



**Evaluación *in vitro* del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) sobre la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) a nivel de laboratorio**

Pumisacho Galarza, Andrea Dolores

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dra. Proaño Tuma, Karina Isabel Ph. D.

5 de marzo de 2021

Document Information

Analyzed document TRABAJO DE TITULACIÓN Evaluación in vitro del efecto alelopático del aceite esencial de Tagetes minuta L. (chircho).docx (D97358786)

Submitted 3/5/2021 4:40:00 PM

Submitted by PROAÑO TUMA KARINA ISABEL

Submitter email kiproanio@espe.edu.ec

Similarity 2%

Analysis address kiproanio.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Kevin Aguirre Tesi v11 (firmas) FORMATO ESPE.docx</b> Document Kevin Aguirre Tesi v11 (firmas) FORMATO ESPE.docx (D79136644) Submitted by: kiproanio@espe.edu.ec Receiver: kiproanio.espe@analysis.orkund.com		2
<b>W</b>	URL: <a href="http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/22798/1/T-ESPE-044000.pdf">http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/22798/1/T-ESPE-044000.pdf</a> Fetched: 12/4/2020 8:49:37 AM		1
<b>SA</b>	<b>TESIS FINAL RIVERA ANDRES.pdf</b> Document TESIS FINAL RIVERA ANDRES.pdf (D44100926)		2
<b>SA</b>	<b>Urkund- JENNIFER TORRES.docx</b> Document Urkund- JENNIFER TORRES.docx (D29569925)		2
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Urkund_Saraguro_Olalla_Francisco.docx</b> Document Urkund_Saraguro_Olalla_Francisco.docx (D92765513) Submitted by: mbjadan@espe.edu.ec Receiver: mbjadan.espe@analysis.orkund.com		2

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**KARINA**  
**ISABEL**

.....  
Karina Isabel Proaño Tuma, Ph.D.

CC: 1707245104



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Evaluación *in vitro* del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) sobre la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) a nivel de laboratorio” fue realizado por la señorita **Pumisacho Galarza, Andrea Dolores** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 5 de marzo de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**KARINA  
ISABEL**

Proaño Tuma, Karina Isabel, Ph.D.

C. C.: 1707245104



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Pumisacho Galarza, Andrea Dolores**, con cédula de ciudadanía n° 1722344379, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación *in vitro* del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) sobre la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) a nivel de laboratorio** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 5 de marzo de 2021**

Firma

*Andrea Pumisacho*  
.....

**Pumisacho Galarza, Andrea Dolores**

C.C.: 1722344379



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **Pumisacho Galarza, Andrea Dolores**, con cédula de ciudadanía n° 1722344379, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación *in vitro* del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) sobre la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) a nivel de laboratorio** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 5 de marzo de 2021**

Firma

.....

**Pumisacho Galarza, Andrea Dolores**

C.C.: 1722344379

## Dedicatoria

A Dios que ha iluminado cada uno de mis pasos, me ha guiado según su Santa  
Voluntad y me ha sostenido en los momentos difíciles.

A mis padres Adriana y Milton, por su apoyo incondicional, su cariño, su paciencia y sus  
sabios consejos que me han impulsado a seguir.

A mi hermana María Isabel, por ser un soporte en mi camino y ayudarme en los  
momentos difíciles.

A mis tíos, por su cariño y sus palabras de aliento que me han ayudado a continuar.

Andrea Dolores Pumisacho Galarza

## Agradecimientos

A mis padres, Adriana y Milton, les agradezco por apoyarme en los retos que se presentaron durante la elaboración de la tesis y por darme sus consejos en base a la experiencia que han tenido. Su apoyo moral ha sido muy importante durante toda mi carrera universitaria y me ha impulsado a seguir en cada dificultad que se ha presentado.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE y a mis profesores por educarme y formarme como profesional. Por impartirme nuevos conocimientos en cada uno de los periodos académicos.

A mi tutora de tesis, Dra. Karina Proaño, por permitirme ingresar al laboratorio de Biotecnología Vegetal. Le agradezco por su paciencia, apoyo, orientación y por el tiempo que me ha brindado durante la elaboración del presente estudio.

A mi cotutora, Dra. Blanca Naranjo, por guiarme en el proceso de la realización de mi tesis. Agradezco su paciencia y el tiempo que otorgó a este trabajo de titulación.

A mis compañeros de proyecto de investigación, Paul y Emilia, gracias por su colaboración en la realización de este estudio,

A mis amigos, Giss, Domi, Paul, Isra, Jenny y Melani por su apoyo moral durante toda la carrera universitaria.

## Índice de Contenido

Evaluación <i>in vitro</i> del efecto alelopático del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (chincho) sobre la germinación de las semillas de <i>Chenopodium murale</i> L. (cenizo negro) y <i>Cynodon dactylon</i> L. (césped) a nivel de laboratorio .....	1
Hoja de resultados de la herramienta Urkund.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas .....	12
Índice de Figuras.....	13
Índice de Ecuaciones .....	15
Resumen.....	17
Abstract .....	18
Capítulo 1: Introducción.....	19
Formulación del Problema .....	19
Justificación del Problema .....	21
Objetivos.....	22
Objetivo General .....	22



	9
Objetivos Específicos .....	22
Marco Teórico.....	23
Especies del género <i>Tagetes</i> en Ecuador y su utilidad.....	23
<i>Tagetes minuta</i> L. (chincho) .....	25
Especies de malezas <i>Chenopodium murale</i> y <i>Cynodon dactylon</i> y su efecto en los cultivos agrícolas.....	26
Efecto alelopático de las plantas .....	30
Metabolitos secundarios.....	32
Aceites esenciales.....	35
Métodos de identificación de metabolitos secundarios .....	36
Capítulo 2: Materiales y Métodos .....	39
Participantes.....	39
Localización.....	39
Duración del Trabajo de Titulación.....	39
Diseño experimental .....	39
Recolección del material vegetal.....	40
Extracción del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (chincho) a través de arrastre de vapor.....	41
Determinación de los principios activos del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (chincho) por cromatografía en capa fina.....	42

Ensayo para determinar el efecto alelopático del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. en la germinación de <i>Chenopodium murale</i> L. y <i>Cynodon dactylon</i> L. ....	43
Análisis estadístico .....	46
Capítulo 3: Resultados .....	48
Obtención del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. ....	48
Separación del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. ....	49
Evaluación del efecto alelopático del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. en la germinación de las semillas de <i>Cynodon dactylon</i> L. y <i>Chenopodium murale</i> L. ....	50
Análisis de la variable de germinación en las semillas de <i>Chenopodium murale</i> y <i>Cynodon dactylon</i> . ....	53
Análisis de la variable longitud de brote en las semillas de <i>Chenopodium murale</i> y <i>Cynodon dactylon</i> . ....	58
Determinación del porcentaje del efecto alelopático del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> en la germinación de <i>Chenopodium murale</i> y <i>Cynodon dactylon</i> . ....	64
Concentración efectiva de la disolución del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> . ....	66
Capítulo 4: Discusión. ....	70
Extracción del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. ....	70
Cromatografía en capa fina del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (chincho) .....	71
Evaluación del efecto alelopático del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (chincho) .....	72
Capítulo 5: Conclusiones. ....	78
Capítulo 6: Recomendaciones. ....	80

	11
Capítulo 7: Bibliografía .....	81
Capítulo 8: Anexos .....	107

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Clasificación taxonómica del género <u>Tagetes</u></i> .....	23
<b>Tabla 2</b> <i>Clasificación taxonómica de <u>Chenopodium murale</u></i> .....	27
<b>Tabla 3</b> <i>Clasificación taxonómica de <u>Cynodon dactylon</u> L.</i> .....	29
<b>Tabla 4</b> <i>Niveles y factores del diseño experimental</i> .....	40
<b>Tabla 5</b> <i>Concentraciones de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u>, DMSO y Tween 20 utilizadas en cada tratamiento</i> .....	45
<b>Tabla 6</b> <i>Características organolépticas del aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u></i> .....	49
<b>Tabla 7</b> <i>ANOVA de la variable germinación respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> y el tipo de semilla</i> .....	55
<b>Tabla 8</b> <i>ANOVA de la variable longitud de brote respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> y el tipo de semilla</i> .....	61
<b>Tabla 9</b> <i>Índice alelopático del aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> en las semillas de <u>Cynodon dactylon</u></i> .....	65
<b>Tabla 10</b> <i>Concentración efectiva de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> EC<sub>g50</sub> y EC<sub>g90</sub></i> .....	66
<b>Tabla 11</b> <i>Concentración efectiva de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> EC<sub>b50</sub> y EC<sub>b90</sub></i> .....	68

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Fotografía de <u>Tagetes minuta</u> .....	25
<b>Figura 2</b> Fotografía de <u>Chenopodium murale</u> .....	28
<b>Figura 3</b> Fotografía de <u>Cynodon dactylon</u> .....	30
<b>Figura 4</b> Esquema de una cromatografía en capa fina.....	37
<b>Figura 5</b> Fotografía de la recolección de <u>Tagetes minuta</u> .....	41
<b>Figura 6</b> Fotografía de la extracción del aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> .....	42
<b>Figura 7</b> Fotografía de una semilla de <u>Cynodon dactylon</u> (césped) germinada.....	44
<b>Figura 8</b> Fotografía del aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> obtenido por arrastre de vapor.....	48
<b>Figura 9</b> Factores de retardo ( $R_f$ ) obtenidos en la cromatografía en capa fina del aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> .....	50
<b>Figura 10</b> Semillas de <u>Chenopodium murale</u> y <u>Cynodon dactylon</u> frente a diferentes concentraciones de una disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> .....	51
<b>Figura 11</b> Porcentaje de germinación de <u>Chenopodium murale</u> y <u>Cynodon dactylon</u> en relación a la concentración de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> .....	54
<b>Figura 12</b> Gráfica de interacción del porcentaje de germinación respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> y el tipo de semilla .	56
<b>Figura 13</b> Gráfica de normalidad Q-Q plot con los residuos de la variable germinación y prueba de Shapiro-Wilks modificado .....	57
<b>Figura 14</b> Prueba de Kruskal Wallis realizada en los tratamientos de germinación.....	58
<b>Figura 15</b> Longitud de brote de <u>Chenopodium murale</u> y <u>Cynodon dactylon</u> en relación a la concentración de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> .....	60

<b>Figura 16</b> <i>Gráfica de interacción de la longitud de brote respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u> y el tipo de semilla</i> .....	62
<b>Figura 17</b> <i>Gráfica de normalidad Q-Q plot con los residuos de la variable longitud de brote y prueba de Shapiro-Wilks modificado</i> .....	63
<b>Figura 18</b> <i>Prueba de Kruskal Wallis realizada en los tratamientos de longitud de brote</i> .....	64
<b>Figura 19</b> <i>Curva Dosis-Respuesta para la germinación de las semillas de <u>Chenopodium murale</u> y <u>Cynodon dactylon</u> en relación a la disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u></i> .....	67
<b>Figura 20</b> <i>Curva Dosis-Respuesta para la longitud de brote de las semillas de <u>Chenopodium murale</u> y <u>Cynodon dactylon</u> en relación a la disolución de aceite esencial de <u>Tagetes minuta</u></i> .....	69

## Índice de Ecuaciones

<b>Ecuación 1</b> Cálculo del rendimiento de la extracción del aceite esencial.....	42
<b>Ecuación 2</b> Porcentaje de germinación .....	43
<b>Ecuación 3</b> Cálculo del índice alelopático.....	46
<b>Ecuación 4</b> Cálculo del índice alelopático sintético.....	46
<b>Ecuación 5</b> Función log-logistic de tres parámetros.....	47

## Listado de Abreviaturas

<b>mL</b>	Militros
<b>mg</b>	Miligramos
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>μL</b>	Microlitro
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>NaClO</b>	Hipoclorito de sodio
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>IR</b>	Índice alelopático
<b>IR<sub>G</sub></b>	Índice alelopático con respecto a la germinación
<b>IR<sub>B</sub></b>	Índice alelopático con respecto a longitud de brote
<b>IR<sub>SE</sub></b>	Índice alelopático sintético
<b>EC<sub>g50</sub></b>	Concentración efectiva que provoca una disminución del 50% en la germinación
<b>EC<sub>g90</sub></b>	Concentración efectiva que provoca una disminución del 90% en la germinación
<b>EC<sub>b50</sub></b>	Concentración efectiva que causa una disminución del 50% en la longitud brote
<b>EC<sub>b90</sub></b>	Concentración efectiva que causa una disminución del 90% en la longitud brote
<b>Rf</b>	Factor de retardo
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina



## Resumen

A nivel mundial, las malezas causan pérdidas de millones de dólares en el sector agrícola. En el Ecuador, *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L. afectan a cultivos de interés como banano, cacao y maíz. El presente estudio tiene como objetivo evaluar *in vitro* el efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. sobre la germinación de *C. murale* y *C. dactylon*. El aceite esencial se extrajo mediante la técnica de arrastre de vapor y se identificó los principios activos mediante cromatografía en capa fina. Se obtuvo 0.33% en el rendimiento de la extracción y se encontró que eugenol, anetol, timol y carvona forman parte de los constituyentes del aceite esencial de *T. minuta*. Se realizaron ensayos de germinación con concentraciones de 0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL de disolución de aceite esencial y se evaluó la germinación y la longitud de brote. Se determinó que a las concentraciones de 0.4 y 4 mg/mL de disolución de aceite esencial se inhibe la germinación y el desarrollo de brotes en las semillas de *C. dactylon*. En cuanto, a las semillas de *C. murale* no se pudo determinar el efecto alelopático del aceite esencial debido a que su germinación se vio afectada por las condiciones de asepsia aplicadas. Los resultados sugieren que el aceite esencial de *T. minuta* tiene un alto porcentaje de efecto alelopático sobre *C. dactylon* lo que permitiría utilizarlo como un bioherbicida.

### Palabras clave:

- EFECTO ALELOPÁTICO
- GERMINACIÓN
- MALEZAS
- ACEITE ESENCIAL

## Abstract

Globally, weeds cause millions of dollars in losses in the agricultural sector. In Ecuador, *Chenopodium murale* L. and *Cynodon dactylon* L. affect crops of interest such as banana, cocoa and corn. The present study aims to evaluate *in vitro* the allelopathic effect of the essential oil of *Tagetes minuta* L. on the germination of *C. murale* and *C. dactylon* seeds. The essential oil was extracted by steam entrainment technique and its active principles were identified by thin-layer chromatography. The extraction yield was 0.33% and it was found that eugenol, anethole, thymol and carvone are part of the constituents of the essential oil of *T. minuta*. Germination tests were carried out with concentrations of 0.004, 0.04, 0.4 and 4 mg/mL of essential oil solution, and germination and shoot length were evaluated. It was determined that at concentrations of 0.4 and 4 mg/mL of essential oil solution, germination and development of shoots are inhibited in *C. dactylon* seeds. On the other hand, the allelopathic effect of the essential oil on *C. murale* seeds could not be determined because their germination was affected by the aseptic conditions applied. The results suggest that essential oil has a high percentage of allelopathic effect on *C. dactylon*, therefore it could be used as a bioherbicide.

### Keywords:

- ALLELOPATHIC EFFECT
- GERMINATION
- WEEDS
- ESSENTIAL OIL

## Capítulo 1: Introducción

### Formulación del Problema

Los cultivos y los productos agrícolas se ven afectados principalmente por patógenos, animales y malezas (Castaño, 2015). Sin embargo, las malezas son las que ocasionan las mayores pérdidas, debido a que compiten con los cultivos por luz, agua, nutrientes y espacio, llegando incluso a alterar la morfología de las plantas (Price, 2015; Aguirre *et al.*, 2019; Schonbeck, 2020). Adicionalmente, las malezas pueden hospedar fitopatógenos, reduciendo la circulación del aire promoviendo el desarrollo de enfermedades, retrasando la época de cosecha, parasitando a las plantas de interés agrícola e inhibiendo su crecimiento, en su defensa las plantas diseñan una alternativa como liberar metabolitos secundarios para defenderse y desarrollarse en este ambiente competidor (Abouziena & Haggag, 2016; Schonbeck, 2020).

A nivel mundial, las malezas disminuyen el rendimiento de los principales cultivos en aproximadamente un 34% y en el caso de que se presente estrés hídrico, reducen más del 50% (Jabran *et al.*, 2015; Abouziena & Haggag, 2016). Las malezas causan por año una pérdida de 40 mil millones de dólares (Abouziena & Haggag, 2016). Solo en la India, han generado un daño de aproximadamente 11 mil millones de dólares y han afectado a sus principales cultivos entre ellos el arroz, el trigo y la soja (Gharde *et al.*, 2018).

En el Ecuador, se pierde cerca del 10% del rendimiento de la producción de los cultivos por el mal manejo de las malezas (Toro *et al.*, 2005). Los estudios realizados indican, que una gran variedad de malezas afecta a los cultivos de importancia económica para el país, como *Oryza sativa* (arroz), *Musa x paradisiaca* L. (banano), *Theobroma cacao* (cacao), *Chenopodium quinoa* (quinua) y *Zea mays* (maíz)

(Hernández, 2015; Gómez, 2016; Amaya *et al.*, 2018). Las malezas que predominan en algunos de los principales cultivos de la región Costa son *Cynodon dactylon* y *Chamaesyce hirta* (Amaya *et al.*, 2018).

Otro problema que se debe tomar en cuenta es el uso de herbicidas. En 1932, se introdujo una solución que revolucionó el control de las malezas y fue el uso de herbicidas sintéticos (Labrada *et al.*, 1996). En el 2015, los herbicidas fueron los pesticidas más vendidos (Casida & Bryant, 2017). En el 2018, representaron el 60% de los pesticidas usados en el mundo (Duke & Dayan, 2018). En Ecuador, el 44.04% de las ventas de agroquímicos, corresponden a herbicidas (Pilco, 2014). A pesar del éxito comercial de los herbicidas sintéticos, estos generan otros problemas como los efectos tóxicos contra animales, plantas, la salud humana y el medio ambiente, afectando a plantas no objetivo y provocando resistencia de varias malezas (Boutin *et al.*, 2014; Ben El Hadj *et al.*, 2015; Abouziena & Haggag, 2016). En el año 2016, el INEN registró que el 26.12% y el 21.92% de herbicidas que se emplearon en los cultivos permanentes y transitorios en Ecuador son moderadamente peligrosos.

Frente a los perjuicios que ocasionan los herbicidas tanto para el ambiente como para la salud humana se está buscando alternativas amigables para el medio ambiente. Actualmente, se emplean extractos de plantas, aceites esenciales y algunos microorganismos para el control de malezas (Radhakrishnan *et al.*, 2018). Por ello, el presente estudio plantea encontrar una solución natural con el uso de aceites esenciales de especies vegetales que se desarrollan en el medio de manera natural entre ellas *Tagetes minuta* L. (chincho) para tratar de contrarrestar a las malezas de *Cynodon dactylon* L. (césped) y *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) como plantas modelo.

## Justificación del Problema

Las malezas afectan en gran medida al sector agrícola debido a que disminuyen el rendimiento de los cultivos y ocasionan pérdidas de millones de dólares (Jabran *et al.*, 2015; Abouziena & Haggag, 2016). Para su control se emplea generalmente herbicidas, que son los plaguicidas más usados en el mundo. Sin embargo, poseen efectos tóxicos contra el medio ambiente, las plantas no objetivo y la salud humana. Además, los herbicidas han generado resistencia de algunas malezas. Por lo tanto, una alternativa natural para el control de las malezas es el uso de aceites esenciales, pues su aplicación es segura para el ambiente, además, de permitir un mejor manejo de las aguas residuales generadas por los cultivos agrícolas (Laosinwattana *et al.*, 2018). Los aceites esenciales son sustancias hidrófobas constituidas por compuestos aromáticos volátiles de bajo peso molecular, se extraen de las plantas generalmente por arrastre de vapor y poseen diferentes propiedades biológicas como antimicrobianos, anticancerígenos, antioxidantes y alelopáticos, etc (El-Gawad, 2015).

A nivel vegetal, los aceites esenciales y su actividad alelopática han sido muy estudiados por ser una fuente importante para el manejo selectivo de malezas (El-Gawad *et al.*, 2018), ya que pueden inhibir totalmente o parcialmente la germinación y el desarrollo de las plantas. Además, estas sustancias pueden generar daños en la membrana, el ADN, la mitosis y otros procesos bioquímicos que ocurren dentro de las semillas de las malezas al momento de germinar (Radhakrishnan *et al.*, 2018).

A nivel mundial, se ha estudiado el efecto alelopático del género *Tagetes* y se ha demostrado que el aceite esencial de *T. minuta* y los extractos de *T. erecta* y *T. patula* pueden reducir la germinación de varias malezas de interés agrícola entre ellas

*Chenopodium murale* L. (Santos *et al.*, 2015; Arora *et al.*, 2017). *Cynodon dactylon* L. (césped) y *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) son consideradas malezas que afectan principalmente a *Zea mays* (maíz), un cultivo de alta producción en el país (INEC, 2019). Además, *Cynodon dactylon* L. invade a las plantaciones de *Musa x paradisiaca* L. (banano), *Theobroma cacao* (cacao) y *Citrus x sinensis* (naranja), principales cultivos de la Costa ecuatoriana (Amaya *et al.*, 2018).

Es importante conocer que *T. minuta* crece en muchas partes del Ecuador y se la considera una planta nativa, pero los estudios de fitotoxicidad de sus componentes se han realizado en otros países como en la India. Por tanto, este estudio pretende evaluar el efecto alelopático del aceite esencial de *T. minuta* en el Ecuador frente a *Cynodon dactylon* L. (césped) y *Chenopodium murale* L. (cenizo negro).

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Evaluar *in vitro* el efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) sobre la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) a nivel de laboratorio.

### **Objetivos Específicos**

- Extraer el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) a través de arrastre de vapor.
- Determinar los principios activos del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) por cromatografía en capa fina.
- Evaluar el porcentaje del efecto alelopático en la germinación de plantas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) en

presencia del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) a cuatro concentraciones diferentes.

## Marco Teórico

### ***Especies del género Tagetes en Ecuador y su utilidad***

En Ecuador se han reportado ocho especies de género *Tagetes*: *T. minuta*, *T. filifolia*, *T. verticillata*, *T. multiflora*, *T. terniflora*, *T. zypaquirensis*, *T. dianthiflora* y *T. erecta* (Tropicos, 2009). Las siete primeras son consideradas como nativas mientras que la última como introducida (Tropicos, 2009). Las especies de género *Tagetes* poseen la clasificación científica de clase, orden, familia y género como se indica en la tabla 1.

**Tabla 1**

#### *Clasificación taxonómica del género Tagetes*

<b>Nivel taxonómico</b>	
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Tagetes</i> L.

*Nota.* Recuperado del Sistema Integrado de Información Taxonómica ITIS, 2009.

#### **Ubicación geográfica.**

El género *Tagetes* se localiza generalmente en Sudamérica (Pichette, 2002; Strother, 2006; Hanan & Mondragón, 2009; Baldeón, 2011; Singh *et al.*, 2020). Sin embargo, las especies *Tagetes verticillata* y *Tagetes zypaquirensis* solo se han reportado en Colombia y Ecuador (Fernández & Chacón, 2012). Adicionalmente, *T. dianthiflora* Kunth se ha encontrado únicamente en Perú y Ecuador (Dario *et al.*, 2017).

Tropicos (2009) ha reportado la localización de las diferentes especies del género *Tagetes* en Ecuador. Las especies de *Tagetes filifolia* Lag., *Tagetes multiflora* Kunth, *Tagetes terniflora* Kunth y *Tagetes zypaquirensis* se encuentran en las provincias de Pichincha y Cañar. En Loja, Pichincha y Cotopaxi se ubica a *Tagetes minuta* L. y en Azuay, Imbabura y Tungurahua se localiza a *T. verticillata*. *T. erecta* L. se encuentra en Galápagos, Esmeraldas, Los Ríos, Pichincha, Loja y Napo, y *T. dianthiflora* solo se la puede localizar en Loja (Tropicos, 2009).

#### **Utilidad del género *Tagetes*.**

Las especies de *Tagetes minuta* L., *T. verticillata*, *T. terniflora* Kunth, *T. zypaquirensis* y *T. erecta* L. poseen propiedades nematocidas e insecticidas (Serrato *et al.*, 2007; Shahzadi *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2015; Yumi, 2018). *T. multiflora* Kunth posee actividad nematocida, antiséptica y antiinflamatoria (German, 2019). *T. filifolia* Lag., *T. minuta* y *T. erecta* poseen propiedades antimicrobianas (Shahzadi *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2015). *T. erecta* posee actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora, antiepiléptica, antidiabética, antidepresiva y antifúngica (Singh *et al.*, 2020). Se ha reportado que *T. minuta* y *T. erecta* pueden inhibir la germinación de malezas (Arora *et al.*, 2015; Laosinwattana *et al.*, 2018).

En la sierra ecuatoriana se usan como condimento las especies de *T. minuta*, *T. filifolia* Lag., *T. multiflora* Kunth, *T. terniflora* Kunth y *T. erecta* (Strother, 2006; De la Torre *et al.*, 2008; Mondragón & Vibrans, 2009). *T. filifolia* Lag. y *T. multiflora* Kunth ayudan a aliviar los dolores estomacales (Rea, 2012; Zolla, 2019). La última especie, además de poseer propiedades antiinflamatorias y antisépticas, se emplea para calmar catarros, bronquitis, las molestias de la vesícula y el mal de orina (German, 2019; Zolla,



2019). *T. verticillata* posee actividad antiinflamatoria, antioxidante y se la utiliza contra el dolor de cabeza y las neuralgias (Hincapié *et al.*, 2011; Fonnegra *et al.*, 2016).

### ***Tagetes minuta* L. (chincho)**

#### **Descripción Botánica.**

Es una planta herbácea (Fig. 1), anual, aromática, con una altura de 0.5 a 1.8 m y tallos erectos (Troiani & Steibel, 2008). Sus hojas son compuestas con número de folíolos de nueve a 17, cada uno de ellos son lanceolados, con borde aserrado, con longitud de 1.2 a 5 cm y ancho de 0.2 a 0.9 mm (Rojas, 2011). Posee cabezuelas pequeñas con flores liguladas y de color amarillo (Rojas, 2011).

#### **Figura 1**

Fotografía de *Tagetes minuta*



#### **Utilidad.**

Es utilizada para la dermatitis, la conjuntivitis, las varices, las hemorroides y las irregularidades menstruales (Baldeón, 2011). La infusión sirve para calmar dolores gástricos mientras que su decocción de hojas y flores ayuda a calmar la bronquitis y los catarros (Uvidia, 2012). Su aceite esencial posee propiedades antiinflamatorias,

antisépticas, broncodilatadoras, hipotensoras, espasmolíticas, tranquilizantes, bactericidas y sedativas (Gutierrez *et al.*, 1972; Karimian *et al.*, 2014). Se lo usa en la industria de la farmacéutica, la perfumería, la agronomía y la alimentación (Gakuubi *et al.*, 2016) como condimento, en la elaboración de té, bebidas y postres (Strother, 2006). Adicionalmente presenta propiedades antimicrobianas, antifúngicas, insecticidas, nematocidas, acaricidas y plaguicidas de ganado y plantas (Shahzadi *et al.*, 2010). También es usada para combatir malezas (Arora *et al.*, 2015).

### **Composición.**

El aceite esencial de *T. minuta* está compuesto por anetol, carvona, eugenol, timol, cariofileno, 4-etil-4-metil-1-hexeno,  $\beta$ -ocimeno, linalool, limoneno,  $\beta$ -mirceno, trans-ocimeno, cis-ocimenona, trans-ocimenona, dihidrotagetona, cis-tagetona, trans-tagetona, cis-tagetenona, trans-tagetenona y verbenona (Tisserand & Young, 2014; Zapata *et al.*, 2015; Gakuubi *et al.*, 2016; Pelin, 2020).

### ***Especies de malezas Chenopodium murale y Cynodon dactylon y su efecto en los cultivos agrícolas***

#### **Malezas.**

Son plantas indeseables que ejercen un obstáculo en las actividades humanas en lugares que son o no utilizados para la agricultura (Labrada *et al.*, 1996; Schonbeck, 2020). Afectan el crecimiento de los cultivos al competir por luz, agua, nutrientes y espacio (Schonbeck, 2020), llegando incluso a alterar la morfología de las plantas (Price, 2015). Adicionalmente, las malezas pueden hospedar fitopatógenos, disminuir la circulación del aire promoviendo el desarrollo de enfermedades, parasitar a las plantas

de interés agrícola e inhibir su crecimiento al liberar metabolitos secundarios (Schonbeck, 2020).

***Chenopodium murale* L. (cenizo negro).**

**Generalidades.**

*Chenopodium murale* L. es una maleza que se reproduce fácilmente y puede permanecer durante un largo tiempo en el banco de semillas del suelo (Ahsan *et al.*, 2019). Es nativa de Europa y en Ecuador, se la encuentra principalmente en las provincias de Loja, Pichincha e Imbabura (Mondragón & Vibrans, 2009). Su clasificación científica se indica en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Clasificación taxonómica de Chenopodium murale*

<b>Nivel taxonómico</b>	
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae
Género	<i>Chenopodium</i> L.
Especie	<i>Chenopodium murale</i> L.

*Nota.* Recuperado del Sistema Integrado de Información Taxonómica ITIS, 2020.

*C. murale* absorbe los nutrientes del suelo eficientemente y puede generar pérdidas mayores al 90% en el rendimiento de los cultivos (Ahsan *et al.*, 2019). Se adapta fácilmente a diversas condiciones climáticas por lo que puede afectar a las plantaciones de brócoli, fresa, granadilla, haba, maíz, papa, tomate de árbol y tomate de riñón (Aguirre *et al.*, 2019). Se la puede eliminar por deshieras o aplicando herbicidas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, piclora y glifosato (Vibrans, 2009; Portal Tecnoagricola, 2019).

**Descripción botánica.**

*Chenopodium murale* L. es una planta anual (Fig. 2) que alcanza 60 cm de longitud y posee un tallo erguido (INRA, 2000). Sus hojas son simples con borde irregularmente dentado y forma ovalada o triangular (INRA, 2000). En la parte inferior son opuestas mientras que las siguientes son alternas. Sus inflorescencias son compuestas en forma de panículas pequeñas y sus flores poseen cinco pétalos (Rzedowski & Rzedowski, 2001). Sus semillas son de color negro y de 1 a 1,2 mm de diámetro (INRA, 2000).

**Figura 2**

Fotografía de *Chenopodium murale*



*Nota:* Tomado de “*Chenopodium murale* L.” por Herbario JBB en línea – Jardín Botánico Jose Celestino Mutis, 2020 (<http://herbario.jbb.gov.co/especimen/simple>). CC-BY-SA.

### ***Cynodon dactylon* L. (césped).**

#### **Generalidades.**

*Cynodon dactylon* L. es una maleza que produce gran cantidad de semillas y se reproduce por medio de ellas (FAO, 2020). Se propaga rápidamente por medio de estolones y rizomas (Carey, 2018). Su origen es dudoso, se introdujo en Ecuador y se localiza en todas las regiones del país (Aguirre *et al.*, 2019; Canals *et al.*, 2019). Su clasificación científica se indica en la tabla 3.

**Tabla 3**

#### *Clasificación taxonómica de Cynodon dactylon*

<b>Nivel taxonómico</b>	
Clase	Magnoliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	<i>Cynodon</i>
Especie	<i>Cynodon dactylon</i> L.

*Nota.* Recuperado del Sistema Integrado de Información Taxonómica ITIS, 2020.

Es capaz de eliminar a los cultivos que se encuentran a su alrededor, por eso se la considera agresiva y afecta a las plantaciones de *Oryza sativa* (arroz), *Musa x paradisiaca* L. (banano), *Theobroma cacao* (cacao), *Mangifera indica* (mango) y *Zea mays* (maíz) (Amaya *et al.*, 2018; Aguirre *et al.*, 2019). Se la puede eliminar mediante excavación manual, arado profundo o empleando herbicidas como glifosato, la combinación de glifosato con propaquizafop o bromacil (Patil *et al.*, 2017; Portal Tecnoagricola, 2019).

### **Descripción botánica.**

*Cynodon dactylon* L. (Fig. 3) es una planta que se comporta como perenne o anual en dependencia de la época en que se encuentre. Posee generalmente una longitud de 30 cm (Rzedowski & Rzedowski, 2001). Su tallo es erecto, glabro y tiene estolones (Aguirre *et al.*, 2019). Sus vainas foliares poseen lígulas y el largo de sus láminas oscila entre 0.5 y 6.5 cm (Rzedowski & Rzedowski, 2001). Su inflorescencia es sésil en forma de espigas con espiguillas que tienen una flor de color verde violáceo (Canals *et al.*, 2019). Su sistema radicular puede alcanzar 2 m de profundidad (Aguirre *et al.*, 2019).

### **Figura 3**

Fotografía de *Cynodon dactylon*



*Nota.* Tomado de *Arvenses asociadas a cultivos y pastizales del Ecuador* (p.164), por Aguirre, Jaramillo & Quizhpe, 2019, Universidad Nacional de Loja.

### **Efecto alelopático de las plantas**

La alelopatía es un fenómeno en el que una planta o microorganismo libera compuestos bioquímicos a su entorno y estos poseen actividad estimuladora o inhibitoria contra otros organismos en especial plantas vecinas (Thiébaud *et al.*, 2019). Según su significado etimológico proviene de dos voces latinas: Allelon= unos a otros y

patía=recíproco; es decir, que es ser recíproco para unos o para otros (Tello, 2014). La alelopatía se define también como la influencia directa de metabolitos secundarios generados y liberados por una planta para actuar sobre la germinación, el desarrollo y crecimiento de otra planta (Labrada, 2004) ya que ella genera un estímulo antagónico externo que probablemente daña la estructura vegetal de la segunda y a estos compuestos se los denomina como fitoalexinas o aleloquímicos (Tello, 2014).

Los aleloquímicos se generan por la combinación del estrés biótico y abiótico. Pueden llegar al ambiente mediante varias vías de acuerdo a su peso molecular, si el compuesto químico o metabolito secundario es de bajo peso molecular se recurre a la volatilización, si es mediano y posee grupos hidroxilos (OH) o grupos que le den polaridad a la lixiviación o exudación y si es de alto peso molecular se puede biodegradar (Yaisys, 2006; FAO, 2004). Su actividad depende de la sensibilidad de la especie receptora, la forma de liberación y la actividad e interacción que ocurre en el suelo entre el metabolito secundario y las especies vegetales circundantes (Blum *et al.*, 1993).

Algunos aleloquímicos ejercen diversos efectos como afectar negativamente el proceso de la fotosíntesis debido a que producen una reducción en el contenido de clorofila y con ello se bloquea la transferencia de electrones, se inhibe o reduce la síntesis de ATP y se altera la transpiración estomática (Yu *et al.*, 2006). Otros poseen la capacidad de modificar tanto la síntesis como en la actividad de las enzimas ya sea para incrementarla o disminuirla (Yaisys, 2006). En ocasiones afectan la forma y la estructura de las células pues provocan anomalías nucleares, alteran la polaridad de la membrana, incrementan el número de vacuolas y alargan o acortan las células de las raíces (Pawlowski *et al.*, 2012). Pueden sustituir a los herbicidas sintéticos ya que

pueden inhibir la germinación de malezas y permitir el desarrollo de cultivos con bajas cantidades de residuos tóxicos en el agua y en suelo (Zeng *et al.*, 2008).

### **Metabolitos secundarios**

Son compuestos químicos producidos por el metabolismo secundario de las plantas, se caracterizan por tener distribución restringida, funciones específicas, alta actividad biológica y estructura relativamente compleja y única (Lock, 1988). En las plantas no cumplen funciones vitales, pero se les atribuye protección frente al estrés abiótico y biótico (Cowan, 1999). Algunos metabolitos secundarios son usados en la industria farmacéutica como drogas, en el sector agrícola como plaguicidas y pesticidas, en la industria alimenticia como saborizantes y colorantes entre otros (Pagare *et al.*, 2015).

#### **Terpenos.**

Son un grupo de hidrocarburos naturales que tienen como unidad fundamental al isopreno y su estructura se forma por la adición de estas unidades. Se clasifican de acuerdo a la cantidad de unidades de isopreno que poseen. Los monoterpenos tienen dos, sesquiterpenos tres, diterpenos cuatro, sesterpenos cinco, triterpenos seis y tetraterpenos ocho. Son sintetizados por la vía del ácido mevalónico. Poseen diversas características químicas y propiedades biológicas.

#### **Compuestos fenólicos.**

Son metabolitos secundarios o principios activos que poseen un anillo aromático con por lo menos un hidroxilo libre o sustituido. Se sintetizan por la ruta del ácido shiquímico y la ruta de poliacetatos (Claramunt *et al.*, 2013). Se clasifican en: fenilpropanoides, ácidos fenólicos, ligninas, cumarinas, flavonoides, taninos entre otros.



Los compuestos fenólicos poseen propiedades alelopáticas ya que inhiben la elongación de las raíces, la división celular, la absorción de los nutrientes, la fotosíntesis, el crecimiento y el desarrollo normal de las plantas vecinas (John & Sarada, 2012).

#### ***Fenilpropanoides.***

Son compuestos derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. Se caracterizan por tener un anillo de 6 carbonos y una cadena de 3 carbonos que generalmente se encuentra oxidada (Claramunt *et al.*, 2013). Poseen propiedades insecticidas, antioxidantes y farmacológicas (Nanda *et al.*, 2016). En la industria alimentaria, se los puede utilizar como colorantes o complementos alimenticios (Nanda *et al.*, 2016).

#### ***Ácidos fenólicos.***

Son metabolitos secundarios derivados de los ácidos benzoico y cinámico (Ratnavathi, 2018). Se encuentran en abundancia en hierbas, semillas oleaginosas, frutas, cereales, legumbres y verduras (Chandrasekara, 2019). Poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimutagénicas, anticancerígenas y alelopáticas (Goleniowski *et al.*, 2013; Amb & Ahluwalia, 2016). Algunos ácidos fenólicos presentes en ciertas variedades del arroz pueden afectar el desarrollo de las principales malezas que reducen el rendimiento de este cultivo (Amb & Ahluwalia, 2016).

#### ***Ligninas.***

Son polímeros naturales de alto peso molecular, que se forman por unidades de fenilpropanoides (Lu & Ralph, 2010). Se entrelazan con la celulosa y mediante sus grupos hidroxilos libres ayudan al transporte de nutrientes. Poseen propiedades

antioxidantes y antibacterianas (Sahoo *et al.*, 2011). Se los emplea para la elaboración de adhesivos, fertilizantes, tintes, materiales médicos, baterías y materiales de impresión 3D (Yu & Ho, 2020).

### ***Cumarinas.***

Son principios activos que tienen como núcleo a la benzo- $\alpha$ -pirona (IUPAC, 1979). Se localizan en alta concentración en flores y frutos (Claramunt *et al.*, 2013). Poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antibacterial, antifúngica, antiviral, neuroprotectora, antidiabética y alelopática (Annunziata *et al.*, 2020). Algunas cumarinas pueden ser parte de un potencial herbicida porque inhiben el crecimiento de malezas como la avena silvestre que afecta el crecimiento del trigo (Niro *et al.*, 2016).

### ***Flavonoides.***

Son compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Las plantas los usan para su crecimiento y defensa contra las plagas. Tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas. Los flavonoides son un grupo interesante debido a su amplia distribución en todas las partes de las plantas y se puede destacar su actividad antifúngica como alternativa para el control químico (Ilboudo *et al.*, 2016).

### ***Taninos.***

Son metabolitos polifenólicos que se caracterizan por su propiedad antioxidante y su capacidad de unirse a saponinas, esteroides, alcaloides, polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas. Los taninos son cruciales para las interacciones planta-insecto y para proteger la planta huésped de la herbivoría (Chen *et al.*, 2018). Se emplean en el

curtido del cuero y la elaboración de adhesivos para la madera, bebidas y alimentos para animales (Shirmohammadli *et al.*, 2018).

### **Alcaloides.**

Los alcaloides contienen nitrógeno derivado de aminoácidos con bajo peso molecular. Se clasifican según el criterio químico en varias clases como pirrolizidinas, pirrolidinas, quinolizidinas, índoles, tropanos, piperidinas, purinas, imidazoles e isoquinolinas (Thawabteh *et al.*, 2019). La cafeína es un alcaloide que está presente en el té vietnamita y tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del hipocótilo y la radícula de plántulas de *Lactuca sativa* (lechuga) (Thanh *et al.*, 2019).

### **Aceites esenciales**

Según la Asociación francesa de Normalización (2000) los aceites esenciales son mezclas de sustancias obtenidas a partir de materia prima vegetal. Son volátiles, líquidos a temperatura ambiente, insolubles en agua y solubles en aceites fijos, éter y alcohol (Dhifi *et al.*, 2016). Se los obtiene de plantas aromáticas especialmente de las partes que emiten un fuerte olor y en dependencia del tipo de aceite que se desee extraer se lo puede encontrar en frutos, flores, hojas o raíces. Los aceites esenciales están compuestos principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos, las moléculas que lo constituyen pueden tener diversos grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, fenoles entre otros (Noriega, 2020). Adicionalmente, pueden poseer en su composición compuestos aromáticos y derivados sulfurados (Fongang & Bankeu, 2020). Se los extrae por diversos métodos como arrastre de vapor, destilación seca, procesos mecánicos del epicarpio de cítricos entre otros.

La técnica de extracción más empleada es el arrastre de vapor y permite obtener muestras a escala de laboratorio (UPV, 2011). Este método se fundamenta en el empleo del vapor de agua que rompe las células de la planta y arrastra el aceite esencial contenido en ellas (Casado, 2018). Seguidamente, los vapores pasan al equipo Dean Stark y a través del refrigerante son condensados, volviendo nuevamente al estado líquido (Angurell *et al.*, 2014). Para ser colectados en la trampa Dean Stark formando dos fases inmiscibles que están compuestas por el hidrodestilado (agua floral) y el aceite esencial.

### ***Métodos de identificación de metabolitos secundarios***

#### **Cromatografía en capa fina.**

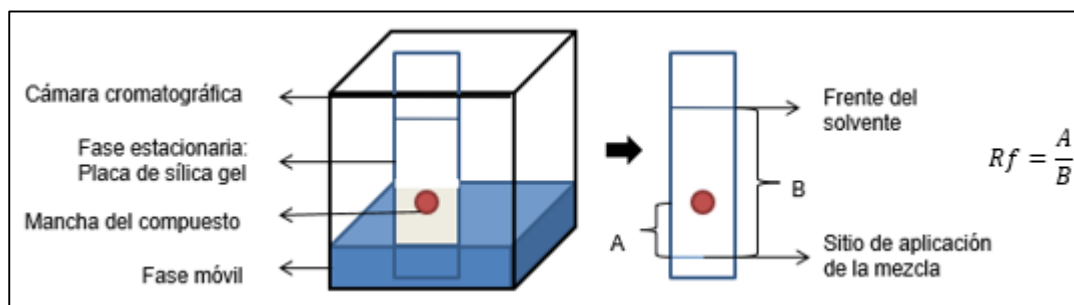
Es una técnica analítica reproducible que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la diferente afinidad que presentan los principios activos por la fase estacionaria y móvil (Llorens, 2013). La primera fase está generalmente formada por sílica gel y la segunda por dos o más solventes de variada polaridad que se encargan de arrastrar y separar la mezcla gracias al efecto de capilaridad y en función de la polaridad de los componentes de la cromatografía (UNAM, 2007).

Dependiendo de la polaridad de los compuestos químicos, van a quedar adsorbidos mediante enlaces químicos a la sílica a diferentes distancias. Debido a que la fase estacionaria al ser polar, y los compuestos químicos que forman el aceite esencial dependiendo de su solubilidad serán retenidos a diferente distancia, los constituyentes que hayan recorrido menor distancia corresponderán a los compuestos químicos menos polares, mientras que los constituyentes con polaridad similar a la fase

móvil migrarán mayor distancia. Los aceites esenciales no son visibles a simple vista, por lo que se pueden emplear sustancias reveladoras como anisaldehído, yodo, vainilla sulfúrica entre otros (Cisneros, 2006). Después de la separación es importante detectarlos para determinar los factores de retardo ( $R_f$ ) de cada constituyente separado. El valor de  $R_f$  corresponde a la relación entre la distancia desde el sitio de la aplicación de la muestra hasta el centro de la mancha del compuesto (A) y la distancia recorrida por el frente del solvente (B) como se muestra en la Fig. 4 (Srivastava, 2010).

**Figura 4**

*Esquema de una cromatografía en capa fina*



*Nota.* El gráfico representa el esquema de una cromatografía en capa fina.

### **Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).**

Es una técnica donde la fase móvil es un gas y la fase estacionaria está contenida en una columna. Entre los gases más utilizados se encuentran el helio, el nitrógeno y el hidrógeno (UNAM, 2020). El procedimiento consiste en pasar el gas elegido con una mezcla por una columna que contiene sílice fundido, que se considera la fase estacionaria. Este sistema se mantiene a una temperatura adecuada para que se permita la separación de los componentes de la muestra mediante sus diferentes presiones de vapor y afinidad por la fase estacionaria (UNAM, 2020). Posteriormente, pasa hacia un detector que, para el caso del espectrómetro de masas, debe haber una

fuelle de ionización que se encarga de ionizar los componentes de la muestra que han sido previamente separados por el cromatógrafo de gases. Luego, por medio de un analizador, los iones se separan según sus diferentes relaciones de masa - carga (Thermo Fisher, 2020) y se obtiene los espectros de masa de los compuestos de la mezcla (UPC, 2012).

## Capítulo 2: Materiales y Métodos

### Participantes

El trabajo de titulación fue realizado por Andrea Pumisacho, egresada de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la tutoría de la Dra. Karina Proaño, Ph. D. y la cotutoría de la Dra. Blanca Naranjo.

### Localización

El estudio se realizó en dos fases, la primera consistió en la recolección del material vegetal y se la ejecutó en las parroquias de Zámiza y Nayón, cantón Quito. La fase de laboratorio se la hizo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, ubicado en la Avenida General Rumiñahui y Ambato, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui.

### Duración del Trabajo de Titulación

El presente estudio se realizó en 4 meses y 3 días. Se comenzó en el mes de octubre del 2021 y se terminó en marzo del 2021.

### Diseño experimental

En el presente estudio se empleó un diseño factorial mixto 4\*2 donde los niveles y factores que se emplearon se indican en la tabla 4. Los factores controlables son la concentración de la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* expresados en mg/mL y el tipo de semillas.

**Tabla 4***Niveles y factores del diseño experimental*

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>
Concentración de la disolución de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> L. (mg/mL)	4, 0.4, 0.04, 0.004 mg/mL
Tipo de semillas	<i>Chenopodium murale</i> L. (cenizo negro) y <i>Cynodon dactylon</i> L. (césped)

*Nota.* La tabla indica los niveles que tienen cada uno de los factores del estudio.

Se realizó 8 tratamientos que corresponden a la combinación de los factores con los niveles. Se empleó un control positivo y un control negativo para cada tipo de semillas. En el control positivo y el control negativo se utilizó una solución de glifosato y una disolución de agua destilada, respectivamente. Se ejecutaron 20 repeticiones por cada tratamiento tomando en cuenta que la unidad experimental fue cada una de las semillas de *C. murale* L. y *C. dactylon* L. Las variables de respuesta fueron la germinación y la longitud de los brotes.

**Recolección del material vegetal**

Se recolectaron las plantas de *Tagetes minuta* L. (chincho) y las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) en el mes de octubre, en la provincia de Pichincha, parroquia Zámiza (0°09'02.4"Sur-78°26'24.1"Oeste) y (0°8'18.01"Sur-78°25'10.46"Oeste), respectivamente. Las semillas de *Cynodon dactylon* L. se adquirieron en la provincia de Pichincha, parroquia Nayón (0°09'27.6"Sur-78°26'41.2"Oeste).

Las plantas de *T. minuta* L. se cortaron a 10 cm del suelo y se emplearon tijeras de podar previamente desinfectadas con alcohol como se muestra en la Fig. 5. Se separaron las hojas secas, dañadas y la tierra. Las demás hojas se colocaron en fundas



hasta su traslado al Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Un espécimen se almacenó en una funda de papel para prepararla para su posterior identificación en el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Anexo 1). Las semillas se colocaron en fundas de papel hasta su esterilización.

### **Figura 5**

*Fotografía de la recolección de Tagetes minuta*



### **Extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) a través de arrastre de vapor**

En el laboratorio de Biotecnología Vegetal se cortó finamente con tijeras 1300,23 g de hojas de *Tagetes minuta* L. (chincho) y se colocó en balones de destilación de 2000 mL. Se añadió 1000 mL de agua en cada uno de los balones. En este ensayo se consideró que el agua no supere las tres cuartas partes del balón, de manera que se evite la sobrepresión y se impida la extracción del aceite esencial.

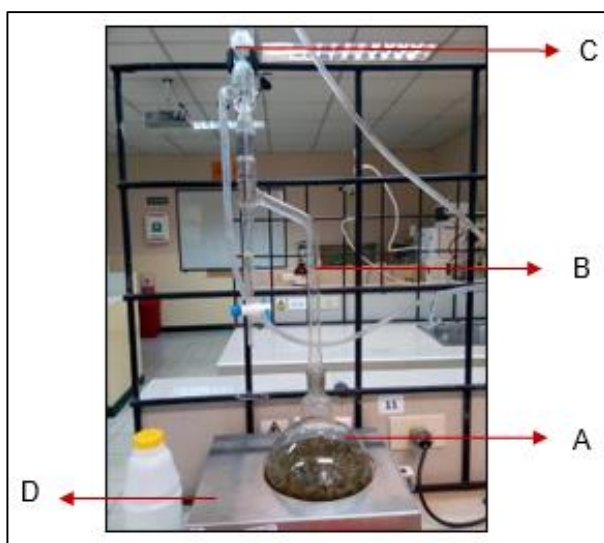
Se ensambló el equipo, un balón, una trampa Dean Stark y un condensador como se muestra en la Fig. 6. Se sometió a calentamiento en una manta hasta alcanzar

la ebullición durante 5 horas. Al finalizar la extracción, se recogió el aceite en un frasco ámbar y se lo almacenó en refrigeración (Naranjo, 2017). Se calculó el rendimiento de la extracción mediante la Ecuación 1 (Naranjo, 2017)

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mL de aceite esencial obtenido}}{\text{g de muestra vegetal}} \times 100\% \quad (1)$$

### Figura 6

Fotografía de la extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta*



*Nota.* La figura indica las diferentes partes del equipo de extracción. A: balón de destilación, B: trampa Dean Stark, C: refrigerante, D: manta de calentamiento.

### Determinación de los principios activos del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) por cromatografía en capa fina

En la cromatografía en capa fina se utilizó como fase estacionaria silica gel G y como fase móvil la solución de tolueno: acetato de etilo (93:7) (Stahl, 2013). Se aplicó la muestra en una placa de silica gel G usando un tubo capilar a 1,5 cm de la base y se la

colocó en una cámara cromatográfica durante aproximadamente 15 minutos o hasta que el solvente haya recorrido hasta 2 cm antes del límite superior de la placa.

Se dejó evaporar el solvente de la placa y se observó bajo la luz ultravioleta de onda corta y larga, se reveló con una solución de anisaldehído-ácido sulfúrico en una cámara de extracción de gases (Wagner & Bladt, 2009). Finalmente, se calculó los factores de retardo (Rf) y se comparó con los datos bibliográficos para determinar los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial en análisis.

### **Ensayo para determinar el efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. en la germinación de *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L.**

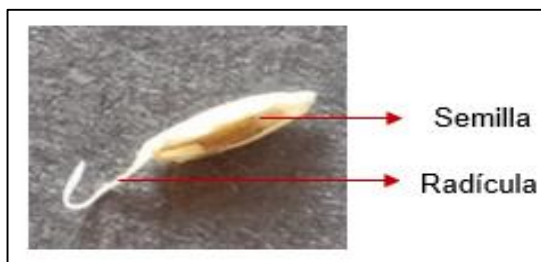
Se evaluó y cuantificó la viabilidad de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) mediante ensayos de germinación, que consistieron en colocar 20 semillas por cada caja Petri estéril sobre una cama de dos láminas de papel filtro y añadir agua destilada. La viabilidad se determinó mediante el porcentaje de germinación que se indica en la Ecuación 2 y se calculó a los 7 y 10 días (Pérez & Pita, 2016).

$$\% \text{ Germinación} = \frac{N_T \times 100}{N} \quad (2)$$

En la fórmula,  $N_T$  representa el número de semillas germinadas y  $N$  el total de semillas presentes en la caja Petri (Araniti *et al.*, 2012). Se consideró la germinación de una semilla cuando se observó la emergencia radicular (Fig. 7) y la longitud de la radícula fue mayor a 3 mm (Moreno *et al.*, 2013).

**Figura 7**

Fotografía de una semilla de *Cynodon dactylon* (césped) germinada



Las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped) se esterilizaron por 5 min en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% (v/v) y se lavaron tres veces con agua estéril para ser utilizadas en el ensayo de alelopatía.

Se preparó una solución madre de 50 $\mu$ L de aceite esencial, DMSO al 0.5% y Tween 20 al 0.5% para obtener una concentración de 4 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho). A partir de la solución madre se prepararon tres diluciones de las siguientes concentraciones: 0.4, 0.04 y 0.004 mg/mL, como se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5**

Concentraciones de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*, DMSO y Tween 20 utilizadas en cada tratamiento.

Tratamiento	Disolución de aceite esencial (mg/ml)	DMSO (%)	Tween 20 (%)
4 y 8	4	0.5	0.5
3 y 7	0.4	0.05	0.05
2 y 6	0.04	0.005	0.005
1 y 5	0.004	0.0005	0.0005

*Nota.* Los tratamientos 1, 2, 3 y 4 corresponden a ensayos con semillas de *Chenopodium murale* y los tratamientos 5, 6, 7 y 8 con semillas de *Cynodon dactylon*.

El ensayo consistió en preparar ocho tratamientos a diferentes concentraciones de 5 mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L., la que se depositó sobre una cama de dos láminas de papel filtro colocadas en las cajas Petri estériles para humedecer las 20 semillas de cada uno de los tratamientos (Araniti *et al.*, 2012). Se realizaron controles negativos con 5 mL de una solución preparada con agua destilada, DMSO y Tween 20 (disolución de agua destilada) y controles positivos con glifosato 1 mg/mL. Se sellaron las cajas Petri con Parafilm y se colocaron en oscuridad a una temperatura entre 16°C y 20°C por 10 días. Se evaluó la germinación de las semillas, se asignó el valor “uno” a la semilla germinada y “cero” a la que no había germinado. Se determinó el porcentaje de germinación. Finalmente, se midió la longitud de los brotes para evaluar la actividad alelopática del aceite esencial en estudio (Lauriano & Lizaraso, 2017).

La medición del efecto alelopático que ejercen las cuatro concentraciones de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) sobre la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped), se

realizó con el índice alelopático (IR). Para calcular el índice alelopático en la germinación y en la longitud del brote se empleó la Ecuación 3 (Williamson & Richardson, 1988) y para encontrar el índice alelopático sintético ( $IR_{SE}$ ) se utilizó la Ecuación 4 (Ma *et al.*, 2020).

$$IR (\%) = \left( \frac{T}{C} - 1 \right) * 100 \quad (3)$$

$$IR_{SE} = \frac{IR_G + IR_B}{2} \quad (4)$$

En la ecuación (3): T corresponde al valor de los tratamientos y C al valor de los controles con la disolución de agua destilada. En la ecuación (4):  $IR_G$  e  $IR_B$  representan el índice alelopático con respecto al porcentaje de germinación y longitud de brote, respectivamente. Los valores de  $IR_{SE}$  mayores a 0 indican que ha ocurrido un efecto estimulante mientras que los inferiores a 0 muestran un efecto inhibitor (Ma *et al.*, 2020).

### **Análisis estadístico**

Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si las diferentes concentraciones de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* aplicadas, afectan significativamente a la germinación y la longitud de brote de las semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon*. Se analizó el valor de  $p$  obtenido en el estudio con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Si el valor de  $p$  es inferior o igual a 0.05, el efecto del factor será estadísticamente significativo (Minitab, 2019). Se analizó la normalidad de los datos empleando la prueba de Shapiro-Wilks modificada y al determinar que los datos no siguen una distribución normal se aplicó un análisis de la varianza no paramétrica empleando la prueba de Kruskal Wallis. Se utilizó los programas R e InfoStat.

Se realizó un análisis Dosis-Respuesta para determinar las concentraciones efectivas que provocan una disminución del 50% en la germinación ( $EC_{g50}$ ) y en la longitud de brote ( $EC_{b50}$ ). Además, se calculó las concentraciones que producen una disminución del 90% en la germinación ( $EC_{g90}$ ) y en la longitud del brote ( $EC_{b90}$ ) (Pannacci *et al.*, 2020). La fórmula que se sugiere en la evaluación de la eficacia de un herbicida sobre malezas consiste en la función log-logistic que emplea tres parámetros y se muestra en la ecuación 5 (Streibig, 1988; Knezevic *et al.*, 2007):

$$f(x(b, d, e)) = \frac{d}{1 + \exp\{b[\ln(x) - \ln(e)]\}} \quad (5)$$

En la ecuación (5),  $e$  es la concentración efectiva en la que se obtiene una respuesta media que en este estudio sería la disminución media en la germinación o la longitud del brote;  $b$  corresponde a la pendiente relativa alrededor de  $e$ ,  $d$  es el límite superior y  $x$  representa la concentración. Para realizar este análisis se empleó el software R versión 1.3.1093 y el paquete “drc” (Ritz & Streibig, 2016).

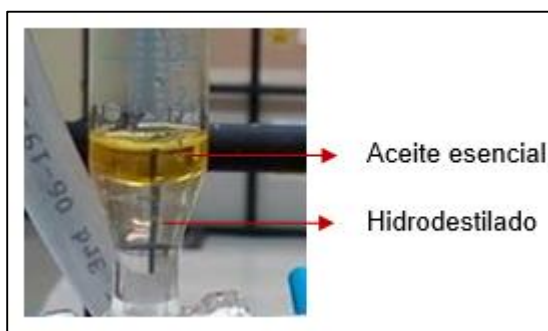
## Capítulo 3: Resultados

### Obtención del aceite esencial de *Tagetes minuta* L.

En la extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. utilizando la técnica de arrastre de vapor, se usó 1300.25 g de material vegetal. El proceso de extracción duró 5 horas. Al finalizar la extracción se obtuvo 4.3 mL de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. dando un rendimiento del 0.33%. La figura 8 indica las dos fases que se obtienen después de aplicar el arrastre de vapor sobre la muestra vegetal, la primera corresponde al aceite esencial y la segunda al hidrodestilado o agua floral de *T. minuta*.

### Figura 8

Fotografía del aceite esencial de *Tagetes minuta* obtenido por arrastre de vapor



*Nota.* La fotografía muestra el aceite esencial y el hidrodestilado de *T. minuta*.

En la tabla 6 se encuentra el registro de las características organolépticas del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. Además, se observó que el aceite esencial es insoluble y de menor densidad que el agua, por lo que no se mezcló con el hidrodestilado (Fig. 6). El hidrodestilado se caracterizó por tener un olor menos concentrado con relación al aceite esencial.



**Tabla 6**

*Características organolépticas del aceite esencial de Tagetes minuta*

<b>Característica Organolépticas</b>	
Olor	Penetrante concentrado aromático
Color	Amarillo
Textura	Oleosa

*Nota.* La tabla muestra las características identificadas en el aceite esencial de *Tagetes minuta*.

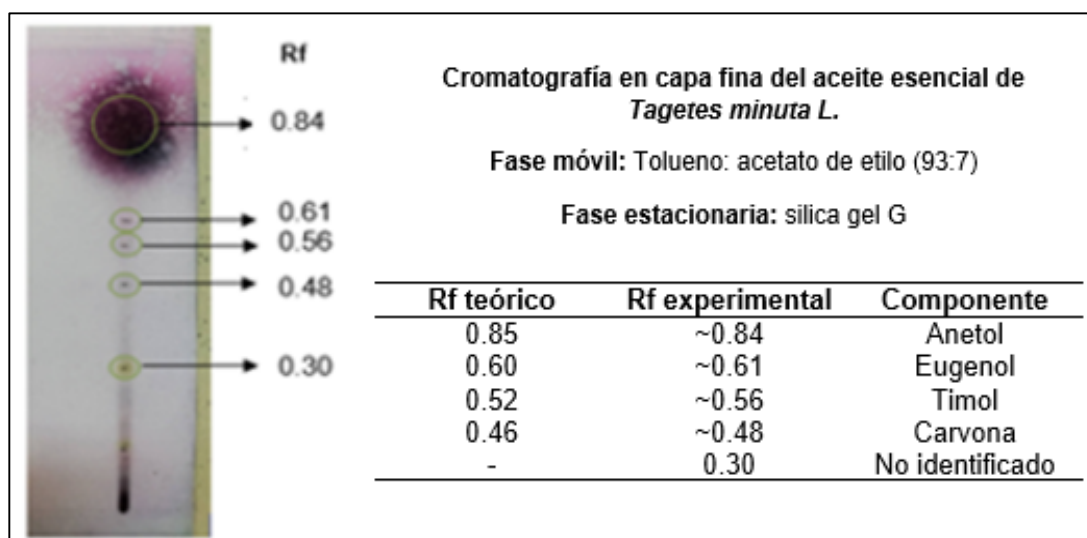
### **Separación del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. por cromatografía en capa fina (CCF)**

El objetivo de la cromatografía en capa fina es identificar los constituyentes que forman una mezcla en este caso el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho). En este análisis, se utilizó como fase estacionaria silica gel G y como fase móvil una mezcla de solventes: tolueno: acetato de etilo (93:7). Se obtuvo después de la separación cinco manchas observadas previo la aspersion de la placa con una solución de anisaldehído-ácido sulfúrico. Los factores de retardo (Rf) obtenidos fueron comparados con datos bibliográficos.

Wagner & Bladt (1996) consideraron que el factor de retardo (Rf) de 0.85 corresponde a anetol valor que se aproxima al Rf experimental de 0.84, el Rf de 0.52 correspondiente a timol se acerca al Rf experimental de 0.56, el Rf de 0.46 pertenece a carvona que se aproxima al Rf experimental de 0.48, como se indica en la figura 9. Según Oliva (2012) el Rf de 0.60 corresponde a eugenol que se acerca al Rf experimental de 0.61. El Rf de 0.30 no se identificó por falta de información bibliográfica.

### Figura 9

Factores de retardo (Rf) obtenidos en la cromatografía en capa fina del aceite esencial de *Tagetes minuta*



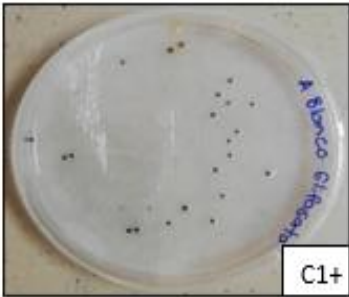

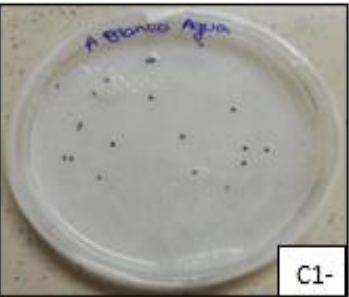
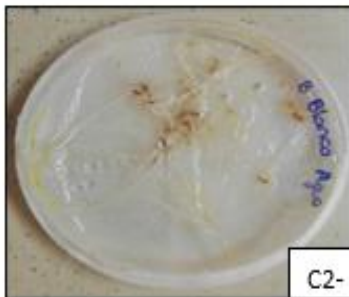

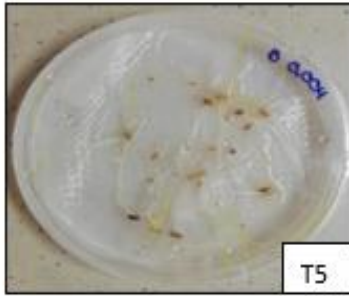
Nota. Rf experimentales del aceite esencial de *Tagetes minuta* y Rf teóricos reportados por Wagner & Bladt, 1996 y Oliva, 2012.

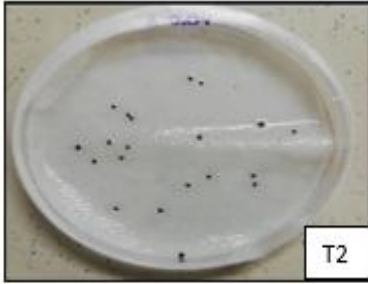

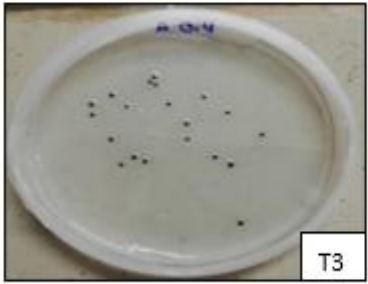


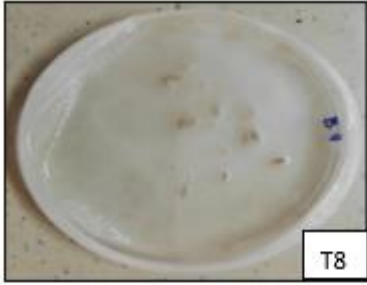
### Evaluación del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. en la germinación de las semillas de *Cynodon dactylon* L. y *Chenopodium murale* L.

El efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho), se determinó evaluando la germinación y la longitud de brote de las semillas de *Chenopodium murale* L. (cenizo negro) y *Cynodon dactylon* L. (césped). En la figura 10 se observa los resultados de la aplicación de los tratamientos con diferentes concentraciones (0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL) de una disolución de aceite esencial de *T. minuta* en las semillas *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L. después de 10 días de cultivo. El análisis del efecto de los diferentes tratamientos mostró que a altas concentraciones se inhibe la germinación en los dos tipos de semillas.

Figura 10

Semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon* frente a diferentes concentraciones de una disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* después de 10 días de cultivo

Concentración (mg/mL)	Tipo de semilla	
	<i>Chenopodium murale</i> L.	<i>Cynodon dactylon</i> L.
Control positivo 1 mg/mL glifosato	 C1+	 C2+
Control negativo disolución de agua destilada	 C1-	 C2-
0.004 mg/mL de disolución de aceite esencial de <i>T. minuta</i>	 T1	 T5

Concentración (mg/mL)	Tipo de semilla	
	<i>Chenopodium murale</i> L.	<i>Cynodon dactylon</i> L.
0.04 mg/mL de disolución de aceite esencial de <i>T. minuta</i>	 T2	 T6
0.4 mg/mL de disolución de aceite esencial de <i>T. minuta</i>	 T3	 T7
4 mg/mL de disolución de aceite esencial de <i>T. minuta</i>	 T4	 T8

*Nota.* Tratamientos y controles. Semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon*: controles positivos (C1+ y C2+: 1mg/mL glifosato); controles negativos (C1- y C2-: Disolución de agua destilada); Tratamientos con una disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* (T1 y T5: 0.004 mg/mL; T2 y T6: 0.04 mg/mL; T3 y T7: 0.4 mg/mL; T4 y T8: 4 mg/mL).

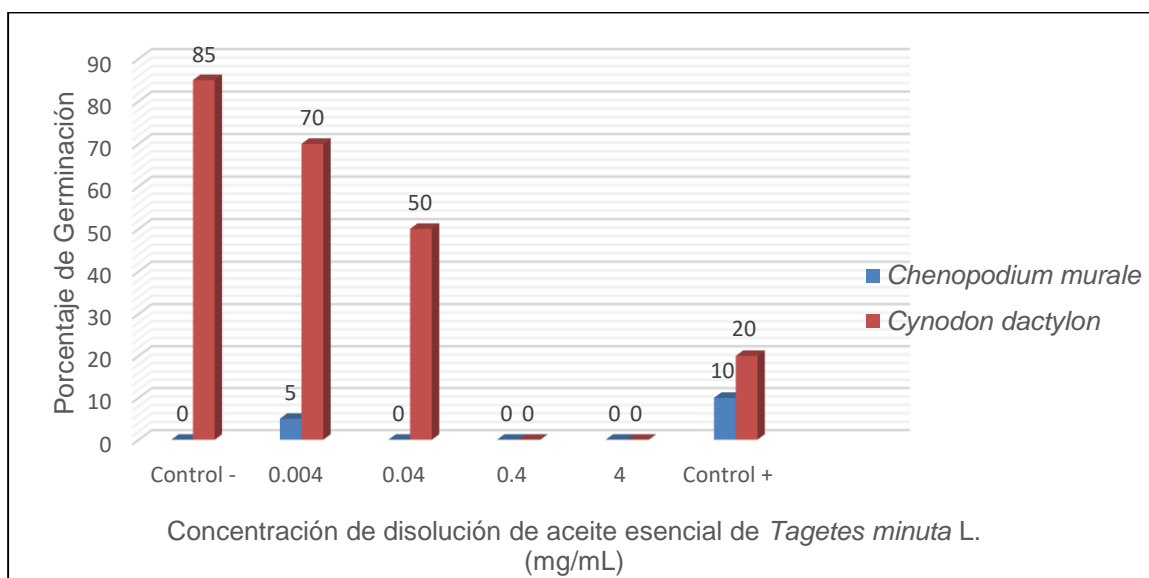
***Análisis de la variable de germinación en las semillas de Chenopodium murale y Cynodon dactylon***

La variable de germinación se evaluó siguiendo un diseño factorial mixto 4\*2. Para determinar el tratamiento que genera el menor porcentaje de germinación, se analizó los factores de concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. y el tipo de semilla. Se empleó como control negativo a una disolución de agua destilada con DMSO y Tween 20 y control positivo a una solución de glifosato.

La figura 11 muestra los porcentajes de germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L. luego de la aplicación de los tratamientos con diferentes concentraciones (0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL) de disolución de aceite esencial. Se obtuvo un 0% de germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L. con los tratamientos de disolución de aceite esencial de *T. minuta* a las concentraciones de 0.4 y 4 mg/mL. Igual resultado se observó al usar una concentración de 0.04 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. en las semillas de *Chenopodium murale* L. Los resultados obtenidos sugieren que las concentraciones analizadas son efectivas en la inhibición de la germinación de las malezas en estudio.

**Figura 11**

Porcentaje de germinación de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon* en relación a la concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*



*Nota.* Tratamientos y controles de germinación. Semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon*: controles negativos (C1- y C2-: Disolución de agua destilada); controles positivos (C1+ y C2+: 1 mg/mL glifosato); Tratamientos con una disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* a las concentraciones de 0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL.

La figura 11 revela que la concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* afecta al porcentaje de germinación de las semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon*. A medida que se incrementa la concentración se reducen los porcentajes de germinación. Los resultados de la aplicación de 0.4 mg/mL de disolución de aceite esencial de *T. minuta* en las semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon*, superan la efectividad del control positivo correspondiente al herbicida glifosato a una concentración de 1 mg/mL.

La tabla 7 indica el análisis de la varianza (ANOVA), donde se observa que los factores: concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* y tipo de semilla, ejercen un efecto estadísticamente significativo en la germinación de las semillas, pues su valor de  $p$  ( $<0,0001$ ) es inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ). Además, existe una interacción significativa entre los factores mencionados debido a que el valor  $p$  ( $< 0,0001$ ) es inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ).

**Tabla 7**

*ANOVA de la variable germinación respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de Tagetes minuta y el tipo de semilla*

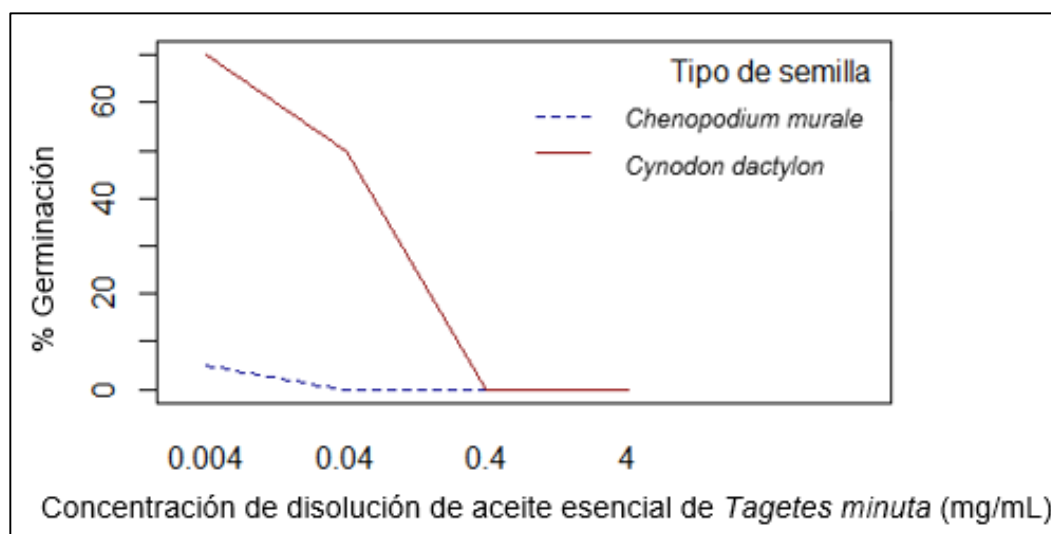
<b>Factores de variación</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	10,94	7	1,56	23,41	<0,0001
Concentración	4,22	3	1,41	21,06	<0,0001
Tipo de semilla	3,31	1	3,31	49,51	<0,0001
Concentración* Tipo de semilla	3,42	3	1,14	17,07	<0,0001
Error	10,15	152	0,07		
Total	21,09	159			

*Nota.* Nivel de significación del análisis  $\alpha=0,05$ .

La figura 12 confirma que existe una interacción estadísticamente significativa entre la concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. y el tipo de semilla. La gráfica no muestra paralelismo, indicando que hay dependencia entre los factores analizados. Por tanto, la relación entre el tipo de semilla y el porcentaje de germinación depende de la concentración de disolución de aceite esencial de *T. minuta* L.

**Figura 12**

Gráfica de interacción del porcentaje de germinación respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* y el tipo de semilla

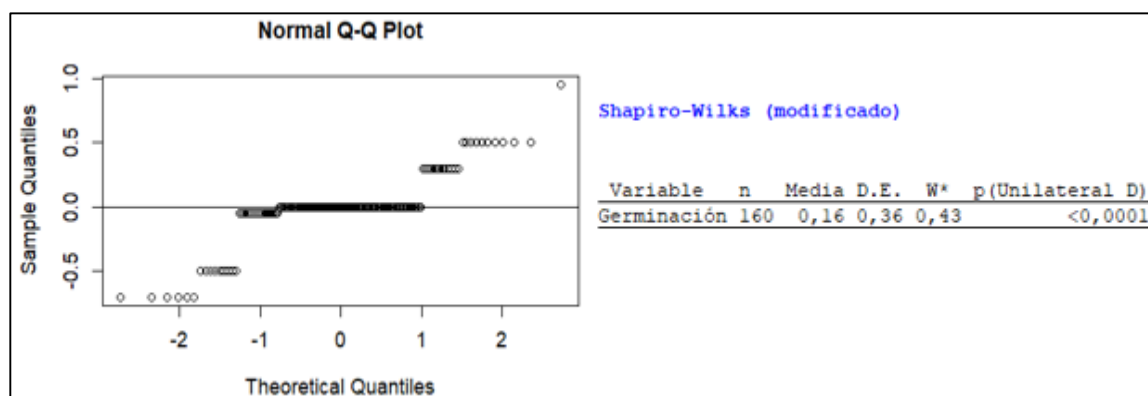


A continuación, se analizó la normalidad de los datos mediante la gráfica de normalidad Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado. La figura 13 muestra que algunos de los residuos de la variable germinación se encuentran dispersos fuera de la línea horizontal de la gráfica Q-Q plot, indicando que los datos no siguen una distribución normal. Para confirmar el resultado gráfico, se realizó la prueba de Shapiro-Wilks modificado y se obtuvo un valor de  $p$  ( $< 0,0001$ ) inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ), por lo que se rechaza la hipótesis nula que plantea que los datos siguen una distribución normal.



**Figura 13**

Gráfica de normalidad Q-Q plot con los residuos de la variable germinación y prueba de Shapiro-Wilks modificado



Debido a que los datos de la variable de germinación de semillas no siguen una distribución normal, se considera a dicha variable como no paramétrica. Por lo que, se aplicó un método de análisis de la varianza no paramétrico, con la prueba de Kruskal Wallis (Fig. 14). Esta prueba permite determinar si hay diferencias entre las medias de la variable germinación. El valor de  $p$  ( $<0,0001$ ) obtenido es inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ), por tanto, se acepta la hipótesis alternativa que establece que existe una diferencia significativa entre los tratamientos de germinación.

Figura 14

Prueba de Kruskal Wallis realizada en los tratamientos de germinación

Variable	Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Tipo de semilla	N	Medias	D.E	Medianas	H	p
Germinación	TG1	0.004	<i>Chenopodium murale</i>	20	0,05	0,22	0,00	32,63	<0,0001
	TG2	0.040			0,00	0,00	0,00		
	TG3	0.400			0,00	0,00	0,00		
	TG4	4.000			0,00	0,00	0,00		
	TG5	0.004	<i>Cynodon dactylon</i>		0,70	0,47	1,00		
	TG6	0.040			0,50	0,51	0,50		
	TG7	0.400			0,00	0,00	0,00		
	TG8	4.000			0,00	0,00	0,00		

Tratamiento	Medias	Rangos
TG4:4.000: <i>Chenopodium murale</i>	0,00	68,00 A
TG7:0.400: <i>Cynodon dactylon</i>	0,00	68,00 A
TG8:4.000: <i>Cynodon dactylon</i>	0,00	68,00 A
TG3:0.4000: <i>Chenopodium murale</i>	0,00	68,00 A
TG2:0.040: <i>Chenopodium murale</i>	0,00	68,00 A
TG1:0.004: <i>Chenopodium murale</i>	0,05	72,00 A
TG6:0.040: <i>Cynodon dactylon</i>	0,50	108,00 B
TG5:0.004: <i>Cynodon dactylon</i>	0,70	124,00 B

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

La figura 14 muestra la prueba de Kruskal Wallis, donde se observa que los tratamientos que tienen la menor desviación estándar (0,00) y menor media (0,00) en el porcentaje de germinación son TG2, TG3, TG4, TG7 y TG8. Estos tratamientos poseen el menor valor de rango (68,00), lo que sugiere que son los mejores tratamientos para inhibir la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon*.

#### **Análisis de la variable longitud de brote en las semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon***

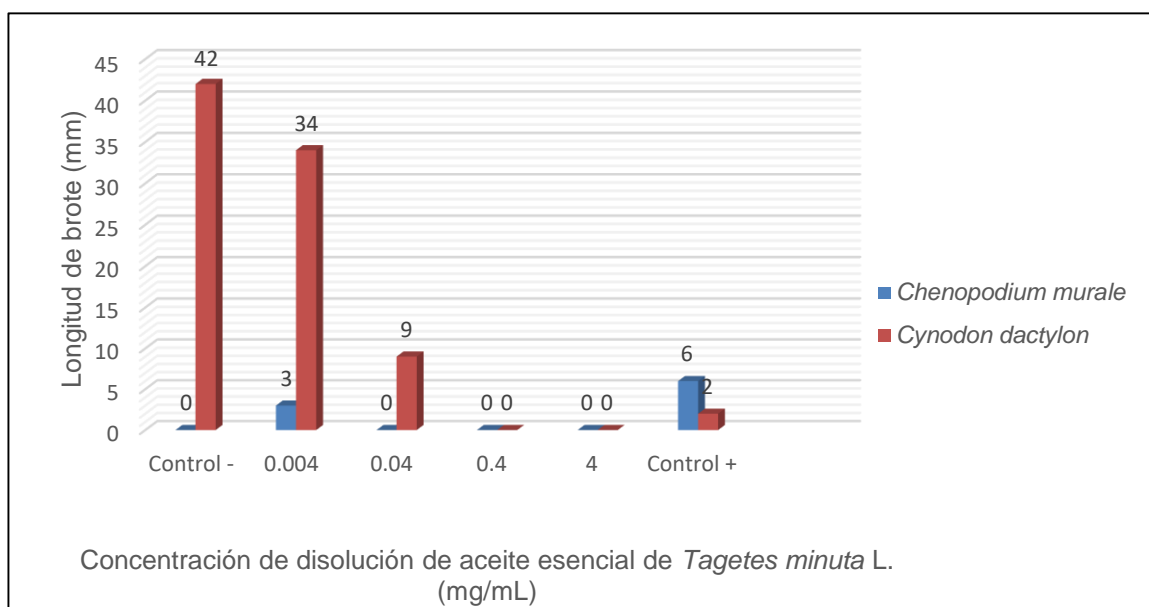
La variable de longitud de brote se evaluó siguiendo un diseño factorial mixto 4\*2. Para determinar el tratamiento que genera la menor longitud de brote, se analizó los factores de concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. y el

tipo de semilla. Se empleó como control negativo a una disolución de agua destilada con DMSO y Tween 20 y control positivo a una solución de glifosato.

La figura 15 muestra los valores de las medias de longitud de brote de las semillas de *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L. luego de la aplicación de los tratamientos con diferentes concentraciones (0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL) de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*. Se puede observar que no existió brotes en las semillas de *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L. con los tratamientos de disolución de aceite esencial de *T. minuta* a las concentraciones de 0.4 y 4 mg/mL. Igual resultado se obtuvo al usar una concentración de 0.04 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* en semillas de *Chenopodium murale* L. Estos resultados sugieren que estas concentraciones son efectivas en la inhibición del crecimiento del brote de las malezas en estudio.

**Figura 15**

*Longitud de brote de Chenopodium murale y Cynodon dactylon en relación a la concentración de disolución de aceite esencial de Tagetes minuta*



*Nota.* Tratamientos y controles de la longitud de brote. Semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon*: controles negativos (C1- y C2-: disolución de agua destilada); controles positivos (C1+ y C2+: 1 mg/mL glifosato); Tratamientos con una disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* a las concentraciones de 0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL.

La tabla 8 muestra un análisis de la varianza (ANOVA), observando que los factores: concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* y tipo de semilla, ejercen un efecto estadísticamente significativo en la longitud de brote ya que el valor de  $p$  ( $<0,0001$ ) es inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ). Además, se indica que existe una interacción significativa entre los factores mencionados debido a que el valor de  $p$  ( $<0,0001$ ) es inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ).

**Tabla 8**

ANOVA de la variable longitud de brote respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* y el tipo de semilla

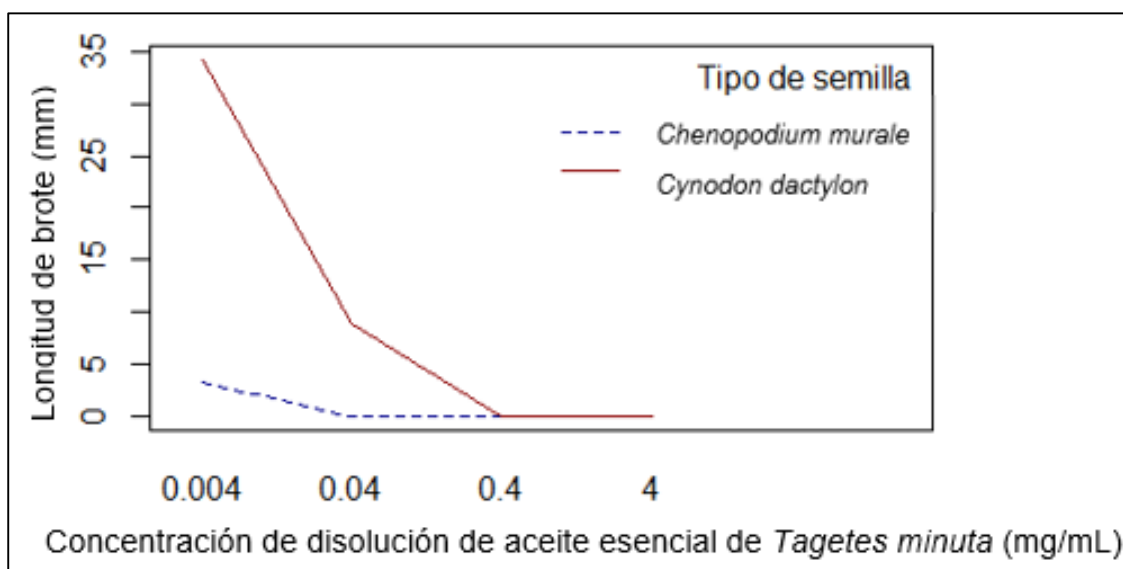
Factores de variación	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19821,60	7	2831,66	22,33	<0,0001
Concentración	9397,35	3	3132,45	24,70	<0,0001
Tipo de semilla	3980,02	1	3980,02	31,38	<0,0001
Concentración* Tipo de semilla	6444,23	3	2148,08	16,94	<0,0001
Error	19276,30	152	126,82		
Total	39097,90	159			

Nota. Nivel de significación del análisis  $\alpha=0,05$ .

La figura 16 confirma la existencia de una interacción estadísticamente significativa entre la concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. y el tipo de semilla. En la gráfica no existe paralelismo, indicando que hay dependencia entre los anteriores factores. Por tanto, la relación entre el tipo de semilla y la longitud de brote depende de la concentración de disolución de aceite esencial de *T. minuta*.

**Figura 16**

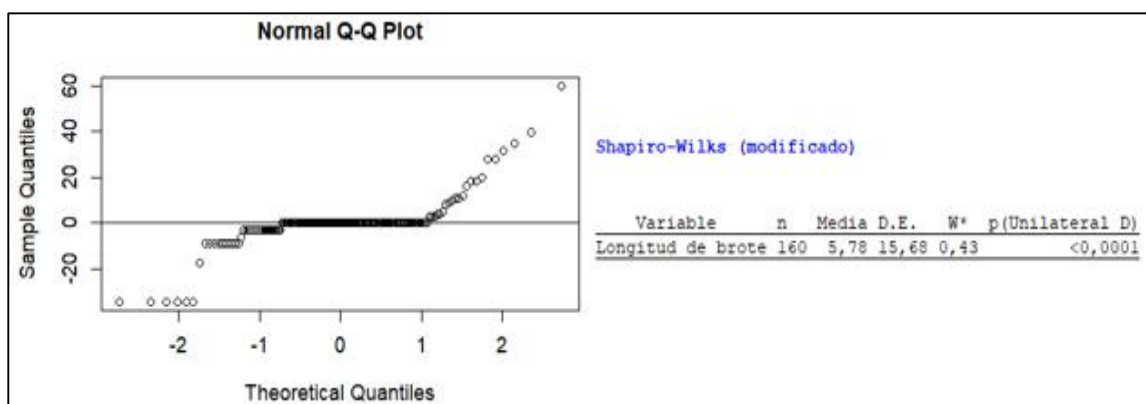
Gráfica de interacción de la longitud de brote respecto a la concentración de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* y el tipo de semilla



A continuación, se analizó la normalidad de los datos mediante la gráfica de normalidad Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado. La figura 17 indica que algunos de los residuos de la variable longitud de brote se encuentran fuera de la línea horizontal de la gráfica Q-Q plot, mostrando que los datos no siguen una distribución normal. Para confirmar el resultado gráfico, se realizó la prueba de Shapiro-Wilks modificado, obteniendo un valor de  $p$  ( $< 0,0001$ ) inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ), por lo que se rechaza la hipótesis nula que plantea que los datos siguen una distribución normal.

**Figura 17**

Gráfica de normalidad Q-Q plot con los residuos de la variable longitud de brote y prueba de Shapiro-Wilks modificado



Debido a que los datos de la variable de longitud de brote no siguen una distribución normal se los puede clasificar como no paramétricos. Aplicando un método de análisis de la varianza no paramétrico, con la prueba de Kruskal Wallis (Fig.18), se determinó que si hay diferencia entre las medias de la variable longitud de brote. El valor de  $p$  ( $<0,0001$ ) obtenido es inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0,05$ ), por tanto, se acepta la hipótesis alternativa que establece que existe una diferencia significativa entre los tratamientos de la longitud de brote.

## Figura 18

Prueba de Kruskal Wallis realizada en los tratamientos de longitud de brote

Variable	Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Tipo de semilla	N	Medias	D.E	Medianas	H	p
Longitud de brote	TB1	0.004	<i>Chenopodium murale</i>	20	3,15	14,09	0,00	33,45	<0,0001
	TB2	0.040			0,00	0,00	0,00		
	TB3	0.400			0,00	0,00	0,00		
	TB4	4.000			0,00	0,00	0,00		
	TB5	0.004	<i>Cynodon dactylon</i>		34,20	26,68	40,50		
	TB6	0.040			8,85	10,21	4,50		
	TB7	0.400			0,00	0,00	0,00		
	TB8	4.000			0,00	0,00	0,00		

Tratamiento	Medias	Ranks
TB4:4.000: <i>Chenopodium murale</i>	0,00	68,00 A
TB7:0.400: <i>Cynodon dactylon</i>	0,00	68,00 A
TB8: 4.000: <i>Cynodon dactylon</i>	0,00	68,00 A
TB3:0.4000: <i>Chenopodium murale</i>	0,00	68,00 A
TB2:0.040: <i>Chenopodium murale</i>	0,00	68,00 A
TB1:0.004: <i>Chenopodium murale</i>	3,15	72,45 A
TB6:0.040: <i>Cynodon dactylon</i>	8,85	104,48 B
TB5:0.004: <i>Cynodon dactylon</i>	34,20	127,08 B

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

La figura 18 muestra la prueba de Kruskal Wallis, donde se observa que los tratamientos que tienen la menor desviación estándar (0,00) y menor media (0,00) en la longitud de brote son TB2, TB3, TB4, TB7 y TB8. Estos tratamientos poseen el menor valor de rango (68,00), lo que sugiere que son los mejores tratamientos debido a que impiden el crecimiento de los brotes.

### **Determinación del porcentaje del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* en la germinación de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon***

El porcentaje del efecto alelopático se calculó mediante el índice de alelopatía sintético (IR<sub>SE</sub>). La tabla 9 indica que el valor del índice alelopático (IR) e IR<sub>SE</sub> es inferior a 0 para los tratamientos T5, T6, T7 y T8 que corresponden a la aplicación de las



concentraciones de 0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* en las semillas de *Cynodon dactylon*, mostrando que ocurrió una inhibición tanto en la germinación como en el desarrollo de los brotes. En los tratamientos T7 y T8, se obtiene un porcentaje de efecto alelopático del 100% ya que inhiben por completo la germinación de las semillas de *C. dactylon* (Fig. 11). Se sugiere que el efecto alelopático del aceite esencial de *T. minuta* se debe a la acción de los metabolitos secundarios que lo constituyen como son el anetol, la carvona, el timol y el eugenol.

**Tabla 9**

*Índice alelopático del aceite esencial de Tagetes minuta en las semillas de Cynodon dactylon*

<b>Concentración de disolución de aceite esencial de <i>T. minuta</i> en semillas de <i>C. dactylon</i> (mg/mL)</b>	<b>Índice alelopático (IR) en el porcentaje de germinación (%)</b>	<b>Índice alelopático (IR) en la longitud de brotes (%)</b>	<b>Índice alelopático sintético (IR<sub>SE</sub>) (%)</b>
0.004 (T5)	-17,65%	-19,05%	-18,35%
0.04 (T6)	-41,18%	-78,57%	-59,87%
0.4 (T7)	-100%	-100%	-100%
4 (T8)	-100%	-100%	-100%

En relación a los tratamientos T1, T2, T3, T4 que corresponden a la aplicación de 0.004, 0.04, 0.4 y 4 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* en las semillas de *Chenopodium murale* no se obtuvo valores de IR, debido a que, en el control para estos tratamientos, no se consiguió la germinación de las semillas (Fig. 11). Se puede sugerir que la disolución de aceite esencial de *T. minuta* a partir de la

concentración de 0.04 mg/mL ejerce un alto porcentaje de efecto alelopático en las semillas de *Chenopodium murale* debido a que en los tratamientos T2, T3 y T4, el aceite esencial de *Tagetes minuta* inhibió por completo la germinación (Fig. 11) y el crecimiento de los brotes, donde no existió formación de brotes por lo que se obtuvo un valor de 0 mm de longitud (Fig. 15).

### **Concentración efectiva de la disolución del aceite esencial de *Tagetes minuta***

La tabla 10 muestra que la concentración efectiva para la disminución del 50% ( $EC_{g50}$ ) y 90% ( $EC_{g90}$ ) en la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* es de 0.014 mg/mL y 0.016 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*, respectivamente. En cambio, la concentración para la disminución del 50% ( $EC_{g50}$ ) y 90% ( $EC_{g90}$ ) en la germinación de las semillas de *Cynodon dactylon* es de 0.055 mg/mL y 0.201 mg/mL de disolución de aceite esencial de *T. minuta*, respectivamente.

**Tabla 10**

Concentración efectiva de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*  $EC_{g50}$  y  $EC_{g90}$

Semilla	$EC_{g50}$ (mg/mL)		$EC_{g90}$ (mg/mL)	
	Estimado	Error estándar	Estimado	Error estándar
<i>Chenopodium murale</i>	0.014	38.014	0.016	49.655
<i>Cynodon dactylon</i>	0.055	0.011	0.201	0.186

*Nota.*  $EC_{g50}$ : Concentración efectiva que provoca una disminución del 50% en la germinación;

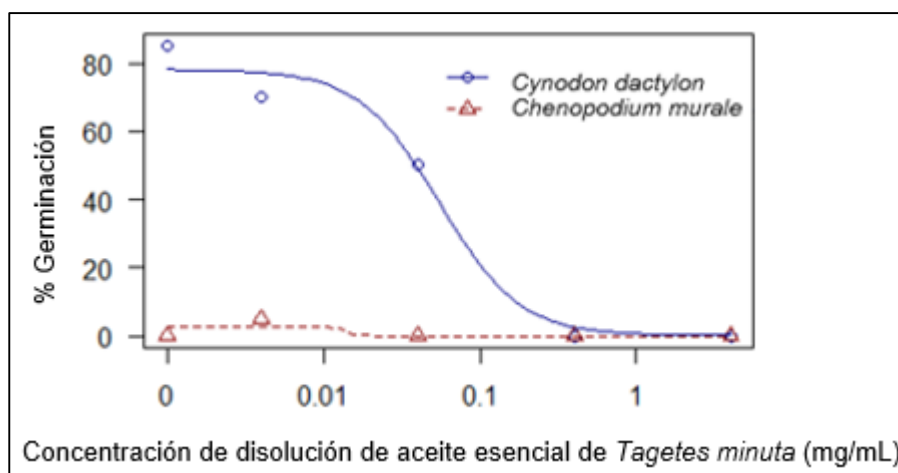
$EC_{g90}$ : Concentración efectiva que causa una reducción del 90% en la germinación.

La curva dosis-respuesta de la figura 19 muestra que la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. reduce el porcentaje de germinación de las semillas de

*Cynodon dactylon*. Las concentraciones crecientes de disolución de aceite esencial de *T. minuta* L. no afectan al porcentaje de germinación de *Chenopodium murale* ya que bajas concentraciones de disolución de aceite esencial inhiben por completo la germinación de estas semillas.

### Figura 19

Curva Dosis-Respuesta para la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon* en relación a la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*



La tabla 11 muestra que la concentración efectiva para la disminución del 50% ( $EC_{b50}$ ) y 90% ( $EC_{b90}$ ) en la longitud de brote de las semillas de *Chenopodium murale* es de 0.019 mg/mL y 0.027 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*, respectivamente. En cambio, la concentración que causa una disminución del 50% ( $EC_{b50}$ ) y 90% ( $EC_{b90}$ ) en la longitud del brote de las semillas de *Cynodon dactylon* es de 0.013 mg/mL y 0.083 mg/mL de disolución de aceite esencial de *T. minuta*, respectivamente.

**Tabla 11**

Concentración efectiva de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*  $EC_{b50}$  y  $EC_{b90}$

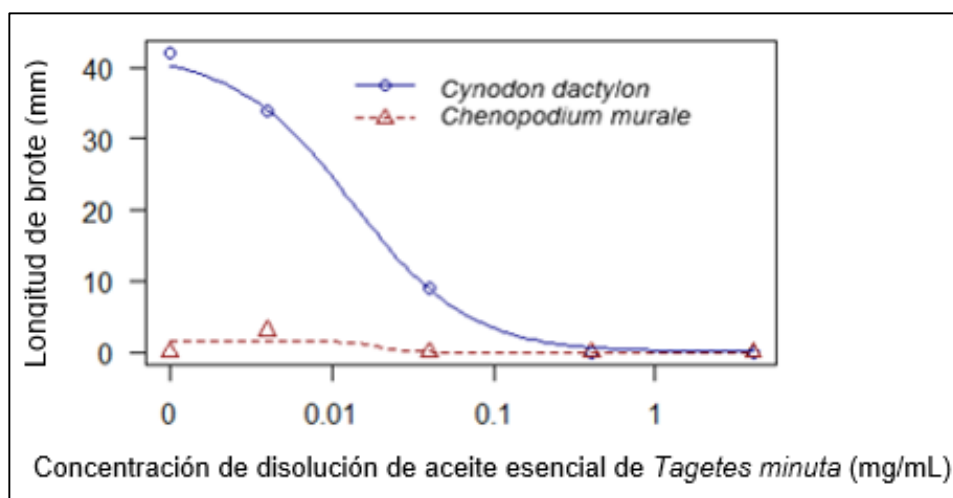
Semilla	$EC_{b50}$ (mg/mL)		$EC_{b90}$ (mg/mL)	
	Estimado	Error estándar	Estimado	Error estándar
<i>Chenopodium murale</i>	0.019	0.147	0.027	0.204
<i>Cynodon dactylon</i>	0.013	0.002	0.083	0.014

*Nota.*  $EC_{b50}$ : Concentración efectiva que provoca una disminución del 50% en la longitud de brote;  $EC_{b90}$ : Concentración efectiva que causa una reducción del 90% en la longitud de brote.

La curva dosis-respuesta de la figura 20 muestra que la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. reduce la longitud de brote de las semillas de *Cynodon dactylon* L. Las concentraciones crecientes de disolución de aceite esencial de *T. minuta* L. no afectan a la longitud de brote de las semillas de *Chenopodium murale* ya que bajas concentraciones de disolución de aceite esencial inhiben el crecimiento del brote.

**Figura 20**

Curva Dosis-Respuesta para la longitud de brote de las semillas de Chenopodium murale y Cynodon dactylon en relación a la disolución de aceite esencial de Tagetes minuta



## Capítulo 4: Discusión

### Extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta* L.

El método de extracción aplicado para obtener el aceite esencial es de fácil operación, de bajo costo y que permite obtener cantidades a escala de laboratorio, necesarias para los ensayos de aleopatía (UPV, 2011). En la extracción de los aceites esenciales es importante tomar en cuenta: lugar, época de recolección, cantidad de material vegetal y sobre todo el rendimiento obtenido.

En esta investigación se obtuvo un rendimiento de 0.33% en la extracción del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. por arrastre de vapor, empleando material vegetal recolectado en la provincia de Pichincha en el mes de octubre. El resultado obtenido es similar al de Cofre (2011) que a partir de muestra proveniente de la provincia de Cotopaxi reporta un rendimiento 0.36%. Al contrario de lo reportado, en Perú, donde se obtuvieron rendimientos superiores, correspondientes a 0.83% y 1.5%, en plantas de *T. minuta* L. recolectadas en los meses de enero y febrero, en las provincias de Rodríguez de Mendoza y Bongará, respectivamente (Baca, 2018), por lo tanto, los factores que posiblemente pueden afectar el rendimiento son la altura, tipo de suelo y época de recolección (Preedy, 2016). Adicionalmente, en Kenia, se han reportado rendimientos inferiores correspondientes a 0.0594% (Gakuubi *et al.*, 2016), lo que confirma que el lugar o zona de recolección influye en el rendimiento de la extracción del aceite esencial de *T. minuta*.

El aceite esencial extraído de *Tagetes minuta* L. (chincho) presentó características particulares como: color amarillo, textura oleosa y olor penetrante, concentrado y aromático (Tabla 6). Autores como Silva (2013) y Mendoza y Ricardo

(2019) reportan el mismo color y textura mencionado, sin embargo, el primero indica que el olor además de ser penetrante es picante y el segundo considera que el olor es *sui generis*, debido a que es único y lo posee solo la especie *Tagetes minuta* L.

El hidrodestilado de *Tagetes minuta* L. obtenido como subproducto de la extracción por arrastre de vapor, tenía un olor similar al de aceite esencial pero menos concentrado debido a que posee moléculas que presentan grupos polares como hidroxilos que los hace permanecer en el agua dándole características aromáticas (Vera, 2012). Esta particularidad permitiría sugerir que el hidrodestilado puede ser una alternativa de uso para ensayos donde se compare la actividad alelopática del aceite esencial y el hidrodestilado.

#### **Cromatografía en capa fina del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho)**

Para este ensayo se aplicó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) usando aceite esencial proveniente de hojas de *Tagetes minuta* L. (chincho) recolectadas en el mes de octubre, para determinar los principios activos que posee. Se utilizó la CCF debido a que requiere una pequeña cantidad de muestra, pocos equipos que están disponibles en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y menor tiempo en comparación a técnicas más sofisticadas y costosas (Kumar, 2019).

La separación cromatográfica reportó factores de retardo (Rf) (Fig. 9) con valores de 0.84, 0.61, 0.56 y 0.48 que corresponden a anetol, eugenol, timol y carvona, respectivamente (Wagner & Bladt, 1996; Oliva, 2012). Pelin (2020) informó acerca de la presencia de anetol y carvona en el aceite esencial extraído por arrastre de vapor de las hojas y flores de *Tagetes minuta*. Estudios similares detectaron eugenol (Gupta & Vasudeva, 2012), carvona (Gillij *et al.*, 2008) y timol (Karimian *et al.*, 2014) en este

aceite esencial. Estas investigaciones reportan resultados de la presencia de principios activos o metabolitos secundarios comunes formando el aceite esencial de *T. minuta*. Los factores que influyen en la composición y abundancia de constituyentes del aceite esencial son la localización geográfica del material vegetal, la temperatura, el estado nutricional y salinidad del suelo, la época de recolección y la disponibilidad de agua (Ncube *et al.*, 2012; Preedy, 2016; Li *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que los componentes encontrados en el aceite esencial en estudio, correspondientes a anetol, timol, carvona y eugenol tienen actividad alelopática frente a malezas como *Lolium rigidum* Gaudin, inhibiendo la germinación y el desarrollo de su raíz (Vasilakoglou *et al.*, 2013). Según Azirak y Karaman (2008) el timol y la carvona impiden la germinación de varias malezas. Además, estos dos compuestos actúan de forma sinérgica para ejercer efectos inhibitorios en la germinación de malezas (Vasilakoglou *et al.*, 2013).

### **Evaluación del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho)**

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) sobre las variables de germinación y longitud de brote. Estas variables son importantes para detectar el potencial alelopático de los aceites esenciales en condiciones *in vitro* (Arora, 2015; Arora, 2017; Laosinwattana *et al.*, 2018). En los ensayos de esta investigación se observó que al incrementar la concentración de aceite esencial disminuyó el porcentaje de germinación (Fig. 11) y la longitud de brote (Fig. 15) de las semillas de *Cynodon dactylon*. Estos resultados dependientes de la concentración son similares a los presentados por Arora y colaboradores (2015, 2017).



Las concentraciones de 0.04, 0.4 y 4 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) inhibieron por completo la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* L. (Fig. 11). Arora y colaboradores (2015) confirmaron estos resultados, utilizando 2 mg de aceite esencial de *Tagetes minuta* en 7 mL de agua destilada por cada caja Petri, que corresponderían a 0.4 mg/mL de aceite esencial, obteniendo un 0% de germinación de semillas de *C. murale* L. Según el estudio analizado, la inhibición de la germinación no se limita a los 0.4 mg/mL de aceite esencial, sino que se comprobó que el efecto inhibitorio se obtuvo a la mínima concentración que fue 0.04 mg/mL de disolución de aceite esencial. La diferencia puede radicar en la forma de aplicación del aceite esencial de *T. minuta*, pues en el presente análisis se empleó el aceite en forma de disolución, mientras que Arora y colaboradores (2015) utilizaron el aceite esencial de forma volátil. Lo que sugiere, que se ejerce un mejor efecto alelopático cuando las semillas entran en contacto directo con los principios activos.

Otro factor que pudo contribuir en la mayor actividad alelopática del aceite esencial de *Tagetes minuta* en este estudio a comparación del realizado por Arora y colaboradores (2015) es la zona de recolección de la muestra vegetal y su incidencia con las condiciones ambientales que pueden influir en la cantidad de principios activos que provocan un efecto alelopático (Sayed, 2017).

En el control negativo, se observó un 0% de germinación en las semillas de *Chenopodium murale* L., lo que impidió el cálculo del índice alelopático. En los ensayos de viabilidad se obtuvo un porcentaje de germinación del 70%, valor considerado aceptable por Hendry (2019) (Anexo 2). Se sugiere que la germinación de *Chenopodium murale* fue inhibida debido a que en el tratamiento de desinfección se

empleó hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, una concentración muy alta en comparación a la usada para estas semillas por Abd-Elgawad y colaboradores (2020). Billard y colaboradores (2014) mencionan que concentraciones de hipoclorito de sodio mayores a 0.5% pueden disminuir la germinación de semillas de *Oncidium bifolium*. Además, Ditommaso y Nurse (2003) reportaron que los efectos de la concentración y el tiempo de exposición del hipoclorito de sodio (NaClO) en las semillas podrían ser especie dependientes, por ello solo la germinación de *Chenopodium murale* se vio afectada.

Se ha reportado que el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) tiene un efecto alelopático en las semillas de *Chenopodium murale* L., *Amaranthus tricolor*, *A. viridis*, *Phalaris minor*, *Echinochloa cruz-galli* y *Bidens pilosa* (Arora et al., 2017). No se han realizado estudios, en cuanto a su fitotoxicidad en las semillas de *Cynodon dactylon* L. El presente estudio reporta que el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. tiene efecto alelopático en las semillas de *Cynodon dactylon* L. pues a las concentraciones de 0.4 mg/mL y 4 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. se obtiene la inhibición completa de la germinación (Fig. 11) y el desarrollo de brotes (Fig. 15).

La disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. a las concentraciones iguales o mayores que 0.4 mg/mL, inhiben la germinación de las semillas de *Cynodon dactylon* L. Según Abraham y colaboradores (2000) el efecto inhibitorio de los aceites esenciales se debe a que tienen la capacidad de alterar la respiración en las mitocondrias y la vía oxidativa de las pentosas fosfato. Vaid y colaboradores (2010) mencionan que el eugenol puede obstaculizar la actividad mitótica en las semillas y reducir la respiración. De Assis y colaboradores (2018) indican en cambio, que el timol promueve daño en el ADN y en el huso mitótico de las raíces.

La longitud de los brotes de *Cynodon dactylon* disminuyó con respecto al control negativo al aplicar los tratamientos con la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. Según Romagni y colaboradores (2000) los terpenos presentes en los aceites pueden alterar la mitosis y provocar anomalías en el crecimiento de los brotes. Arora y colaboradores (2015) observaron que el aceite esencial de *T. minuta* puede detener la división celular en la etapa de interfase provocando anomalías citológicas. Además, Verdeguer y colaboradores (2020) mencionaron que los aceites esenciales pueden disminuir la elongación celular.

La concentración más alta (4mg/mL) de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* posee DMSO al 0.5%. Según Xuefeng y colaboradores (2001) la mencionada concentración de DMSO tienen la capacidad de incrementar el porcentaje de germinación en semillas de *Triticum aestivum* (trigo). Erdman & Hsieh (1969) determinaron que las concentraciones de DMSO del 10% o más en las semillas de *Phaseolus vulgaris* (frijoles), *Pisum sativa* (guisantes), *Secale cereale* (centeno) y *Hordeum vulgare* (cebada) generan una inhibición en la germinación, mientras que las concentraciones del 5% o menos no afectan significativamente. Las concentraciones empleadas de DMSO en las disoluciones son iguales e inferiores al 0.5% por lo que se sugiere que no afectan significativamente a la germinación de las malezas en estudio.

La concentración más alta (4mg/mL) de disolución de aceite esencial de *T. minuta* L. contiene Tween 20 al 0.5%. Según Arlon (1965) esta concentración no afecta la germinación de *Raphanus sativus* var. Scarlet Globe, pero reduce ligeramente la germinación de *Zea mays* y *Setaria faberi*. Posiblemente, el Tween 20 afecta selectivamente la germinación de las malezas como lo menciona Hurtt y Hodgson (1987). Arora y colaboradores (2017) determinaron que Tween 20 al 0.1% no afecta a la

germinación de *Chenopodium murale*, por lo que probablemente no afecte a los tratamientos que emplean concentraciones inferiores.

En relación a las semillas de *Chenopodium murale* L. y *Cynodon dactylon* L., se obtuvo un porcentaje de 10% y 20% en la germinación respectivamente, al aplicar 1mg/mL de glifosato. Estos resultados sugieren, que la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. a la concentración de 0.4 mg/mL posee mayor efecto alelopático que el agroquímico pues inhibe por completo la germinación de las malezas en estudio. Por tanto, se recomienda realizar más estudios empleando el aceite esencial de *T. minuta* pues su aplicación es menos tóxica para el medio ambiente ya que no persiste en el suelo o el agua debido a su rápida descomposición (Laosinwattana *et al.*, 2018).

El aceite esencial de *Tagetes minuta* L. además de afectar el crecimiento de malezas, puede afectar a plantas de interés agrícola como *Zea mays* (maíz). Según Scrivanti y colaboradores (2003) el aceite esencial de *Tagetes minuta* sin diluir y aplicado de forma volátil tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las raíces de *Zea mays* y ejercer un efecto oxidante sobre ellas. Se debería emplear el aceite esencial de *T. minuta* L. en forma de disolución a las concentraciones 0.04 mg/mL, 0.4 mg/mL y 4mg/mL para determinar si tiene efectos fitotóxicos sobre *Zea mays*.

Las concentraciones que provocaron la disminución del 50% (CE<sub>50</sub>) y 90% (CE<sub>90</sub>) de la germinación de las semillas de *Cynodon dactylon* correspondientes a 0.055 mg/mL y 0.201 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta*, son superiores a las concentraciones que causaron el mismo efecto en la germinación *Chenopodium murale* que corresponden a 0.014 mg/mL (CE<sub>50</sub>) y 0.016 mg/mL (CE<sub>90</sub>). Una tendencia similar se reporta en las concentraciones efectivas para la longitud de

los brotes. Según Synowiec y colaboradores (2016) las semillas de mayor tamaño son menos susceptibles a los aceites esenciales, esto se puede confirmar en este estudio debido a que las semillas de *Cynodon dactylon* son más grandes que las semillas de *Chenopodium murale*.

## Capítulo 5: Conclusiones

- La técnica de arrastre de vapor permitió una adecuada extracción del aceite esencial de las hojas de *Tagetes minuta* L. (chincho) con un rendimiento de 0.33%. El aceite esencial se caracterizó por tener color amarillo, textura oleosa y olor penetrante, concentrado y aromático.
- La presencia de principios activos como carvona, timol, eugenol y anetol se identificó en el aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) por medio de cromatografía en capa fina.
- Las concentraciones efectivas para la disminución del 50% ( $EC_{50}$ ) en la germinación de las semillas de *Chenopodium murale* y *Cynodon dactylon* son de 0.014 mg/mL y 0.055 mg/mL de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho), respectivamente.
- El mayor porcentaje de efecto alelopático en la germinación de las semillas de *Cynodon dactylon* (césped) se obtuvo con los tratamientos que emplearon la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) a las concentraciones de 0.4 y 4 mg/mL pues inhibieron totalmente la germinación y el desarrollo de brotes en las semillas de *Cynodon dactylon*.
- Las condiciones de asepsia aplicadas como el hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% no permitieron determinar el porcentaje del efecto alelopático del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) en las semillas de *Chenopodium murale* (cenizo negro) debido a que pudieron ejercer efectos inhibitorios sobre la germinación.

- El aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) ejerce un alto porcentaje de efecto alelopático en las semillas de *Cynodon dactylon*, pudiendo ser un potencial bioherbicida natural.

## Capítulo 6: Recomendaciones

- Se recomienda desinfectar a las semillas de *Chenopodium murale* (cenizo negro) con una concentración de 0.3% de hipoclorito de sodio y realizar ensayos de viabilidad empleando ensayos de germinación y la prueba de tetrazolio previo a los ensayos de alelopatía.
- En próximos ensayos de alelopatía se podría utilizar además de semillas de malezas, semillas de interés agrícola para evaluar el efecto que genera en ellas la disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (chincho) y analizar la posibilidad de emplear el aceite esencial en análisis en suelos destinados a la agricultura.
- Se recomienda realizar ensayos a las concentraciones (0.055 y 0.201 mg/mL) de disolución de aceite esencial de *Tagetes minuta* L. correspondientes a las concentraciones efectivas para la disminución del 50% ( $EC_{50}$ ) y 90% ( $EC_{90}$ ) en la germinación de las semillas de *Cynodon dactylon* para validar los resultados obtenidos con la función log-logistic en el software R.
- A futuro, se debería realizar ensayos de campo para analizar el efecto alelopático de aceite esencial en cultivos de interés agrícola que se encuentran afectados por malezas.



## Capítulo 7: Bibliografía

- Abdala, L. (1999). Caracterización quimiosistemática de las especies argentinas del género *Tagetes* (Asteraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* , 3-9.
- Abd-ElGawad, A., El Gendy, A., El-Amier, Y., Gaara, A., Omer, E., Al-Rowaily, S., . . . Elshamy, A. (2020). Essential oil of *Bassia muricata*: Chemical characterization, antioxidant activity, and allelopathic effect on the weed *Chenopodium murale*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1900-1906.  
doi:10.1016/j.sjbs.2020.04.018
- Abouzienna, H., & Haggag, W. (2016). Weed Control in Clean Agriculture: A Review. *Planta Daninha*, 34(2), 377-392. doi:<https://doi.org/10.1590/S0100-83582016340200019>
- Abraham, D., Braguini, W., Kelmer, A., & Ishii, E. (2000). Effects of Four Monoterpenes on Germination, Primary Root Growth, and Mitochondrial Respiration of Maize. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 611-624.  
doi:<https://doi.org/10.1023/A:1005467903297>
- Aguirre, Z., Jaramillo, N., & Quizhpe, W. (2019). *Arvenses asociados a cultivos y pastizales del Ecuador*. Loja: Universidad Nacional de Loja.
- Ahsan, A., Zulfiqar, U., Sadia, S., Bhowmik, P., & Singh, B. (2019). A global perspective on the biology, impact and management of *Chenopodium album* and *Chenopodium murale*: two troublesome agricultural and environmental weeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 5357-5371.  
doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-018-04104-y>

- Álvarez, D., Botina, J., Ortiz, A., & Botina, L. (2016). Evaluación nematicida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* en el manejo del nemátodo *Meloidogyne* spp. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(1), 22-33.  
doi:<http://dx.doi.org/10.22267/rcia.163301.3>
- Amaya, A., Santos, M., Morán, I., Vargas, P., Comboza, W., & Lara, E. (2018). Malezas presentes en cultivos del cantón Naranjal, provincia Guayas, Ecuador. *Investigatio*(11), 1-16. doi:<http://10.31095/investigatio.2018.11.1>
- Amb, M., & Ahluwalia, A. (2016). Allelopathy: Potential Role to Achieve New Milestones in Rice Cultivation. *Rice Science*, 24(3), 165-183.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.06.001>
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarès, I., Llor, N., Muñoz, D., . . . Velasco, D. (4 de abril de 2014). *Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (TALQ)*. Obtenido de <http://www.ub.edu/talq/es/node/266>
- Annunziata, F., Pinna, C., Dallavalle, S., Tamborini, L., & Pinto, A. (2020). An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1-81.  
doi:10.3390/ijms21134618
- Araniti, F., Lupini, A., Conforti, F., Marrelli, M., Statti, G., Menichini, F., & Abenavoli, M. (2012). Allelopathy potential in *Artemisia arborescens*: isolation, identification and quantification of allelochemicals through fractionation-guided bioassays. *Nat Prod Res*, 27(10), 880-887. doi:10.1080/14786419.2012.691491

- Arlon, G. (1965). *Patterns of surfactant toxicity to plant tissues [Disertación de doctorado, Iowa State University]*. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/38916287.pdf>
- Armijos, C., Lozano, M., Bracco, F., Vidari, G., & Malagón, O. (2012). *Plantas sagradas y psicoactivas usadas por los saraguros en la región sur del Ecuador*. Loja: Ediloja.
- Arora, K., Batish, D., Kohli, R., & Singh, H. (2017). Allelopathic impact of essential oil of *Tagetes minuta* on common agricultural and wasteland weeds. *Innovare Journal of Agricultural Science*, 5(1), 1-4.
- Arora, K., Batish, D., Singh, H., & Kumar, R. (2015). Allelopathic Potential of the Essential Oil of Wild Marigold (*Tagetes minuta* L.) Against Some Invasive Weeds. *Journal of Environmental and Agriculture Sciences*, 3, 56-60.
- Association Française de Normalization (AFNOR). (2000). *Huiles Essentielles*. Paris: AFNOR.
- Azirak, S., & Karaman, S. (2008). Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 88-92.
- Baca, W. (2018). *Estudio comparativo del aceite esencial de Huacatay (Tagetes minuta) de la Región Amazonas por cromatografía líquida de alta resolución [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]*. Obtenido de <http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/UNTRM/1376>

- Baldeón, X. (2011). *Actividad insecticida de los aceites esenciales de Tagetes minuta, Tagetes terniflora y Tagetes zipaquirensis sobre Premnotrypes vorax [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Obtenido de <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/1608/1/56T00286.pdf>
- Ben El Hadj, I., Chaouachi, M., Bahri, R., Chaieb, I., Boussaïd, M., & Harzallah, S. (2015). Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis*. *Ind. Crops Prod.*, 77, 631-639. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.046>
- Billard, C., Dalzotto, C., & Lallana, V. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *oncidium*. *Polibotánica*(38), 145-157. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682014000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Blum, U., Gerig, T., Worsham, A., & King, L. (1993). Modification of allelopathic effects of p-cuomeric acid on morning glory seedling biomass by glucoside, methionine and nitrate. *Journal Chemistry Ecology*, 19(12), 2791-2811. doi:10.1007/bf00980584
- Boutin, C., Strandberg, B., Carpenter, D., Mathiassen, S., & Thomas, P. (2014). Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? *Environmental Pollution*, 185, 295-306. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.009>
- Buckle, J. (2015). *Clinical Aromatherapy*. London: Churchill Livingstone.

- Canals, R., Peralta, J., & Zubiri, E. (9 de septiembre de 2019). *Cynodon dactylon* (L.)  
*Pers: grama común*. Obtenido de  
[https://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Cyno\\_dact\\_p.htm](https://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Cyno_dact_p.htm)
- Carey, J. (2 de octubre de 2018). *Cynodon dactylon*. Obtenido de  
<https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/graminoid/cyndac/all.html>
- Casado, I. (2018). *Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica de Madrid]*.  
[http://oa.upm.es/49669/1/TFG\\_IRENE\\_CASADO\\_VILLAVERDE.pdf](http://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf).
- Casida, J., & Bryant, R. (2017). The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology and chemistry. *Toxicology Research*, 6(6), 755-763.  
doi:<https://doi.org/10.1039/c7tx00198c>
- Castaño, J. (2015). *Principios básicos de hongos Fitopatógenos*. Universidad de Caldas .
- Catalogue of Life. (2019). *GBIF Backbone Taxonomy*. Obtenido de  
<https://www.gbif.org/dataset/7ddf754f-d193-4cc9-b351-99906754a03b>
- Chandrasekara, A. (2019). Phenolic Acids. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 535-545.  
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22395-0>
- Chen, H., Liu, J., Cui, K., Lu, Q., Wang, Q., Wu, H., . . . Chen, X. (2018). Molecular mechanisms of tannin accumulation in *Rhus* galls and genes involved in plant-insect interactions. *Scientific Reports*, 8(9841).  
doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28153-y>

- Cisneros, L. (2006). *Análisis de productos herbales por CCF como parte del proceso de control de calidad [ Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]*.  
Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/1701/1/1080128425.PDF>
- Claramunt, R., Farrán, A., López, C., Pérez, M., & Santa, M. (2013). *Química Bioorgánica y productos naturales*. Madrid: UNED.
- Cofre, C. (2011). *Determinación de la actividad insecticida y/o antialimentaria del aceite esencial de *Tzinsu Tagetes minuta* en *Drosophila melanogaster* [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1579/1/56T00260.pdf>
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582. doi:10.1128/CMR.12.4.564
- De Assis Alves, T., Pinheiro, P., Praça-Fontes, M., Andrade-Vieira, L., Corrêa, K., de Assis Alves, T., . . . Bastos, T. (2018). Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Industrial Crops & Products*, 114, 59-67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.071>
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito: Herbario QCA & Herbario AAU.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel)*, 3(4). doi:10.3390/medicines3040025
- Ditommaso, A., & Nurse, R. (2004). Impact of sodium hypochlorite concentration and exposure period on germination and radicle elongation of three weed species.

*Seed Science and Technology*, 32(2), 377-391.

doi:<https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.2.10>

Duke, S., & Dayan, F. (2018). Herbicides. *eLS*, 1-9.

doi:<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0025264>

El-Gawad. (2015). Chemical constituents, antioxidant and potential allelopathic. *Ind. Crops Prod.*, 36-41.

El-Gawad, A., Elshamy, A., El Gendy, A., Gaara, A., & Assaeed, A. (2019). Volatiles Profiling, Allelopathic Activity, and Antioxidant Potentiality of Xanthium Strumarium Leaves Essential Oil from Egypt: Evidence from Chemometrics Analysis. *molecules*, 24(3), 1-12. doi:10.3390/molecules24030584

Erdman, H., & Hsieh, J. (1969). Dimethylsulfoxide (DMSO) Effects on Four Economically Important Crops. *Agronomy Journal*.

doi:<https://doi.org/10.2134/agronj1969.00021962006100040014x>

FAO. (2004). *Manejo de malezas para países en desarrollo*. Roma: organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación .

FAO. (2020). Recuperado el 3 de diciembre de 2020, de

<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/biodiversity/weeds/listweeds/cyn-dac/en/>

Fernández, J., & Chacón, M. (2012). *Especies vegetales aromáticas de la Provincia de Sumapaz y la cuenca del río Chicamocha en Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

- Fongang, S., & Bankeu, J. (2020). Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils. En M. Santana, *Essential Oils: Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications*. IntechOpen.
- Fonnegra, R., Alzate, F., Orozco, C., Vásquez, C., Correa, A., Suárez, J., & García, V. (2012). *Medicina Tradicional en los corregimientos de Medellín*. Medellín: Herbario Universidad de Antioquia.
- Fonnegra, R., Villa, J., & Monsalve, Z. (2016). *Plantas usadas como medicinales en el altiplano del oriente antioqueño - Colombia*. Medellín: Herbario Universidad de Antioquia.
- Gakuubi, M., Wagacha, J., Dossaji, S., & Wanzala, W. (2016). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *International Journal of Microbiology*, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1155/2016/7352509>
- Gakuubi, M., Wanzala, W., Wagacha, J., & Dossaji, S. (2016). Bioactive properties of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oils: A review. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(2), 27-36.
- German, D. (2019). *Influencia del material vegetal utilizado de *Tagetes multiflora* y *Ambrosia arborescens* y el método de extracción, en la cuantificación de alcaloides para la evaluación del efecto antioxidante [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]*. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18816/1/T-UCE-0008-CQU-139.pdf>



- Gharde, Y., Singh, P., Dubey, R., & Gupta, P. (2018). Assessment of yield and economic losses in agriculture due to weeds in India. *Crop Protection*, 107, 12-18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.01.007>
- Gillij, Y., Gleiser, M., & Zygadlo, J. (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*, 99(7), 2507-2515. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.066
- Goleniowski, M., Bonfill, M., & Palazón, J. (2013). Phenolic Acids. En K. Ramawat, & J. Mérillon, *Natural Products* (págs. 1951-1973). Berlin: Springer. doi:[https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_64](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_64)
- Gómez, W. (2016). *Identificación de arvenses presentes en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) en Montalvo, Vinces y Urdaneta [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]*. Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7942>
- Gupta, P., & Vasudeva, N. (2012). Marigold: A potential ornamental plant drug. *Hamdard Med*, 55(1), 45-59.
- Hendry, A. (21 de febrero de 2019). *A Simple Germination Test for Seeds*. Obtenido de <https://www.growveg.com/guides/a-simple-germination-test-for-seeds/#:~:text=You%20have%20a%20very%20respectable,of%20at%20least%20one%20germinating.>
- Herbario JBB en línea- Jardín Botánico José Celestino Mutis. (19 de noviembre de 2020). *Tagetes verticillata Lag. & Rodr.* Obtenido de <http://herbario.jbb.gov.co/especimen/28249>

- Hernández, B. (2015). *Investigación de potenciales propiedades alelopáticas de dos especies de leguminosas (Calliandra carbonaria) y (Vicia faba L.) sobre malezas del cultivo de Quinoa (Chenopodium quinoa Willd) [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]*. Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6440>
- Hincapié, C., Monsalve, Z., Seigler, D., Alarcón, J., & Cespedes, C. (2011). Antioxidant activity of *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett., *Curcuma domestica* Valetton and *Tagetes verticillata* Lag. & Rodriguez. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(4), 315-324.
- Howard, N. (10 de septiembre de 2019). *How Long Is the Germination Time for Bermuda Grass Seed?* Obtenido de <https://homeguides.sfgate.com/long-germination-time-bermuda-grass-seed-73963.html>
- Hurt, W., & Hodgson, R. (1987). Effects of Nonionic Surfactants, Temperature, and Light on Germination of Weed Seeds. *Weed Science*, 52-57.
- IAS (International Allelopathy Society). (1996). *First World Congress on Allelopathy: A science for the future*. . Cadiz.
- Ilboudo, O., Bonzi, S., Tapsoba, I., Somda, I., & Bonzi, Y. (2016). Activité antifongique in vitro des flavonoïdes diglycosides de *Mentha piperita* et de leur dérivé oxime contre deux champignons céréalières. *Comptes Rendus Chimie*, 19(7), 857-862. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.11.023>
- INEC. (17 de julio de 2019). *2018: Seis cultivos con mayor producción en Ecuador*. Obtenido de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/2018-seis-cultivos-con-mayor->

produccion-en-ecuador/#:~:text=En%202018%2C%20la%20superficie%20de,Estad%C3%ADstica%20y%20Censos%20(INEC).

INRA. (noviembre de 2000). *Chenopodium murale* L. Obtenido de [https://www2.dijon.inrae.fr/hyppa/hyppa-a/chemu\\_ah.htm](https://www2.dijon.inrae.fr/hyppa/hyppa-a/chemu_ah.htm)

ITIS. (14 de noviembre de 2009). *Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist*. Obtenido de <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/details/species/id/7074969>

IUPAC. (1979). *Nomenclature of Organic Chemistry*. Oxford: Pergamon Press.

Jabran, K., Mahajan, G., Sardana, V., & Chauhan, B. (2015). Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection*, 72, 57-65.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.03.004>

John, J., & Sarada, S. (2012). Role of phenolics in allelopathic interactions. *Allelopathy Journal*, 29(2), 215-230.

Jorgensen, P., & León, S. (1999). *Catalogue of Vascular Plants of Ecuador*. Missouri: Missouri Botanical Garden.

Karimian, P., Kavoori, G., & Amirghofran, Z. (2014). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(3), 219-227.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60235-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60235-5)

- Knezevic, S., Streibig, J., & Ritz, C. (2007). Utilizing R Software Package for Dose-Response Studies: The Concept and Data Analysis. *Weed technology*, 21(3), 840-848. doi:<https://doi.org/10.1614/WT-06-161.1>
- Kumar, K. (2019). *Thin Layer Chromatography: Applications and Advantages*. Obtenido de <https://www.cognibrain.com/thin-layer-chromatography-applications-and-advantages/>
- Labrada, R. (2004). *Manejo de malezas para países en desarrollo*. Italia: FAO.
- Labrada, R., Caseley, J., & Parker, C. (1996). *Manejo de Malezas para Países en Desarrollo*. Roma: FAO.
- Laosinwattana, C., Wichittrakarn, P., & Teerarak, M. (2018). Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. *Industrial Crops and Products*, 126, 129-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.013>
- Lauriano, A., & Lizaraso, Y. (2017). *Caracterización y Obtención de Preservantes Microencapsulados a partir de Extractos Acuáticos de Orégano (*Origanum vulgare*), Chincho (*Tagetes elliptica*) y Acedera (*Rumex crispus*)*. Obtenido de [http://repositorio.usil.edu.pe/bitstream/USIL/2768/1/2017\\_Lauriano\\_Caracterizacion-y-obtencion-de-preservantes-microencapsulados.pdf](http://repositorio.usil.edu.pe/bitstream/USIL/2768/1/2017_Lauriano_Caracterizacion-y-obtencion-de-preservantes-microencapsulados.pdf)
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>

- Llorens, J. (21 de octubre de 2013). Cromatografía en capa fina. Youtube. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=3xHzSXkRslg>
- Lock, O. (1988). *Investigación Fitoquímica: Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru.
- Lu, F., & Ralph, J. (2010). Lignin. En R. Sun, *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (págs. 196-207). Elsevier.  
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00006-7>
- Ma, H., Chen, Y., Chen, J., Zhang, Y., Zhang, T., & He, H. (2020). Comparison of allelopathic effects of two typical invasive plants: *Mikania micrantha* and *Ipomoea cairica* in Hainan island. *Scientific reports*, *10*(1), 1-10.  
doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68234-5>
- Mendoza, J., & Ricardo, E. (s.f.). *Características fisicoquímicas del aceite esencial y determinación del porcentaje relativo de sus componentes hidrocarbonados y oxigenados de la hoja de Tagetes minuta L. (Huacatay) [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]*. Obtenido de <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/12605/Mendoza%20Flores%20Jorge%20Neil.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Minitab. (2019). *Interpret the key results for Two-way ANOVA*. Obtenido de <https://support.minitab.com/en-us/minitab-express/1/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/how-to/two-way-anova/interpret-the-results/key-results/>
- Missouri Botanical Garden. (24 de noviembre de 2020). *Tagetes zypaquirensis Bonpl.* Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/2717811>

- Moghimipour, E., & Handali, S. (2014). Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. *Annual Research & Review in Biology*, 5(3), 207-220. doi: 10.9734/ARRB/2015/11674
- Mondragón, J., & Vibrans, H. (16 de Agosto de 2009). *Tagetes erecta* L. Recuperado el 2020, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-erecta/fichas/ficha.htm>
- Moreno, N., Miranda, D., & Martínez, F. (2013). Germinación de semillas de anón (*Annona squamosa* L.) sometidas a estratificación. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1), 20-30. doi:<https://doi.org/10.17584/rcch.2013v7i1.2032>
- Museo Nacional de Historia Natural. (2012). *Tagetes dianthiflora*. Obtenido de [https://science.mnhn.fr/taxon/species/tagetes/dianthiflora?lang=en\\_US](https://science.mnhn.fr/taxon/species/tagetes/dianthiflora?lang=en_US)
- Mutlu, S., Atici, O., & Esim, N. (2010). Bioherbicial effects of essential oils of *Nepeta meyeri* Benth. on weed spp. *Allelopathy Journal*, 26(2), 291-300.
- Nanda, S., Mohanty, J., Mishra, R., & Joshi, R. (2016). Metabolic Engineering of PhenylPropanoids in Plants. En *Transgenesis and Secondary Metabolism* (págs. 1-26). Springer. doi:[https://doi.org/10.1007/978-3-319-27490-4\\_30-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27490-4_30-1)
- Naranjo, B. (11 de noviembre de 2017). Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor de plantas recolectadas en campo. (A. Pumisacho, Entrevistador)
- Naranjo, B. (Mayo de 2017). Guía de laboratorio de extracción de aceites esenciales mediante arrastre de vapor de plantas recolectadas en campo. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.

- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 1-20. doi:<https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Ncube, B., Finnie, J., & Van Staden, J. (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 82, 11-20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.009>
- Niro, E., Marzaioli, R., De Crescenzo, S., D'Abrosca, B., Castaldi, S., Esposito, A., . . . Rutigliano, F. (2016). Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry*, 95, 30-39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.028>
- Noriega, P. (10 de octubre de 2020). *Terpenes in Essential Oils: Bioactivity and Applications*. Obtenido de <https://www.intechopen.com/online-first/terpenes-in-essential-oils-bioactivity-and-applications>
- Oliva, I. (2012). *Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos, de acetato de etilo y clorofórmicos de laurel: Litsea glaucescens HBK. y Litsea guatemalensis Mez. [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala]*. Obtenido de <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1220.pdf>
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana Ediciones.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. (2015). Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.

Pannacci, E., Masi, M., Farneselli, M., & Tei, F. (2020). Evaluation of Mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) Aqueous Extract as a Potential Bioherbicide to Control *Amaranthus retroflexus* L. in Maize. *Agriculture*, *10*(12), 1-13.  
doi:<https://doi.org/10.3390/agriculture10120642>

Pardo, J. (2002). *Patentabilidad de los extractos vegetales*. Recuperado el 02 de Mayo de 2020, de  
[http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc\\_dilluns\\_CP/pardo\\_patentesextractos plantas.pdf](http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractos plantas.pdf)

Patil, P., Karpe, A., Gharge, P., & Hiremath, S. (2017). Glyphosate combined with Propaquizafop to Control of *Cynodon dactylon* in Cotton and Fallow. *Trends in Biosciences*, *10*(21), 4122-4126.

Pawlowski, A., Kaltchuk-Santos, E., Zini, C., Caramão, E., & Soares, G. (2012). Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. *Revista Sudafricana de Botánica*, *80*, 96-103.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.03.003>

Pelin, N. (2020). Essential Oil Content and Compositions of Naturalized *Tagetes minuta* L. (Wild marigold). *Natural Volatiles & Essential Oils*, *7*(2), 17-21.  
doi:<https://doi.org/10.37929/nveo.704056>

Pérez, F., & Pita, J. (mayo de 2016). Obtenido de Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas: <https://www.coiaclc.es/wp-content/uploads/2016/05/Viabilidad.pdf>



- Pichette, A. (2002). Essential Oils from Bolivia. IV. Compositae: Tagetes aff. maxima Kuntze and Tagetes multiflora H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698820>.
- Pilco, S. (agosto de 2014). Obtenido de <https://www.slideshare.net/jesuspilco/el-mundo-de-las-malezas-y-su-efecto-en-la-produccion-ecuador>
- Pineda, C., & Pinto, A. (2013). *Recopilación de información científica de treinta y una plantas medicinales utilizadas en la fabricación de productos naturales y elaboración de un herbario [Tesis de Licenciatura, Universidad de El Salvador]*. El Salvador. Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4917>
- Portal Tecnoagricola. (2019). *Glifosato*. Obtenido de <https://www.buscador.portalteconoagricola.com/vademecum/mex/producto-tecnico/8377/GLIFOSATO>
- Preedy, V. (2016). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. San Diego: Elsevier.
- Price, A. (2015). *Herbicides*. Intechopen.
- Radhakrishnan, R., Alqarawi, A., & Abd\_Allah, E. (2018). Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 131-138. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>
- Ratnavathi, C. (2018). Grain Structure, Quality, and Nutrition. En *Breeding Sorghum for Diverse End Uses* (págs. 193-207). Woodheah Publishing. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101879-8.00012-7>

- Rea, J. (2012). *Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de (Drymaria ovata), (Senna macrophylla) Y (Tagetes filifolia Lag) [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/56T00360.pdf>
- Ritz, C., & Strebjg, J. (30 de agosto de 2016). *Package 'drc'*. Obtenido de <http://www.r-project.org>, <http://www.bioassay.dk>
- Rivera, C. (2018). *Estudio del efecto alelopático del extracto de flor Calliandra haematocephala sobre la germinación de malezas asociadas al cultivo de arroz, y análisis del comportamiento ambiental [Tesis de posgrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]*. Sangolquí. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/15376>
- Rojas, S. (16 de marzo de 2011). *Tagetes minuta L.* . Obtenido de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-minuta/fichas/ficha.htm>
- Romagni, J., Allen, S., & Dayan, F. (2000). Allelopathic Effects of Volatile Cineoles on Two Weedy Plant Species. *Journal of Chemical Ecology*, 26(1), 303-313. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1005414216848>
- Rzedowski, G., & Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Michoacán: Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

- Sahoo, S., Seydibeyoğlu, M., Mohanty, A., & Misra, M. (2011). Characterization of industrial lignins for their utilization in future value added applications. *Biomass Bioenergy*, 35(10), 4230-4237.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.07.009>
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M., Carneiro, J., Leal, A., Coutinho, H., . . . Sharifi-Rad, J. (2018). Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules*, 23(11), 1-35.  
doi:<https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Santos, P., Santos, V., Mecina, G., Andrade, A., Fegueiredo, P., Moraes, V., . . . Silva, R. (2015). Phytotoxicity of *Tagetes erecta* L. and *Tagetes patula* L. on plant germination and growth. *South African Journal of Botany*, 100, 114-121.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.05.013>
- Sayed, N. (2017). Chemical Structure, Quality Indices and Bioactivity of Essential Oil Constituents. En H. El-Shemy, *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*. IntechOpen.
- Schiavinato, D., Gutierrez, D., & Bartoli, A. (2017). Tipificaciones y aclaraciones de nomenclatura en América del Sur *Tagetes* (Asteraceae, Tageteae). *Phytotaxa*, 326(3), 175-188. doi:<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.326.3.2>
- Schonbeck, M. (7 de enero de 2020). *An Ecological Understanding of Weeds*. Obtenido de <https://eorganic.org/node/2314>

- Scrivanti, L., Zunino, M., & Zygodlo, J. (2003). Tagetes minuta and Schinus areira essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(6), 563-572. doi:[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00202-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00202-8)
- Serrato, M., Díaz, F., & Barajas, J. (2007). Composición del aceite esencial en germoplasma de Tagetes filifolia Lag. de la región centro - sur de México. *Agrociencia*, 42(3), 277-285.
- Serrato, M., Reyes, B., Ortega, L., Domingo, A., Gómez, N., López, F., . . . Vallejo, C. (2003). Anisillo (Tagetes filifolia Lag.): Recurso Genético Mexicano para controlar la mosquita blanca (Bemisia sp. y Trialeurodes sp.). *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 4(1), 65-70.
- Shahzadi, I., Hassan, A., Khan, U., & Shah, M. (2010). Evaluating biological activities of the seed extracts from Tagetes minuta L. found in Northern Pakistan. *Journal of Medicinal Plant Research*, 4(20), 2108-2112.
- Shirmohammadli, Y., Efhamisisi, D., & Pizzi, A. (2018). Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Industrial Crops and Products*, 126, 316-332. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.034>
- Silva, J. (2013). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA "IN VIVO" DE ACEITES ESENCIALES DE Tagetes minuta y Tagetes zipaquirensis SOBRE Tagetes minuta y Tagetes zipaquirensis sobre Lasius niger [Tesis de Pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3233/1/56T00413.pdf>

- Singh, H., Batish, D., Kaur, S., Vaid, S., & Kohli, R. (2004). Weed suppressing ability of some volatile monoterpenes. *J. Plant Dis. Prot.*, 821-828.
- Singh, Y., Gupta, A., & Kannoja, P. (2020). *Tagetes erecta* (Marigold) - A review on its phytochemical and medicinal properties. *Current Medical and Drug Research*, 4(1), 1-6.
- Sistema Integrado de Información Taxonómica ITIS. (27 de noviembre de 2020). *Chenopodium murale* L. . Obtenido de [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=20622#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=20622#null)
- Srivastava, M. (2010). *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Stahl, E. (2013). *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*.
- Stefanazzi, N. (2006). Actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) en *Tribolium castaneum* Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 32, 439-447.
- Stefanazzi, N., Gutierrez, M., Stadler, T., Bonini, A., & Ferrero, A. (2006). Actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) en *Tribolium castaneum* Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 439-447.
- Streibig, J. (1988). Herbicide bioassay. *Weed Res*, 497-484.  
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1988.tb00831.x>

- Strother, J. (2006). *Tagetes minuta* L. Obtenido de [onabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-minuta/fichas/ficha.htm](http://onabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-minuta/fichas/ficha.htm)
- Synowiec, A., Kalembe, D., Drozdek, E., & Bocianowski, J. (2016). Phytotoxic potential of essential oils from temperate climate plants against the germination of selected weeds and crops. *Journal of Pest Science*, *90*(1), 407-419.  
doi:<https://doi.org/10.1007/s10340-016-0759-2>
- Taghavi, S., Kwong, C., Secrist III, J., Khan, S., & Clark, A. (2016). The synthesis and biological evaluation of alkyl and benzyl naphthyridinium analogs of eupolauridine as potential antimicrobial and cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *24*(23), 6119-6130.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.028>
- Tello, C. (2014). *Las plantas alelopáticas*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Thanh, V., Tamer, I., Maryia, M., Kwame, A., Yosei, O., & Yoshiharu, F. (2019). Caffeine: The Allelochemical Responsible for the Plant Growth Inhibitory Activity of Vietnamese Tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). *Agronomy*, *9*(7), 1-15.  
doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy9070396>
- The Trustees of Indiana University. (1962 de mayo de 9). *Tagetes multiflora* Kunth.  
Obtenido de <https://herbanwmex.net/portal/collections/individual/index.php?occid=17022418>

- Thermo Fisher. (11 de diciembre de 2020). Obtenido de <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-resource-library.html>
- Thiébaud, G., Tarayre, M., & Rodríguez-Pérez, H. (2019). Allelopathic Effects of Native Versus Invasive Plants on One Major Invader. *frontiers in Plant Science*, 1-10. doi:10.3389/fpls.2019.00854
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. London: Elsevier.
- Toro, J., Briones, J., & Pinoargote, M. (2005). *Tratado de malezología*. Manabí: Imprenta y gráficas Mera.
- Troiani, H., & Steibel, P. (2008). *Reconocimiento de Malezas. Región Subhúmeda y Semiárida Pampeana*. Argentina: Colegio Ingenieros Agrónomos La Pampa-Facultad de Agronomía UNLPam Edición .
- Tropical Plants Database. (18 de Noviembre de 2020). *Tagetes filifolia*. Obtenido de <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Tagetes+filifolia>
- Tropicos. (27 de julio de 2009). *Catálogo de las plantas Vasculares del Ecuador*. Obtenido de <http://legacy.tropicos.org/Name/40009619?projectid=2>
- Tuarez, H. (2019). *Potencial efecto alelopático de algunas especies de malezas de importancia económica, en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.), bajo condiciones de invernadero [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Babahoyo]*. Babahoyo. Obtenido de <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/5651>

- UNAM. (diciembre de 2007). *Técnicas cromatográficas*. Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- UNAM. (25 de junio de 2020). Cromatografía de gases. Fundamentos y aplicaciones [Archivo de Vídeo]. Youtube. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=ppzDFjQNg30>
- UPC. (7 de junio de 2012). La cromatografía (II): cromatografía de gases / espectrometría de masas [Archivo de Vídeo]. Youtube. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=V1ymtuPZfOk>
- UPV. (27 de septiembre de 2011). Obtención de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor [Archivo de Vídeo]. Youtube. Obtenido de Youtube: <https://www.youtube.com/watch?v=4olf5ZwNBw4>
- Uvidia, R. (2012). *Determinación de la actividad microbiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *Duranta triacanta* Juss, *Callistemon speciosus* y *Tagetes minuta* L. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. Obtenido de <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/2467/1/56T00361.pdf>
- Vaid, S., Batish, D., Singh, H., & Kohli, R. (2010). Phytotoxic effect of Eugenol towards two weedy species. *An international quarterly journal of life sciences*, 5(3), 339-342.
- Vasilakoglou, I., Dhima, K., Paschalidis, K., & Ritzoulis, C. (2013). Herbicidal potential on *Lolium rigidum* of nineteen major essential oil components and their synergy.



*Journal of Essential Oil Research*, 25(1), 1-10.

doi:<https://doi.org/10.1080/10412905.2012.751054>

Vera, I. (2012). *Extracción por arrastre de vapor: "Importancia y Aplicación"*.

Cochabamba: Universidad Mayor de San Simon.

Verdeguer, M., Sánchez, A., & Araniti, F. (2020). Phytotoxic effects and Mechanism of

Action of Essential Oils and Terpenoids. *Plants*, 9(11), 1-52.

doi:<https://doi.org/10.3390/plants9111571>

Vibrans, H. (16 de agosto de 2009). *Chenopodium murale L.* Obtenido de

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/chenopodium-murale/fichas/ficha.htm>

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. New York: Springer.

Wagner, H., & Bladt, S. (2009). *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography*

*Atlas*. Berlin: Springer.

Williamson, G., & Richardson, D. (1988). Bioassays for allelopathy: Measuring treatment

responses within dependent controls. *Journal of Chemical Ecology*, 14(1), 181-

187. doi:10.1007/BF01022540

Xuefeng, Z., Sangen, W., Tao, Z., & Yu, G. (2001). Effects of Dimethylsulfoxide (DMSO)

on Germination Percentage of Wheat Seeds and the Quality of the Seedlings.

*Journal of Southwest Agricultural University*, 24(5), 389-392.

Yaisys, B. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos

agrícolas. *Cultivos tropicales*, 27(3), 5-16.

- Yu, J., Zhang, Y., Niu, C., & Li, J. (2006). Effects of two kinds of allelochemicals on photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of *Solanum melongena* L. seedlings. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 17(9), 1629-1632.
- Yu, O., & Ho, K. (2020). Lignin to Materials: A Focused Review on Recent Novel Lignin Applications. *Applied Sciences*. doi:<https://doi.org/10.3390/app10134626>
- Yumi, J. (2018). *Determinación de la actividad insecticida de los aceites esenciales de Tagetes minuta, Tagetes terniflora, Tagetes zipaquirensis, en Brevicoryne brassicae [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*.  
Obtenido de  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1590/1/56T00278.pdf>
- Zabka, M., & Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93(6), 1051-1056. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.076
- Zeng, R., Mallik, A., & Luo, S. (2008). *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. New York: Springer .
- Zolla, C. (24 de febrero de 2019). *Medicina Tradicional Mexicana*. Obtenido de  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php>

## Capítulo 8: Anexos