Argentina: Catedra de Fitoquímica.

Sher, A. (2009). Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 7(1): 72 – 78.

Silva, D. M. y Belinato, T. A. (2010). Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. *Brazilian Journal of Biology*, 70(2): 311-316.

Sosa, T. (2003). Contribución al estudio de las funciones ecológicas que pueden desempeñar los compuestos derivados del metabolismo secundario en *Cistus ladanifer* L. Tesis de Doctorado. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.

Stevenson, P. C., Anderson, J. C., Blaney, W. M. y Simmonds, M. S. J. (1993). Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). *Journal of Chemical Ecology*, 19(12): 2917-2933.

Stermitz, F. R., Bais, H. P., Foderaro, T. A. y Vivanco, J. M. (2003). 7,8-Benzoflavone: a phytotoxin from root exudates of invasive Russian knapweed. *Phytochemistry*, 64:493–97.

Stewart, R. E. (1975). Allelopathic potential of western bracken. *Journal of Chemical Ecology*, 1(2): 161-169.

Swain, T., y Cooper-Driver, G. A. (1973). Biochemical systematics in the Filicopsida. In The phylogeny and classification of the ferns. *Edited by* A. C. Jermy, J. A. Crabbe, and B. Thomas. Botanical Journal of the Linnean Society, 67: 111 - 134.

Taiz L. y Zeiger, E. (1991). Secondary Metabolites and Plant Defense. En: Taiz, Lincoln y Eduardo Zeiger. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1991. Capítulo 13. pp.318 – 345.

Takemoto, T., Arihara, S. y Hikino, H. (1968). Structure of ponasteroside A, a novel glycoside of insect-moulting substance from *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. Tetrahedron Letters, 9(39): 4199-4202.

Takemoto, T., Okuyama, T., Jin, H., Arai, T., Kawahara, M., Konno, C., Nabetani, S., Arihara, S., Hikino, Y., y Hikino, H. (1973). Isolation of Phytoecdysones from Japanese Ferns. I Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 21(10): 2336 – 2338.

Thomson, J. A. (2000). Morphological and Genomic Diversity in the Genus *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). Annals of Botany 85 (Supplement B): 77-99.

Thomson, J. A. y Alonso- Amelot, M. E. (2002). Clarification of the taxonomic status and relationships of *Pteridium caudatum* (Dennstaedtiaceae) in Central y Sur América. Botanical Journal of the Linnean Society, 140: 237 – 248.

Thomson, J. A. (2004). Towards a taxonomic revision of *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). Telopea 10(4): 793 – 803.

Thomson, J. A., Chikuni, A. C. y MacMaster, C. S. (2005). The taxonomic status and relationships of bracken ferns (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) from sub-Saharan Africa. Botanical Journal of the Linnean Society, 148: 311 – 321.

Thomson, J. A., Mickel, J. T. y Mehlreter, K. (2008). Taxonomic status and relationships of bracken ferns (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) of Laurasian affinity in Central and North America. Botanical Journal of the Linnean Society, 157: 1–17.

Tolhurst, K. G. y Turvey, N. D. (1992). Effects of bracken (*Pteridium esculentum* (forst. f.) on eucalypt regeneration in west-central Victoria. *Forest Ecology and Management*, 54 (1-4): 45-67.

Tongma S., Kobayashi K. y Usui K. (2001). Allelopathic activity of *Mexican sunflower* [*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray] in soil under natural field conditions and different moisture conditions. *Weed Biology and Management*, 1: 115–119.

Trenor, S. R., Shultz, A. R., Love, B. J. y Long, T. E. (2004). Coumarins in Polymers: From Light Harvesting to Photo-Cross-Linkable Tissue Scaffolds. *Chemical Reviews*, 104(6): 3059-3077.

Tryon Jr., R.M. (1941); A revision of the genus *Pteridium*. *Rhodora*, 43(505): 3 -31.

Tukey, H. B. Jr. (1970). The Leaching of Substances from Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 21: 305-324.

Uremis, I., Arslan, M., Uludag, A. y Sangun, M. K. (2009). Allelopathic potentials of residues of 6 brassica species on johnsongrass [*Sorghum halepense* (L.) Pers.]. *African Journal of Biotechnology*, 8(15): 3497-3501.

Uren, N.C. (2000). Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. In *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil Interface*, ed. R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri. pp. 19–40. New York: Marcel Dekker.

Vivanco, J. M., Bais, H. P., Stermitz, F. R., Thelen, G. C. y Callaway, R. M. (2004). Biogeographical variation in community response to root allelochemistry: novel weapons and exotic invasion. *Ecology Letters*, 7: 285–92

Vokou, D., Margaris, N.S. y Lynch, J.M. (1984). Effects of volatile oils from aromatic shrubs on soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(5): 509–513.

Walker, T., Pal, H., Grotewold, E., y Vivanco, J. (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology*, 132: 44 - 51.

Wang, H.H., Chen, B.J., Hsu, L.M., Cheng, Y.M., Liou, Y.J. y Wang C.Y. (2011). Allelopathic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) in Taiwan. *Allelopathy Journal*, 27(1): 97 – 110.

Webber, B. L. y Woodrow, I. E. (2009). Chemical and physical plant defence across multiple ontogenetic stages in a neotropical rain forest understorey tree. *Journal of Ecology*, 97(4): 761 - 771.

Weidenhamer, J.D. Menelaou, M., Macias, F.A., Fischer, N.H., Richardson, D.R. y Williamson, G.B. (1994). Allelopathic potential of menthofuran monoterpenes from *Calamintha ashei*. *Journal of chemical ecology*, 20 (12): 3345 – 3359.

Weir, T. L., Park, S.W. y Vivanco, J. M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:472–79.

Wieckowska, M., Dörfler, W. y Kirleis, W. (2012). Vegetation and settlement history of the past 9000 years as recorded by lake deposits from Großer Eutiner See (Northern Germany). *Review of Palaeobotany and Palynology*, *In Press*, Corrected Proof, Available online 14 January 2012.

Williams, R. D., y Hoagland, R. E. (1982). The Effects of Naturally Occurring Phenolic Compounds on Seed Germination. *Weed Science*, 30 (2), 206 - 212.

Williamson, G. B. y Weidenhamer, J. D. (1990). Bacterial degradation of juglone. Evidence against allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 1732 - 1742.

Wink, M. (2008). Evolution of Secondary Plants Metabolism. In: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*, 1 - 12.

Wink, M. (2010). *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Second Edition. Wiley – Blackwell. *Annual Plant Reviews*, 39: 1 -10.

Whitehead, D. C. (1964). Identification of *p*-hydroxybenzoic, vanillic, *p*-coumaric and ferulic acids in soils. *Nature*, 202: 417 – 418.

Whittaker, R. H. (1969). The biochemical ecology of higher plants. En: Sondheimer, E y Simeone, Journal of Chemical Ecology, 3: 43 – 49.

Wollenweber, E. (1989). Exudate flavonoids in ferns and their chemosystematic implication. *Biochemical systematics and ecology*, 17(2): 141-144.

Wu, H. W., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. y An, M. (2000). Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): variation of phenolic acids in root tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5321–25.

Yamamoto, Y. (2009) Movement of allelopathic compound coumarin from plant residue of sweet vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum* L.) to soil. *Grassland Science*, 55: 36–40.

Yoshihira, K., Fukuoka, M., Kuroyanagi, M., Natori, S., Umeda, M., Morohoshi, T., Enomoto, M., y Saito, M. (1978). Chemical and Toxicological Studies on Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* var. *latisculum*. I. Introduction, extraction and fractionation of constituents, and toxicological studies including carcinogenicity tests. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 26(8): 2346 – 2364.

Anexos

ANEXO A: Muestreo de los individuos de *P. caudatum* y de las muestras de suelo. Seguimiento del crecimiento de la población de los helechos. Registro de las condiciones meteorológicas.



Figura A.1: Parcela seleccionada para el estudio a 1990 msnm, en una ladera de montaña, perteneciente a la Universidad de Los Andes y conocida como aula ambiental, localizada a 2 Km al norte de la ciudad de Mérida, al Occidente de Venezuela.

www.baigital.ula.ve

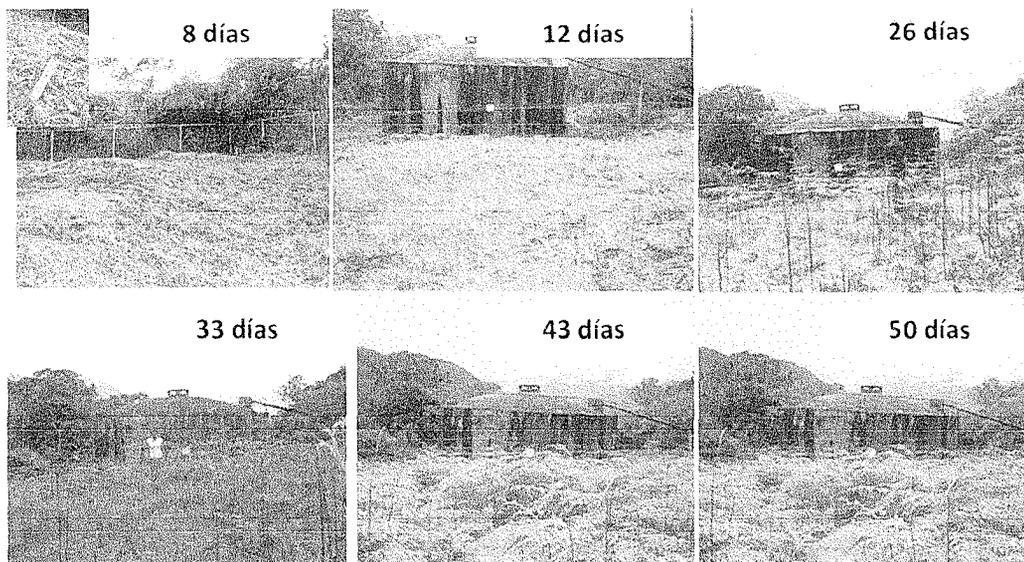


Figura A.2: Seguimiento del crecimiento de los frondes de *P. caudatum* en la parcela seleccionada. Duración: 2 meses.

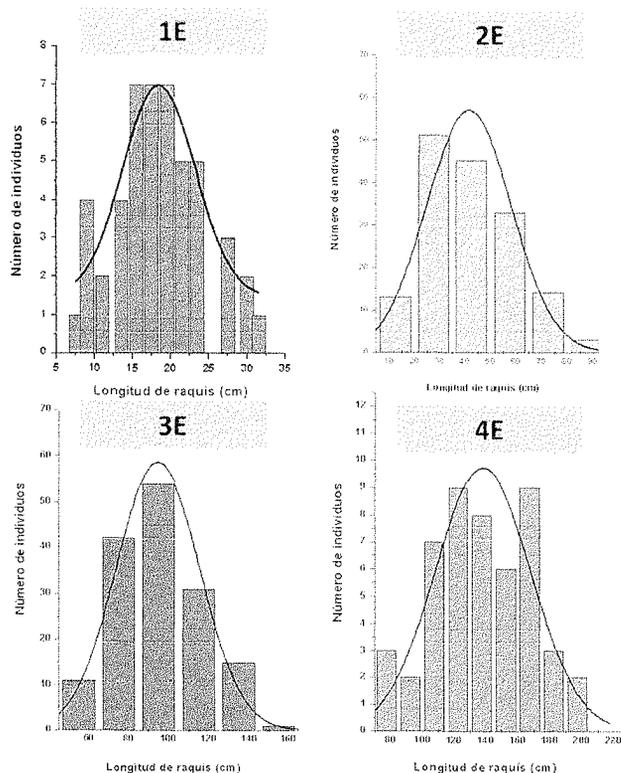


Figura A.3: Histogramas diseñados para la selección del tamaño normal de los frondes de *P. caudatum*.

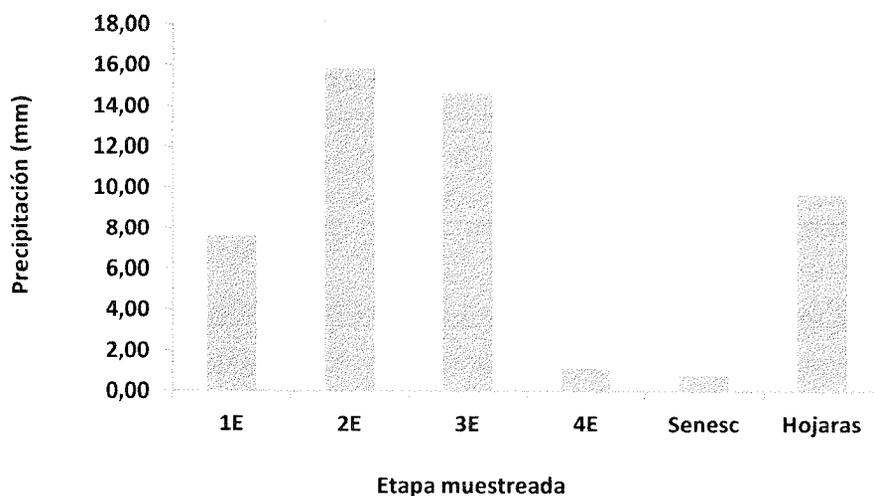


Figura A.4: Grafico de precipitaciones y temperaturas promedio durante el periodo de muestreo.

ANEXO B: Determinación de la presencia de cumarina en cayados y en las diferentes partes de los frondes. Optimización de las metodologías de análisis.

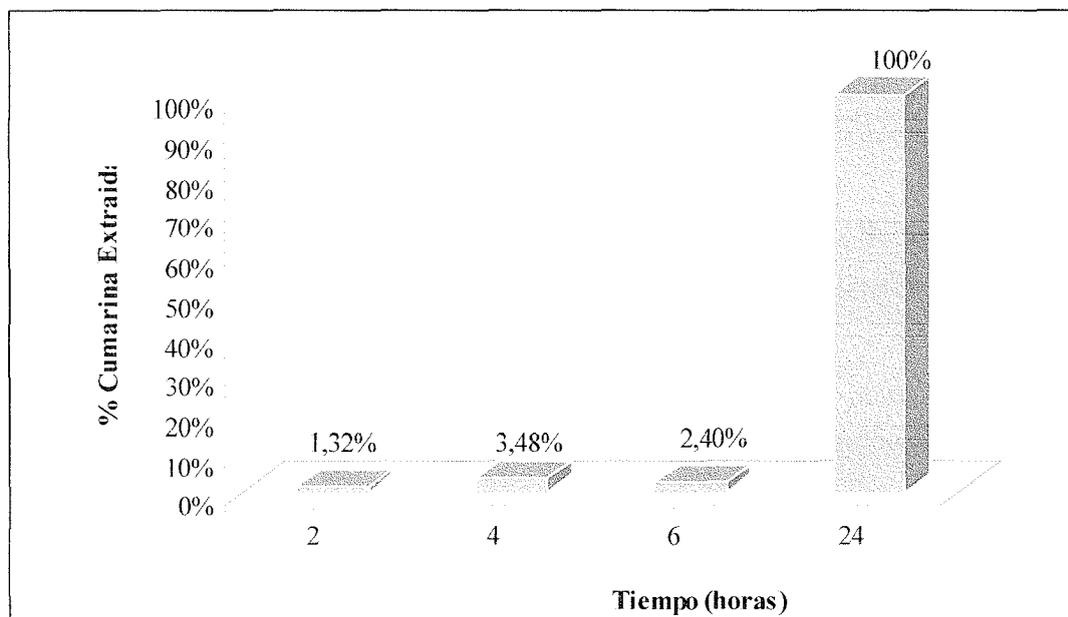


Figura B.1. Lixiviación de cumarina de *P. caudatum* a diferentes tiempos de maceración. (Se toma como el 100 % el valor correspondiente a las 24 h)(Buendía, 2009).

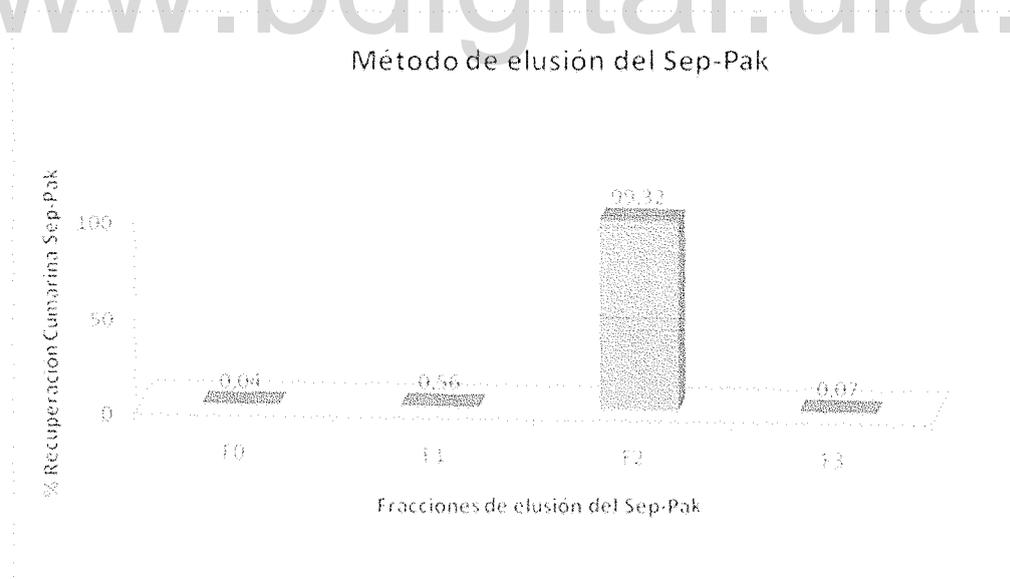


Figura B.2: Porcentaje de recuperación de cumarina en las fracciones de elusión del Sep-Pak C18 durante el proceso de prepurificación de los macerados acuosos de *P. caudatum* antes del análisis por HPLC (Buendía, 2009).

Tabla B.1: Resultados del análisis de los macerados acuosos y orgánicos de la muestra de esporas estudiada para determinar presencia o ausencia de cumarina.

Material	Código de muestra	Masa (g)	Cumarina en MA y EO		
			Relación Masa/Vmacerado	Metodología de maceración	Cumarina Presente (+) o ausente (-)
Esporas	Es1	0,5229	0,15 g/15 ml	MA-1	+ (al parecer)
			0,15 g/10 ml	EO-2	+ (al parecer)

Tabla B.2: Rizomas colectados para la determinación de la presencia o ausencia de cumarina en los macerados acuosos y extractos orgánicos.

Material	Código de muestra	Masa (g)	Macerado acuoso		Extracto orgánico	
			Relación Masa/Vmacerado	Cumarina Presente (+) o ausente (-)	Relación Masa/Vmacerado	Cumarina Presente (+) o ausente (-)
Rizomas	R1	2,5450	2,5 g/50 ml	-	2,5 g/20 ml	-
	R2	4,2803	4 g/50 ml	-	4 g/20 ml	-
	R3	6,0308	6 g/50 ml	-	6 g/20 ml	-
	R4	2,4770	2,5 g/50 ml	-	2,5 g/10 – 15 ml	-
	R5	4,3256	4 g/50 ml	-	4 g/10 – 15 ml	-
	R6	6,4980	6,5 g/50 ml	-	6,5 g/10–15 ml	-
	R7	8,6329	8,6 g/50 ml	-	8,6 g/10 – 15 ml	-
	R8	10,1473	10 g/50 ml	-	10 g/10 – 15 ml	-

Tabla B.3: Resultados del estudio de la muestra del primer par de pinas de fronde en desarrollo (tercera etapa madura) colectada para seleccionar el solvente de extracción de cumarina usando la metodología EO-6.

Material vegetal	Fracciones del 1er par pinas	Masa húmeda (g) de cada parte	Solvente de extracción	Cumarina (U Absorbancia/g de biomasa)
Fronde	Parte 1	2,0393	MeOH	148848,62
	Parte 2	2,0410	EtOH : H ₂ O (1:1)	941316,53
	Parte 3	2,0093	EtOH	219111,65

*porcentaje de humedad del fronde = 73,28%.

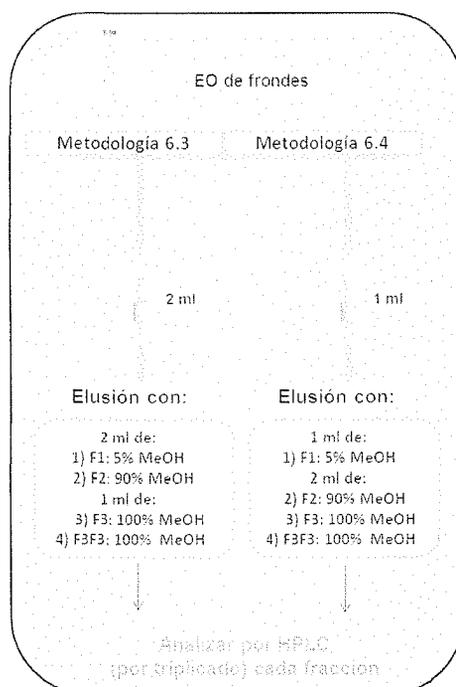


Figura B.3: Metodologías de prepurificación, de los EO de los frondes de *P. caudatum*, usando cartuchos Sep-Pak C18. En las fracciones F3 y F3F3 sale cumarina residual que no salió en F2. Esto determina la metodología seleccionada (tabla B.4) y el factor de corrección que se debe hacer a F2.

Tabla B.4: Optimización de la metodología de prepurificación de extractos orgánicos de frondes de *P. caudatum* que fueron obtenidos al aplicar metodología EO-6.

Material vegetal		Metodología de prepurificación	Cumarina en F3 (100% MeOH)	Cumarina en F3F3 (2da elusión con 100% MeOH)
Fronde	EO-6	EO - 6.3	presente	presente
		EO - 6.4	presente	ausente

*F2 es la fracción rica en cumarina en ambas metodologías de prepurificación, por eso no se indica en la tabla. Estas metodologías se aplicaron por triplicado.

Tabla B.5: Concentración de cumarina en la muestra usada para la construcción de la curva de calibración por adición de estándar (tomada de Buendía, 2009).

Replicas muestra	Área de pico muestra	Área promedio muestra	Cumarina [μM] (de CAS)* en muestra	Cumarina [μM] (de CCS)* en muestra
1	2347976	2363451	90,81	90,15
2	2364684			
3	2377694			

*Razón de las pendientes = 0,978.

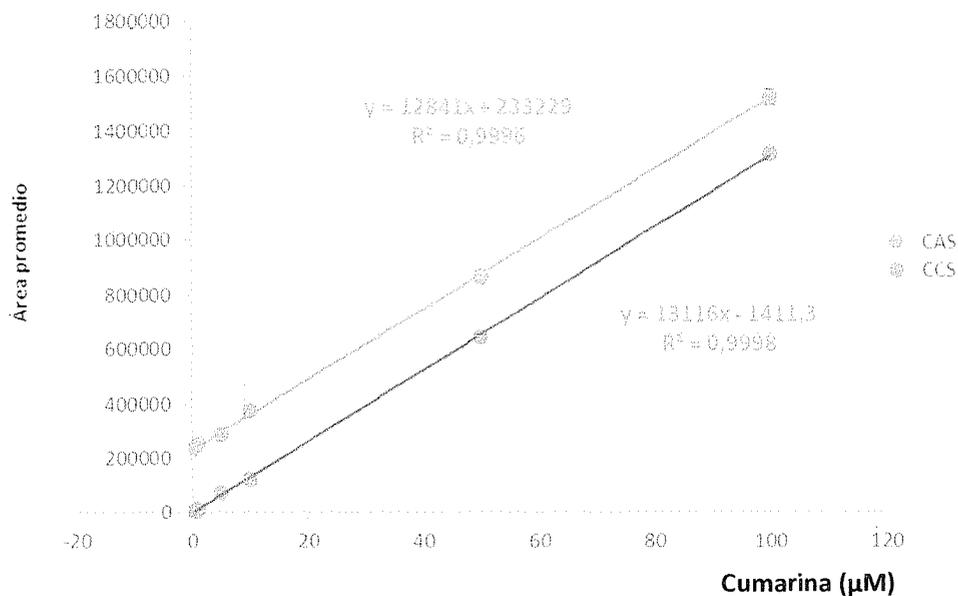


Figura B.4: Superposición de las curvas de calibración para evaluar el efecto de la matriz vegetal en macerados acuosos de *P. caudatum* en el rango de concentraciones de 0,1 µM – 100 µM (tomada de Buendía, 2009).

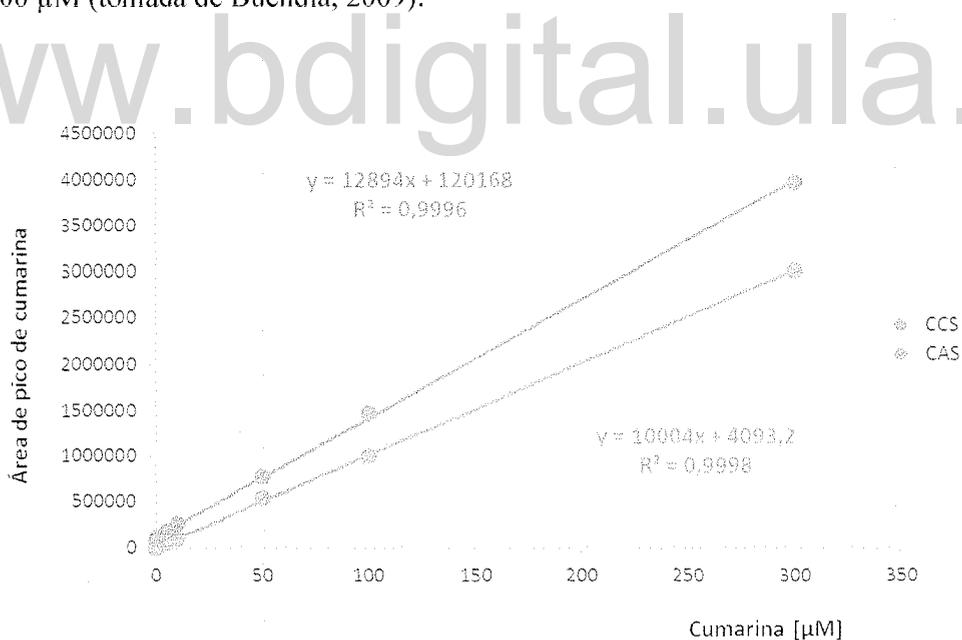


Figura B.5: Superposición de la curva de calibración sencilla de cumarina con la curva de adición estándar de un extracto orgánico (obtenido según EO-6) de un fronde de *P. caudatum* para evaluar el efecto de la matriz vegetal en extractos orgánicos (relación de pendientes = 0,776) en el rango de concentraciones de 0,1 µM – 300 µM (CCS = curva calibración sencilla y CAS = curva de adición estándar). EO = Extracto orgánico.

ANEXO C: Cuantificación de cumarina y fenólicos totales en *Pteridium caudatum*

Tabla C.1: Contenido de cumarina en macerados acuosos y extractos orgánicos de *P. caudatum* (N = 10 para cada etapa).

Etapas	Individuos	Cumarina en MA		Cumarina en EO	
		Contenido (mg/g de biomasa)	Contenido promedio (mg/g de biomasa)	Contenido (mg/g de biomasa)	Contenido promedio (mg/g de biomasa)
1 Etapa		No detectada		No detectada	
2 Etapa	2EFr1	1,457 ± 0,043	1,213 ± 0,429	0,392 ± 0,001	0,710 ± 0,006
	2EFr2	1,371 ± 0,050		0,285 ± 0,016	
	2EFr3	0,682 ± 0,031		0,885 ± 0,001	
	2EFr4	0,638 ± 0,027		0,544 ± 0,004	
	2EFr5	0,704 ± 0,031		1,446 ± 0,001	
	2EFr6	1,288 ± 0,045		0,639 ± 0,012	
	2EFr7	1,206 ± 0,043		0,722 ± 0,008	
	2EFr8	1,366 ± 0,049		0,561 ± 0,015	
	2EFr9	2,012 ± 0,046		0,781 ± 0,001	
	2EFr10	1,404 ± 0,046		0,842 ± 0,002	
3 Etapa	3EFr1	0,716 ± 0,041	0,833 ± 0,297	1,089 ± 0,004	1,188 ± 0,029
	3EFr2	0,707 ± 0,031		0,885 ± 0,037	
	3EFr3	0,538 ± 0,027		0,666 ± 0,003	
	3EFr4	0,862 ± 0,031		2,470 ± 0,007	
	3EFr5	0,843 ± 0,031		1,128 ± 0,001	
	3EFr6	0,697 ± 0,032		0,892 ± 0,018	
	3EFr7	0,599 ± 0,029		1,099 ± 0,004	
	3EFr8	1,587 ± 0,037		1,824 ± 0,071	
	3EFr9	0,770 ± 0,034		0,987 ± 0,021	
	3EFr10	1,014 ± 0,036		0,840 ± 0,078	
4 Etapa	4EFr1	0,332 ± 0,025	0,319 ± 0,196	0,693 ± 0,002	1,000 ± 0,190
	4EFr2	0,267 ± 0,026		1,385 ± 0,622	
	4EFr3	0,306 ± 0,024		0,385 ± 0,023	
	4EFr4	0,292 ± 0,023		0,394 ± 0,001	
	4EFr5	0,133 ± 0,024		0,234 ± 0,001	
	4EFr6	0,475 ± 0,025		0,881 ± 0,001	
	4EFr7	0,726 ± 0,023		2,042 ± 0,078	
	4EFr8	0,461 ± 0,029		1,236 ± 0,017	
	4EFr9	0,087 ± 0,030		1,855 ± 0,055	
	4EFr10	0,111 ± 0,026		0,896 ± 0,115	
Senescente	SenFr1	0,049 ± 0,011	0,078 ± 0,046	0,045 ± 0,004	0,079 ± 0,001
	SenFr2	0,082 ± 0,012		0,176 ± 0,001	
	SenFr3	0,078 ± 0,011		0,036 ± 0,001	
	SenFr4	0,102 ± 0,011		0,051 ± 0,001	
	SenFr5	0,015 ± 0,016		0,016 ± 0,002	
	SenFr6	0,154 ± 0,011		0,146 ± 0,004	
	SenFr7	0,016 ± 0,011		0,022 ± 0,001	
	SenFr8	0,055 ± 0,011		0,066 ± 0,001	
	SenFr9	0,086 ± 0,011		0,075 ± 0,003	
	SenFr10	0,140 ± 0,011		0,156 ± 0,001	
Hojarasca		No detectada		No detectada	

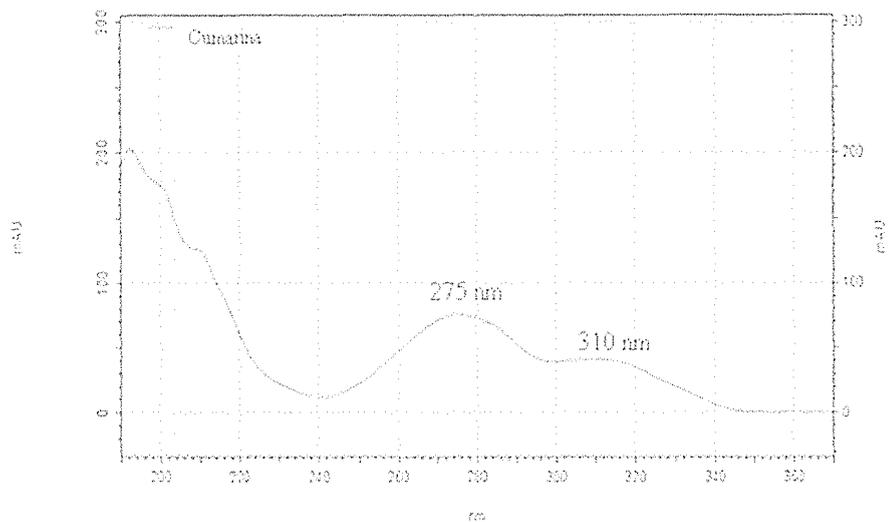


Figura C.1: Espectro ultravioleta de la cumarina patrón.

Tabla C.2: Contenido de fenólicos totales en macerados acuosos y extractos orgánicos de *P. caudatum* (N = 10 para cada etapa).

Etapas	Individuos	Fenólicos totales en MA*		Fenólicos totales en EO*	
		Contenido (mg/g de biomasa)	Contenido promedio (mg/g de biomasa)	Contenido (mg/g de biomasa)	Contenido promedio (mg/g de biomasa)
1 Etapa	1Ecay1	0,0153 ± 0,0355	1,6034 ± 1,5265	2,5089 ± 0,0084	7,6898 ± 3,4397
	1Ecay2	1,9220 ± 0,0643		5,5535 ± 0,0155	
	1Ecay3	0,4449 ± 0,0597		4,5966 ± 0,0142	
	1Ecay4	1,7960 ± 0,0585		5,4376 ± 0,0140	
	1Ecay5	0,8160 ± 0,0603		8,8000 ± 0,0142	
	1Ecay6	2,5644 ± 0,0308		8,5675 ± 0,0149	
	1Ecay7	0,8294 ± 0,0312		6,8065 ± 0,0149	
	1Ecay8	1,1462 ± 0,0400		10,8221 ± 0,0192	
	1Ecay9	5,3941 ± 0,0275		14,3874 ± 0,0140	
	1Ecay10	1,1061 ± 0,0328		9,4182 ± 0,0156	
2 Etapa	2EFr1	25,7852 ± 0,1633	21,2624 ± 8,0035	9,4664 ± 0,0437	11,8195 ± 4,3075
	2EFr2	19,7439 ± 0,1658		12,4489 ± 0,0516	
	2EFr3	11,8558 ± 0,0413		5,4826 ± 0,0202	
	2EFr4	13,0196 ± 0,0382		9,1669 ± 0,0178	
	2EFr5	7,6875 ± 0,0400		9,6976 ± 0,0202	
	2EFr6	28,4126 ± 0,1759		13,5447 ± 0,0469	
	2EFr7	23,8232 ± 0,1355		19,1262 ± 0,0509	
	2EFr8	24,7314 ± 0,1433		9,9839 ± 0,0497	
	2EFr9	24,8954 ± 0,1642		18,7459 ± 0,0512	
	2EFr10	32,6694 ± 0,1939		10,5316 ± 0,0472	

* Contenido de fenólicos totales como equivalentes de tanino de quebracho.

Continuación Tabla C.2: Contenido de fenólicos totales en macerados acuosos y extractos orgánicos de *P. caudatum* (N = 10 para cada etapa).

Etapas	Individuos	Fenólicos totales en MA		Fenólicos totales en EO	
		Contenido (mg/g de biomasa)	Contenido promedio (mg/g de biomasa)	Contenido (mg/g de biomasa)	Contenido promedio (mg/g de biomasa)
3 Etapa	3EFr1	12,8598 ± 0,1331	16,1996 ± 3,0112	8,3912 ± 0,0424	15,1535 ± 5,2765
	3EFr2	14,3517 ± 0,1056		8,1724 ± 0,0317	
	3EFr3	18,8169 ± 0,1122		15,1219 ± 0,0360	
	3EFr4	14,2667 ± 0,1066		12,0458 ± 0,0347	
	3EFr5	17,8953 ± 0,1168		21,9121 ± 0,0493	
	3EFr6	16,0657 ± 0,1124		20,2657 ± 0,0465	
	3EFr7	11,8380 ± 0,0961		13,7048 ± 0,0350	
	3EFr8	15,3584 ± 0,1211		23,0191 ± 0,0528	
	3EFr9	19,6972 ± 0,1273		16,6508 ± 0,0419	
	3EFr10	20,8466 ± 0,1347		12,2509 ± 0,0386	
4 Etapa	4EFr1	10,3681 ± 0,0836	11,5258 ± 2,9795	11,6507 ± 0,0300	15,2259 ± 4,5090
	4EFr2	10,1262 ± 0,0839		7,9875 ± 0,0268	
	4EFr3	13,6247 ± 0,0887		10,6808 ± 0,0281	
	4EFr4	12,7099 ± 0,0834		18,8698 ± 0,0413	
	4EFr5	8,5057 ± 0,0764		15,5387 ± 0,0352	
	4EFr6	14,1353 ± 0,0932		10,9138 ± 0,0294	
	4EFr7	15,8320 ± 0,0948		17,5746 ± 0,0389	
	4EFr8	14,3700 ± 0,1015		19,4831 ± 0,0441	
	4EFr9	7,3714 ± 0,0946		19,9406 ± 0,0453	
	4EFr10	8,2144 ± 0,0826		19,6197 ± 0,0435	
Senescente	SenFr1	4,6262 ± 0,0356	6,5893 ± 1,4820	11,3116 ± 0,0274	15,0618 ± 6,7880
	SenFr2	9,7478 ± 0,0230		18,0704 ± 0,0434	
	SenFr3	6,8826 ± 0,0422		18,0696 ± 0,0397	
	SenFr4	6,8363 ± 0,0424		18,7544 ± 0,0412	
	SenFr5	7,5863 ± 0,0542		24,1149 ± 0,0534	
	SenFr6	6,4118 ± 0,0410		0,1986 ± 0,0243	
	SenFr7	6,1366 ± 0,0397		8,8750 ± 0,0195	
	SenFr8	6,1304 ± 0,0395		17,9584 ± 0,0395	
	SenFr9	4,5430 ± 0,0374		13,9469 ± 0,0323	
	SenFr10	6,9917 ± 0,0438		19,3178 ± 0,0424	
Hojarasca	HojFr1	0,1267 ± 0,0209	0,1532 ± 0,0421	0,6007 ± 0,0266	0,8238 ± 0,4886
	HojFr2	0,1304 ± 0,0216		0,3026 ± 0,0278	
	HojFr3	0,1529 ± 0,0219		0,4704 ± 0,0281	
	HojFr4	0,1849 ± 0,0221		0,6327 ± 0,0283	
	HojFr5	0,0941 ± 0,0276		0,6802 ± 0,0350	
	HojFr6	0,1191 ± 0,0242		0,8948 ± 0,0305	
	HojFr7	0,2131 ± 0,0230		1,1750 ± 0,0291	
	HojFr8	0,1632 ± 0,0201		2,0300 ± 0,0246	
	HojFr9	0,1264 ± 0,0203		0,5808 ± 0,0258	
	HojFr10	0,2214 ± 0,0204		0,8709 ± 0,0260	

* Contenido de fenólicos totales como equivalentes de tanino de quebracho.

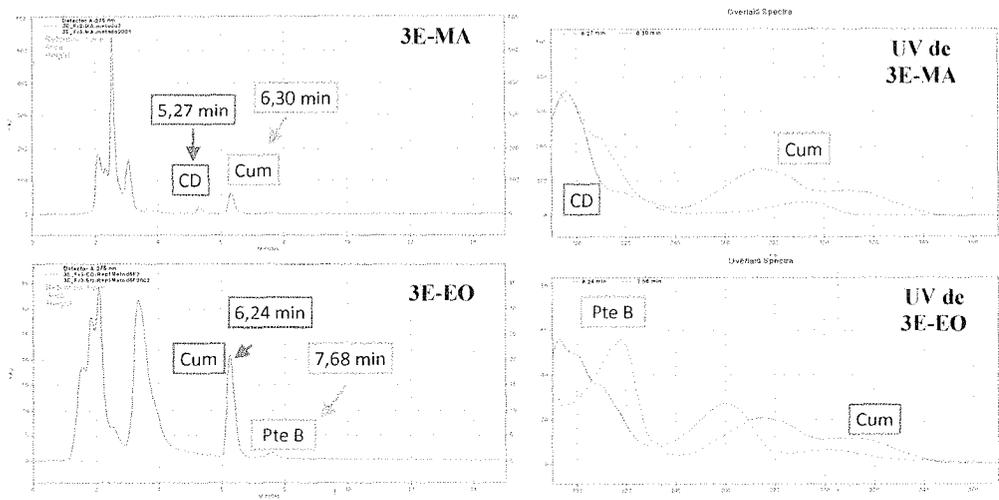


Figura C.2: Cromatogramas del MA y del EO de un individuo de 3E fenológica con los espectros UV correspondientes a los picos de interés en cada uno (CD = compuesto desconocido; Cum = cumarina).

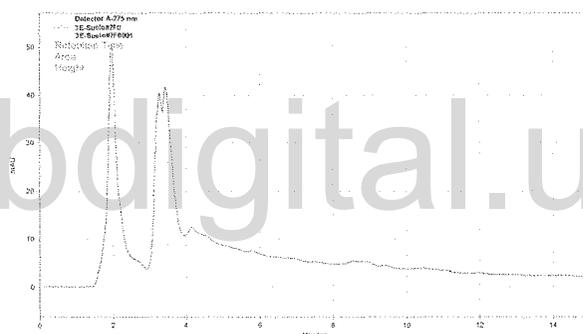


Figura C.3: Cromatograma del extracto orgánico (metanólico) de una muestra de suelo.

Tabla C.3: Contenido total de cumarina y compuestos fenólicos por etapa fenológica de los frondes de *P. caudatum*.

Etapa Fenológica*	Cumarina		Compuestos fenólicos	
	Contenido total (MA+EO) (mg/g de biomasa)	Desviación estándar (MA+EO)	Contenido total (MA+EO) (mg/g de biomasa)	Desviación estándar (MA+EO)
1E	-	-	9,2933 ^c	4,6708
2E	1,9226 ^d	0,4300	33,0819 ^d	10,5996
3E	2,0213 ^d	0,7410	31,3531 ^a	6,8268
4E	1,3193 ^b	0,7171	26,7517 ^d	5,0853
Senes	0,1564 ^c	0,0985	21,6510 ^b	7,4984
Hoj	-	-	0,9770 ^d	0,5039

*N = 10, para cada etapa fenológica; Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, $p > 0,05$, según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

ANEXO D. Bioensayos de fitotoxicidad

Tabla D.1: Datos de actividad de cumarina patrón (SIGMA, 99% pureza) sobre la elongación de tallo y raíz y la germinación de lechuga.

Concentración de cumarina (μM)	TALLO		RAIZ		Germinación	
	Actividad	ds	Actividad	ds	Actividad	ds
200	-98	2,79	-77	2,93	5,88	3,40
100	-85	3,17	-80	4,19	5,88	5,88
50	-82	3,72	-59	9,83	17,65	3,40
25	-58	3,57	-30	7,50	5,88	10,19
12,5	-34	7,25	-33	6,60	9,80	3,40
6,3	-19	5,19	-26	3,29	0,00	10,19
3,2	-3	3,52	0	0,00	17,65	3,40
1,6	-6	4,94	-2	1,73	17,65	3,40
0,8	-8	6,19	-3	3,50	17,65	3,40
0,4	-7	2,96	-1	6,47	17,65	3,40
0,2	-8	4,59	10	6,33	15,69	3,40
0,1	4	4,11	7	5,83	15,69	3,40

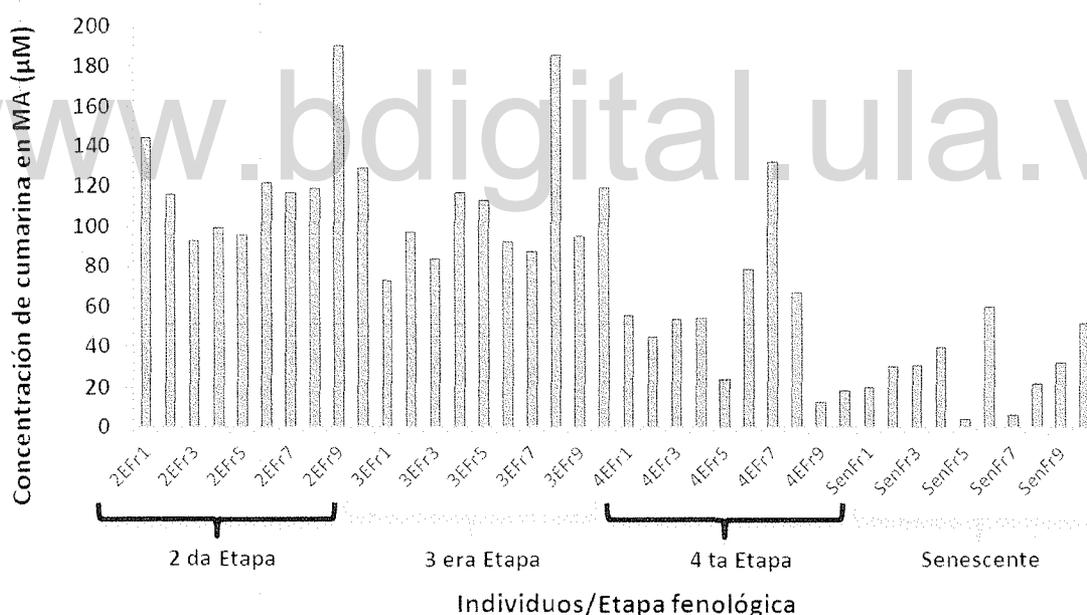


Figura D.1: Concentración de cumarina en los MA por cada etapa fenológica de *P. caudatum* en cada individuo.

Tabla D.2: Datos de actividad de los MA de *P. caudatum* sobre la elongación de tallo y raíz y la germinación de lechuga.

Etapa Fenológica	Muestra	Cumarina MA [μ M]	Derivados fenólicos MA [mg/L]	% Actividad MA sobre Lechuga					
				TALLO ⁽¹⁾		RAIZ ⁽¹⁾		GERMINACIÓN ⁽²⁾	
				Actividad	DS*	Actividad	DS*	Actividad	DS*
Etapa 2	2E1	138,99	315,32	-77	5,30	-68	3,67	-11,76	3,40
	2E2	111,80	199,46	-68	4,77	-76	7,44	15,69	3,40
	2E3	89,86	193,06	-59	5,68	-67	6,66	15,69	3,40
	2E4	95,98	252,32	-52	6,68	-73	7,15	11,76	5,88
	2E5	92,76	203,45	-54	3,99	-65	7,23	17,65	3,40
	2E6	117,70	366,83	-65	6,67	-84	5,53	15,69	3,40
	2E7	113,07	360,68	-65	6,32	-79	2,77	13,73	6,79
	2E8	114,73	353,14	-75	4,48	-68	3,67	-19,61	16,98
	2E9	182,69	272,51	-89	2,17	-81	2,84	-5,88	3,40
	2E10	124,17	382,61	-78	8,03	-86	2,07	9,80	8,99
Etapa 3	3E1	70,34	179,38	-46	8,45	-68	3,67	-3,92	6,79
	3E2	93,47	500,29	-59	4,30	-68	3,67	-1,96	6,79
	3E3	80,73	407,27	-65	4,61	-81	5,96	-21,57	8,99
	3E4	112,02	265,73	-73	13,76	-81	8,45	-1,96	18,91
	3E5	108,39	365,98	-68	6,13	-87	2,72	15,69	3,40
	3E6	88,88	345,01	-56	4,84	-86	3,30	-7,84	30,19
	3E7	84,17	282,61	-54	6,69	-70	8,23	15,69	3,40
	3E8	177,71	272,06	-88	4,18	-91	1,93	-15,69	6,79
	3E9	91,69	389,52	-63	5,58	-75	6,09	15,69	3,40
	3E10	114,32	349,86	-76	6,61	-84	4,24	15,69	3,40

$$(1) \% \text{ Actividad} = \left(\frac{L_{\text{tratamiento}} - L_{\text{control}}}{L_{\text{control}}} \right) \times 100$$

(*) DS = desviación estándar

$$(2) \% \text{ actividad sobre germinación} = \left(\frac{NSG_{\text{tratamiento}} - NSG_{\text{control}}}{NSG_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Continuación Tabla D.2: Datos de actividad de los MA de *P. caudatum* sobre la elongación de tallo y raíz y la germinación de lechuga.

Etapa Fenológica	Muestra	Cumarina MA [μ M]	Derivados fenólicos MA [mg/L]	% Actividad MA sobre Lechuga					
				TALLO		RAIZ		GERMINACIÓN	
				Actividad	DS	Actividad	DS	Actividad	DS
Etapa 4	4E1	53,90	202,77	-41	10,12	-55	6,30	15,69	3,40
	4E2	43,26	192,17	-48	11,22	-54	7,99	13,73	3,40
	4E3	52,08	377,39	-58	5,93	-61	5,57	7,84	8,99
	4E4	52,46	324,52	-39	12,08	-59	10,04	17,65	3,40
	4E5	23,71	160,86	-30	9,66	-49	7,04	15,69	3,40
	4E6	75,87	277,95	-66	4,34	-73	4,11	17,65	3,40
	4E7	126,90	280,97	-81	11,51	-85	2,66	3,92	6,79
	4E8	64,84	232,73	-56	17,79	-66	10,76	17,65	3,40
	4E9	12,80	57,33	0	0,00	-27	10,29	17,65	3,40
	4E10	18,37	97,29	-21	16,21	-34	19,20	15,69	3,40
Senescente	Senes1	19,81	693,09	-47	9,64	-67	9,71	11,76	5,88
	Senes2	29,74	522,47	-47	26,43	-54	19,99	0,00	15,56
	Senes3	30,45	694,88	-85	8,43	-88	4,01	5,88	10,19
	Senes4	38,88	701,59	-96	2,21	-90	7,96	11,76	3,40
	Senes5	4,86	271,39	44	18,11	-10	15,31	17,65	3,40
	Senes6	57,97	698,99	-100	0,02	-94	0,74	-15,69	6,79
	Senes7	6,97	721,57	-44	13,60	-68	12,94	15,69	3,40
	Senes8	21,94	700,98	-70	18,91	-84	7,47	-13,73	17,97
	Senes9	31,62	649,49	-61	17,60	-66	10,16	-3,92	18,91
	Senes10	50,63	701,39	-91	3,97	-87	5,20	13,73	3,40

$$(1) \% \text{ Actividad} = \left(\frac{L_{\text{tratamiento}} - L_{\text{control}}}{L_{\text{control}}} \right) \times 100$$

(*) DS = desviación estándar

$$(2) \% \text{ actividad sobre germinación} = \left(\frac{NSG_{\text{tratamiento}} - NSG_{\text{control}}}{NSG_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Tabla D.3: Concentración de pterosina A y pterosina B en los MA de los individuos de 1E y 2E fenológica.

MA INDIVIDUOS Cayados y 2E	Concent Pterosina B [μ M]	Concent Pterosina A [μ M]
1E_Cayad1	1,27	0,21
1E_Cayad2	5,98	0,61
1E_Cayad3	1,77	0,28
1E_Cayad4	1,36	0,16
1E_Cayad5	0,35	0,20
1E_Cayad6	1,63	0,53
1E_Cayad7	5,59	0,91
1E_Cayad8	0,78	0,31
1E_Cayad9	1,95	0,70
1E_Cayad10	1,31	0,15
2EFr1	4,33	2,66
2EFr2	1,37	3,69
2EFr3	2,36	2,95
2EFr4	2,26	5,49
2EFr5	1,89	2,11
2EFr6	3,95	1,38
2EFr7	3,62	0,86
2EFr8	5,53	0,85
2EFr9	2,99	1,20
2EFr10	3,10	2,51

*1E primera etapa; 2E = segunda etapa.

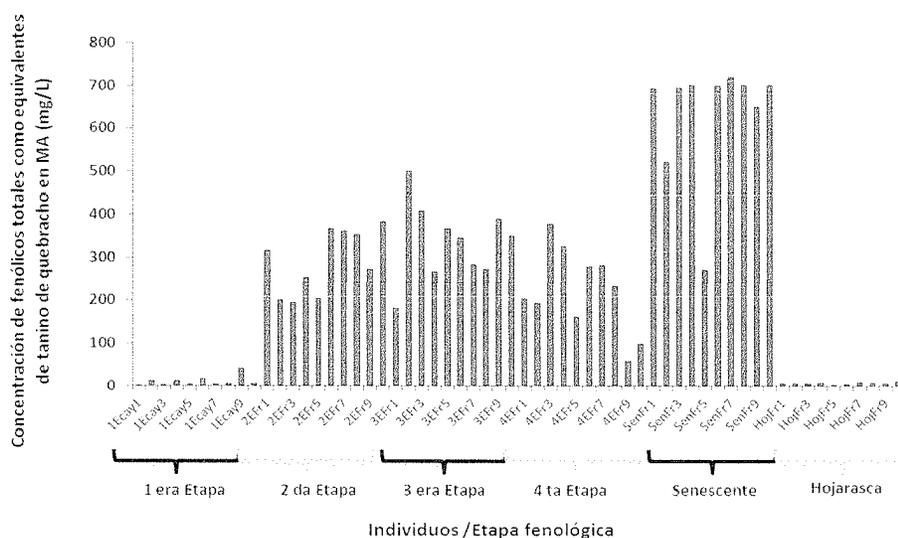


Figura D.2: Concentración de fenólicos totales en los MA de los frondes de *P. caudatum* para todos los individuos por cada etapa fenológica.

Tabla D.4: Actividad fitotóxica de las pterosinas y el Linurón sobre el crecimiento de tallo y raíz de *L. sativa*.

Concentraciones (μM)	TALLO DE <i>Lactuca sativa</i>							
	Pterosina A		Pterosina B		Pterosina A+B		Linurón	
	promedio	ds	promedio	ds	promedio	ds	promedio	ds
50	8	13,55	15	12,66	5,00	14,30	-30	5,55
25	0	-	8	13,02	-4,00	9,56	-13	9,87
12,5	7	10,57	-5	13,95	-2,00	8,68	-3	15,42
6,3	1	-	-4	9,16	-3,00	23,82	-3	18,12
3,2	14	16,25	-12	18,23	-7,00	18,24	4	28,64
1,6	2	13,12	-10	9,89	-16,00	12,63	-2	5,08
0,8	12	6,97	-6	15,44	0,00	-	2	7,92
0,4	-6	8,04	-7	8,68	-12,00	13,91	10	21,61
RAIZ DE <i>Lactuca sativa</i>								
50	68	33,1	53	24,2	29	23,0	14	19,8
25	18	21,2	30	19,0	14	31,7	14	18,4
12,5	19	18,6	25	15,9	-3	-	7	25,3
6,3	20	39,6	16	20,5	-8	16,7	11	17,2
3,2	14	27,5	5	18,6	4	14,4	9	15,0
1,6	30	18,4	-4	9,2	-5	12,4	14	24,7
0,8	30	29,2	-10	9,9	13	23,6	15	15,2
0,4	4	15,2	-9	12,9	6	15,7	15	21,2