

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización de la naturaleza fitoquímica y actividad alelopática de extractos naturales del roble andino colombiano *Quercus humboldtii* como potencial bioherbicida

Juan José Ortiz López

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área curricular Ciencias Naturales
Escuela de Química
Medellín, Colombia
2023

Caracterización de la naturaleza fitoquímica y actividad alelopática de extractos naturales del roble andino colombiano *Quercus humboldtii* como potencial bioherbicida

Juan José Ortiz López

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Química

Director (a):

Ph.D., Bióloga Tatiana Lobo Echeverri

Línea de Investigación:

Química de los productos naturales

Grupo de Investigación:

Química de los productos naturales y los alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área curricular Ciencias Naturales

Escuela de Química

Medellín, Colombia

2023

“A veces nuestro destino semeja un árbol frutal en invierno. ¿Quién pensaría que esas ramas reverdecerán y florecerán? Mas esperamos que así sea y sabemos que así será”

Johann Wolfgang von Goethe

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Juan José Ortiz López

02/08/2023

Fecha

Agradecimientos

Quisiera agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Ciencias, a la Escuela de Química y al proyecto del que derivó esta investigación, por darme la oportunidad de seguir disfrutando de los espacios académicos e investigativos, así como de permitirme enseñar mis conocimientos. Con todo ese apoyo y trabajo, pude desarrollar esta tesis de maestría complementando así la formación que recibí en esta misma institución en la instancia de pregrado como ingeniero biológico.

A la doctora Tatiana Lobo Echeverri por quien tengo un profundo respeto y admiración ya que sus enseñanzas, consejos y experiencia, supieron guiarme en los momentos de duda y mantener la calma en los momentos de euforia. Su aporte a mi vida académica y personal han sido determinantes para seguir avanzando en este mundo tan cambiante.

A mis compañeros del laboratorio de productos naturales por su amabilidad, integridad, compromiso y ayuda en este proceso de investigación.

A mis padres por ser el motor de mis anhelos y mi ejemplo a seguir, por ser la prueba fehaciente de la superación personal y el coraje ante la desesperanza y por acompañarme siempre en la obtención de conocimiento útil para la sociedad, en su honor, parte de su esencia reside en este documento y en los futuros que yo pueda llegar a producir. A mi familia y amigos por quienes cada momento de descanso fue un oasis gratificante. Y a todos aquellos que se sumaron y aportaron al desarrollo de esta causa.

A la fortuna y a la divina providencia que me han acompañado con pocos eventos catastróficos y que han mantenido intacta mi integridad física y mental durante este tiempo, creo que sin ellas este proceso no hubiera sido exitoso.

A este trabajo en sí, porque me ha permitido ampliar mi horizonte conceptual y me ha dado la motivación de seguir creciendo académicamente.

Resumen general

En las últimas décadas el ser humano ha visto la necesidad de mantener un sistema productivo agropecuario en constante crecimiento debido a una población que ya supera los 8000 millones de habitantes. Para este fin, desde la década de los setenta se han utilizado agroquímicos de síntesis, fundamentales para la fertilización de suelos y control de especies no deseadas en monocultivos. Sin embargo, se ha reportado una relación entre la utilización de dichos agentes químicos sintéticos y daños al medio ambiente junto a incidencias en enfermedades del ser humano. Este fenómeno sumado al hecho de que los agroquímicos de síntesis son derivados del petróleo y que para el año 2050 la humanidad espera desvincularse de su uso, plantea una necesidad de buscar alternativas innovadoras y de bajo impacto medio ambiental que permitan mantener un sistema agropecuario productivo y en crecimiento. Para ello, el aprovechamiento de especies con potenciales alelopáticos puede ser una alternativa viable tanto económica como biológicamente para los países megadiversos ya que pueden darles un valor agregado a sus especies reduciendo el impacto ambiental que generan los productos agroquímicos sintéticos. Con lo anteriormente dicho, el presente estudio evaluó el potencial fitotóxico de extractos etanólicos de las especies más abundantes colectadas en 11 parcelas de estudio establecidas en remanentes de bosques andinos en Antioquia, mediante pruebas de fitotoxicidad sobre semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). De este estudio se seleccionaron los extractos provenientes del roble andino colombiano *Quercus humboldtii* (Fagaceae) debido a su potencial promisorio afectando la germinación de semillas de lechuga (>80%) y la elongación de la radícula a una concentración de 500 mg*L⁻¹. Adicionalmente, al tener muestras de roble colectadas en dos sitios de colección a diferentes altitudes (Belmira y Anorí), se compararon ambos extractos en bioensayos adicionales y por medio de cromatografía líquida (HPLC), para determinar la posible incidencia de los factores ambientales en la actividad y composición del extracto de roble. Aunque no se encontraron diferencias significativas en los bioensayos ni cambios sustanciales en el perfil cromatográfico de los extractos de roble con diferente origen, se seleccionó el extracto proveniente de la muestra colectada en el páramo de Belmira para proseguir el trabajo de

laboratorio, por su tendencia a presentar mayores índices de fitotoxicidad y por su disponibilidad. De esta forma se determinó la concentración media inhibitoria (IC_{50}) para dicho extracto etanólico en el ensayo de inhibición de germinación de semillas de lechuga, el cual fue de $198 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ mostrando potencial fitotóxico, afectando tanto la inhibición de la germinación como la elongación de radícula. En el fraccionamiento biodirigido inicialmente se obtuvieron 4 fracciones nombradas F1, F2, F3 y F4. Adicionalmente por precipitación se obtuvo un sólido blanco provenientes de la fracción F2 que se denominó, F2-P. Luego de la evaluación de la bioactividad de todas las fracciones, F2 y F3 presentaron el mejor resultado en las pruebas de inhibición de la germinación, pero no se mezclaron pues se observó que ambas fracciones presentaban perfiles químicos diferentes al compararlas por cromatografía de capa fina. La fracción F2 fue finalmente seleccionada para su caracterización por presentar mejor potencial inhibitor de la germinación a diferentes concentraciones y mayor afectación en la elongación de la radícula e hipocótilo de semillas de lechuga. Al fraccionar F2 se obtuvieron 23 fracciones finales, de los cuales las fracciones F2-P, F2-2, F2-3, F2-8, F2-9 y F2-10 fueron analizadas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), detectándose mayoritariamente ácidos grasos, esteroides y triterpenos. Asimismo, se purificaron los compuestos mayoritarios provenientes de fracciones derivadas de F2 (F2-1, F2-4 y F2-6) y por medio de experimentos de resonancia magnética estructural (RMN) se elucidaron las estructuras del alcano Dodecano (C1) y del triterpeno Friedelina (C2) y el esteroide β -Sitosterol (C3). Se sugiere que la presencia de este triterpeno junto con otros y núcleos esteroidales, ácidos grasos e hidrocarburos detectados por GC-MS, tendrían incidencia en el potencial alelopático que presenta el roble andino colombiano sobre la inhibición de la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo de las semillas de lechuga. Estos resultados abren la posibilidad de plantear la estandarización de muestras derivadas del roble andino como potencial producto natural bioherbicida.

Palabras clave: Alelopatía, bioherbicida, *Quercus humboldtii*, Friedelina, triterpenos.

Characterization of the phytochemical nature and allelopathic activity of natural extracts of the Colombian Andean oak *Quercus humboldtii* as a potential bioherbicide

Abstract

In the last decades, human beings have seen the need to maintain a constant growing agricultural production system due to a population that already exceeds 8 billion inhabitants. To achieve this, since the 1970s, synthetic agrochemicals have been used, essentially for soil fertilization and in weed control. However, a link between the use of these synthetic chemical agents and damage to the environment together with incidences of human diseases, has been reported. This phenomenon, added to the fact that synthetic agrochemicals are derived from petroleum, and that by the year 2050 humanity expects to detach from their use, raises the need to seek innovative alternatives with low environmental impact that allow maintaining a productive and sustainable agricultural system. Thus, in megadiverse regions, the use of botanical species with allelopathic potential can be a viable alternative, both economically and biologically, since it adds value to the selected species and reduces the environmental impact generated by synthetic agrochemicals. With the previously mentioned, the present study evaluated the phytotoxic potential of ethanol-soluble extracts of the most abundant species collected in 11 study plots set in remnants of Andean forests in Antioquia, through phytotoxicity tests on lettuce seeds (*Lactuca sativa*). Extracts from the Colombian Andean oak, *Quercus humboldtii* were selected for further work due to the promising inhibitory activity of lettuce seed germination

(>80%), and radicle and hypocotyl elongation at a concentration of 500 mg*L⁻¹. In addition, having oak samples collected in two sites with differences in altitude (Belmira and Anori), comparisons were carried out by additional bioassays and by liquid chromatography (HPLC), to determine the possible incidence of environmental factors in the bioactivity and chemical composition. Even though neither significant differences were found in the bioactivity, nor major changes were evidenced in their chromatographic profile, the extract derived from the sample collected in the Belmira paramo was selected for further work, since it presented a slightly tendency to have better phytotoxicity index and was more available. In this way, the half maximum inhibitory concentration (IC₅₀) was determined at 198 mg*L⁻¹ evidencing a phytotoxic potential, affecting the seed germination and radicle elongation. In the bioassay-guided fractionation, 4 initial fractions were obtained, namely F1, F2, F3 and F4. Additionally, 1 white solid was precipitated from fraction F2, labelled as F2-P. After biological evaluation of all fractions, F2 and F3 evidenced the best results in the inhibition of seed germination. These two fractions were not pooled together since its chromatographic profile, followed by TLC (thin layer chromatography), was different. Finally, fraction F2 was selected for chemical characterization due to its better inhibitory potential inhibiting seed germination at different concentrations and a greater affectation in the radicle and hypocotyl elongation of the lettuce seedlings. After fractionating F2, 23 pooled fractions were obtained, from which F2-P, F2-2, F2-3, F2-8, F2-9 and F2-10 were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), detecting mainly fatty acids, steroids and triterpenes. Likewise, purification of major compounds was achieved from fractions derived from F2 (F2-1, F2-4 y F2-6), which were elucidated by nuclear magnetic resonance (NMR) experiments as an alkane Dodecane (C1), the triterpene Friedeline (C2) and the steroid β-Sitosterol (C3). The presence of this triterpene, along with others, and steroidal compounds, fatty acids and hidrocarbons detected through GC-MS, could support the allelopathic potential of the Colombian Andean oak in the inhibition of germination and radicle and hypocotyl elongation. These results open the possibility to formulate the standardization of samples derived from the Andean oak as a potential bioherbicidal product.

Keywords: Allelopathy, bioherbicide, *Quercus humboldtii*, Friedelin, triterpenes

Contenido

	Pág.
Resumen general	IX
Abstract.....	XI
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de símbolos y abreviaturas	XVIII
Introducción general	1
Objetivos.....	5
Metodología general.....	6
1. Capítulo 1.....	9
1.1 Resumen.....	9
1.2 Abstract.....	10
1.3 Introducción.....	10
1.4 Metodología	13
1.4.1 Colección y tratamiento del material vegetal.....	13
1.4.1.2 Obtención de extractos etanólicos de las especies de remanentes de bosques antioqueños	14
1.4.2 Actividad biológica	14
1.4.2.1 Evaluación del potencial alelopático de extractos crudos en semillas de lechuga <i>Lactuca sativa</i>	14
1.4.3 Análisis estadístico	15
1.4.4 Análisis por cromatografía líquida de los extractos seleccionados	15
1.5 Resultados	16
1.5.1 Actividad alelopática de las especies más abundantes de remanentes de bosques antioqueños	16
1.5.2 Comparación biológica y química de <i>Q. humboldtii</i> con origen en dos sitios biogeográficos diferentes.	21
1.6 Discusión	24
1.6.1 Análisis de la actividad alelopática.....	24
1.6.2 Selección de <i>Q. humboldtii</i> y comparación biológica y química de muestras con origen biogeográficos diferentes.	26
1.7 Conclusiones.....	28
1.8 Referencias	29

2. Capítulo 2	34
2.1 Resumen	34
2.2 Abstract	35
2.3 Introducción	35
2.4 Metodología	37
2.4.1 Dosificación del extracto de <i>Q. humboldtii</i>	37
2.4.2 Análisis estadístico de la evaluación biológica	37
2.4.3 Fraccionamiento biodirigido de <i>Q. humboldtii</i>	38
2.4.4 Caracterización de núcleos mayoritarios y elucidación de compuestos	39
2.4.4.1 Análisis de fracciones por GC-MS	39
2.4.4.2 Caracterización de compuestos aislados por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	39
2.5 Resultados	40
2.5.1 Concentración media inhibitoria y efectividad del extracto de <i>Q. humboldtii</i> ..	40
2.5.1.1 Fraccionamiento biodirigido	43
2.5.2 Caracterización de compuestos presentes en la fracción F2	49
2.5.2.1 Análisis de compuestos de la fracción F2 por GC-MS	49
2.5.2.2 Aislamiento y elucidación estructural de compuestos purificados de F2 ..	55
2.6 Discusión	58
2.6.1 Dosificación del extracto de <i>Q. humboldtii</i>	58
2.6.2 Fraccionamiento biodirigido	60
2.6.3 Núcleos y compuestos presentes en la fracción activa F2	61
2.7 Conclusiones	64
2.8 Referencias	65
3. Conclusiones y recomendaciones	71
3.1 Conclusiones	71
3.2 Recomendaciones	72
Bibliografía	73

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 Metodología de trabajo desarrollada desde el tamizaje de especies de remanentes de bosque andino hasta la caracterización del potencial biológico y fitoquímico de la especie más promisorio.	7
Figura 1.1. Análisis de la variación de los porcentajes de inhibición de la germinación de semillas de las especies por sitios de colección. CN: control negativo, CP: control positivo	20
Figura 1.2 Distribución de las frecuencias de los porcentajes de inhibición de la germinación de semillas por los extractos evaluados.	21
Figura 1.3 ANOVA del número de semillas germinadas frente a los extractos de <i>Quercus humboldtii</i> colectados en Anorí (An) y Belmira (Bel) desde de 50-500 mg*L ⁻¹ en comparación con el control negativo (C-neg) y Control positivo (C-pos). Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).	22
Figura 1.4 ANOVA de las mediciones de la longitud de las radículas y los hipocótilos de las semillas germinadas frente a los extractos de <i>Quercus humboldtii</i> colectados en Anorí (AN10) y Belmira (B8) a 500 mg*L ⁻¹ . Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).	23
Figura 1.5 Perfiles cromatográficos por medio de HPLC de extractos etanólicos de <i>Q. humboldtii</i> colectado en Anorí (An10) y Belmira (B8).	23
Figura 2.1 Comparación entre el porcentaje de inhibición entre el extracto de <i>Q. humboldtii</i> (B8) y CP a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L ⁻¹ . Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo.	40
Figura 2.2 Comparación de los valores de elongación de la radícula de las semillas de lechuga germinadas a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L ⁻¹ del extracto de <i>Q. humboldtii</i> (B8) y CP. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo.	41
Figura 2.3 Comparación de los valores de elongación del hipocótilo de las semillas de lechuga germinadas a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L ⁻¹ del extracto de <i>Q. humboldtii</i> (B8) y CP. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo.	41

Figura 2.4 Grafica comparativa para la estimación de la dosis letal media (IC ₅₀). Se utilizaron valores de concentración entre los 50 y los 10000 mg*L ⁻¹	42
Figura 2.5 Fraccionamiento biodirigido del extracto de <i>Q. humboldtii</i>	44
Figura 2.6 Comparación del potencial de inhibición de la germinación de semillas a 500 mg*L ⁻¹ de las fracciones F1-F4 de <i>Q. humboldtii</i> . Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo	45
Figura 2.7 Comparación del porcentaje de inhibición de las fracciones F2 y F3 derivadas de <i>Q. humboldtii</i> con dosificación del control positivo (CP) a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L ⁻¹ . Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo	46
Figura 2.8 Comparación mediante CCF de la fracción F2 y F3. El sistema de elución hexano: acetato de etilo 4.5:0.5 ml. a-) Imagen a luz UV de 235 nm; b-) Imagen a luz UV 312 nm; c-) Imagen a luz visible utilizando revelador universal.	46
Figura 2.9 Comparación de la inhibición de la elongación de la radícula de semillas de lechuga por parte de las fracciones F2 y F3 derivadas de <i>Q. humboldtii</i> a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L ⁻¹ . Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo	47
Figura 2.10 Comparación de la inhibición de la elongación del hipocótilo de semillas de lechuga por parte de las fracciones F2 y F3 derivadas de <i>Q. humboldtii</i> a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L ⁻¹ . Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo	47
Figura 2.11 Cromatograma del precipitado (F2-P) obtenido de la fracción F2.	49
Figura 2.12 Esteroides y triterpenos detectados por GC-MS en las fracciones derivadas de F2 de <i>Q. humboldtii</i>	55
Figura 2.13 Estructura del compuesto C1 (dodecano), asilado de la fracción F2 de <i>Q. humboldtii</i>	56
Figura 2.14 Acercamiento del espectro de ¹ H RMN del compuesto C2	56
Figura 2.15 Espectro de ¹³ C RMN y Dept-135 del compuesto C2 con asignaciones de los carbonos	57
Figura 2.16 Estructura del compuesto C2 (Friedelina), asilado de la fracción F2 de <i>Q. humboldtii</i>	57
Figura 2.17 Estructura del compuesto C3 (β -Sitosterol), asilado de la fracción F2 de <i>Q. humboldtii</i>	58

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1.1 Especies colectadas por cada sitio biogeográfico y porcentaje de inhibición de germinación de los extractos etanólicos sobre semillas de lechuga.	16
Tabla 2.1 Sistema de solventes a gradiente y fracciones obtenidas del fraccionamiento inicial del extracto crudo de <i>Q. humboldtii</i> proveniente de Belmira (B8)	45
Tabla 2.2 Sistema solventes a gradiente y fracciones obtenidas en el fraccionamiento de la fracción proveniente del extracto natural inicial (B8) con mayor potencial alelopático (F2)	48
Tabla 2.3 Compuestos detectados por GC-MS en la fracción F2 de <i>Q. humboldtii</i>	50

Lista de símbolos y abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Término</i>
ADAP	Línea de análisis de datos automatizado (automated data analysis pipeline)
°C	Grados Celsius
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
^{13}C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Correlación espectroscópica (correlation spectroscopy)
DEPT	Mejora de las distorsiones por la transferencia de polarización (distortionless enhancement by polarization transfer)
EI	Ionización electrónica (Electronic ionization)
eV	Electronvoltio
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases (gas chromatography coupled to mass spectrometry)
GNPS	Red molecular global en productos naturales (Global natural products social molecular network)
1H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (high performance liquid chromatography)
NIST	Instituto nacional de estándares y tecnología (National institute of standards and technology)
HSQC	Coherencia cuántica simple heteronuclear (heteronuclear simple quantum coherence)
Hz	Hercios (Hertz)
J	Constante de Acoplamiento en Resonancia Magnética Nuclear
L	Litros
M^+	Ión Molecular en Espectrometría de Masas
MHz	Megahercios
min	Minutos
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención (Retention factor)
RMN	Resonancia magnética nuclear
UMA	Unidad masa atómica
δ	Desplazamiento químico en ppm

Introducción general

Para el año 2023 el planeta tierra registró una población de más de ocho mil millones de seres humanos (United Nations 2023). Esta cifra está ligada a un sistema agropecuario que ha estado en constante crecimiento desde la segunda mitad del siglo XX y que ha permitido la producción sistemática de alimentos mediado el uso de agroquímicos de síntesis (von der Goltz et al., 2020). Estos agentes químicos permiten la fertilización de suelos de manera que las plantas puedan asimilar fácilmente ciertos nutrientes para la obtención de una mayor cantidad de biomasa por hectárea, así como el control sistemático de especies no deseadas en cultivos de consumo (von der Goltz et al., 2020). A este sistema se le ha denominado revolución verde y consiste en una serie de técnicas agronómicas donde se estipulan los lineamientos fisicoquímicos para una explotación intensiva del suelo (Cordeau et al., 2016). Estas prácticas han permitido el incremento en la producción de granos y forrajes, así como el aumento paulatino del sector ganadero (Boudebouz et al., 2022)

Este crecimiento se ha visto fuertemente relacionado a los cambios conformacionales del medio ambiente (Gandhi et al., 2021; Kass et al., 2020; Wijewardene et al., 2021; C. Yang et al., 2021). Uno de estos casos es el que presentan algunas especies forestales (Berhanu et al., 2023), en donde se observa cómo ha variado su presencia en ciertas zonas debido al cambio climático, esto debido a la adaptabilidad al medio, a migraciones hacia zonas más altas buscando bajas temperaturas, entre otras (Berhanu et al., 2023). En este sentido, algunos ecosistemas como el bosque húmedo tropical se han visto perjudicado por la intervención del ser humano producto de la transformación del suelo para cultivo así como para la ganadería intensiva (Vanegas-Cubillos et al., 2022). Esto hace que se observen acumulaciones de agroquímicos de síntesis en la cadena trófica, pérdida de especies endémicas tanto macroscópicas como microscópicas y una afectación a la salud humana debido a la aparición de enfermedades crónicas probablemente relacionadas a los efectos secundarios de los productos usados en estas prácticas (Boudebouz et al., 2022; Ingaramo et al., 2020; C. Yang et al., 2021).

Por otro lado, los productos agroquímicos de síntesis son derivados de la industria petrolera (Valbuena et al., 2021). Para el año 2050 se prevé una escasez en la obtención de petróleo, lo que conllevaría a un déficit productivo en el sector alimentario debido a la disminución de insumos para la producción de alimentos, así como una parálisis en el sector logístico que depende de dicho suministro (United Nations 2023), esto quedó evidenciado en el año 2020 debido a la pandemia del SARS-Cov II así como en el año 2022 tras el inicio de la guerra entre Ucrania y Rusia, donde la dependencia del uso del petróleo y sus derivados fue evidente debido al alza en los precios de fertilizantes (FAO 2023).

Debido a esto, se ha optado por buscar soluciones a mediano y largo plazo en la agroecología y la farmacognosia (Radhakrishnan et al., 2018). Estas disciplinas se encargan de estudiar las interacciones naturales que presentan ciertas especies en nichos determinados, donde se plantea el uso de otras especies como control biológico para mantener el equilibrio ecosistémico, junto a la utilización de compuestos químicos provenientes de especies macro y microscópicas que puedan ser aprovechadas en beneficio del ser humano, disminuyendo así el impacto medio ambiental producto de la utilización de derivados del petróleo (Cordeau et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2018).

El mundo afronta estas problemáticas en dos perspectivas marcadas, los países que cuentan con desarrollo tecnológico apuestan por un cambio paulatino a los sistemas ambientalmente sostenibles que permitan reducir la dependencia del petróleo y sus derivados promulgando leyes de veto a ciertos productos de consumo intensivo. En contraparte los países en vías de desarrollo ven como desde el 2016 el consumo de productos derivados del petróleo ha experimentado un incremento significativo debido a temas económicos y políticos (Valbuena et al., 2021) .

Un caso particular es el de Colombia, que debido a su vocación agrícola y pecuaria se ve en la necesidad de mantener el uso de agroquímicos de síntesis para sostener la competitividad de sus productos (Valbuena et al., 2021). En estos casos se ha observado que en el sector lácteo se ha venido presentado hace más de una década la acumulación de agroquímicos sintéticos que pueden perjudicar la salud del ser humano a mediano y largo plazo (Boudebouz et al., 2022; Kass et al., 2020; Ren et al., 2020). Es también de destacar, que producto del conflicto armado interno, Colombia centra sus importaciones de pesticidas en compuestos organoclorados y órgano fosforados para la erradicación de cultivos que derivan en sustancias psicotrópicas como lo es el cultivo de hoja de coca que para 2021 se reportó en una extensión de más de 300 mil hectáreas (Benner et al., 2016;

Helander et al., 2012; MinJusticia 2023, Valbuena et al., 2021). Este consumo de agroquímicos, sumado a actividades como la ganadería extensiva y la minería legal e ilegal, han facilitado las transformaciones ecosistémicas del territorio, haciendo que se generen cambios en la cobertura de los bosques en zonas montañosas, así como un aumento considerable en los casos de enfermedades crónicas en comunidades cercanas a las zonas de cultivos ilícitos donde se utiliza la técnica de aspersión aérea como método de irrigación (Murillo-Sandoval et al., 2021; Vanegas-Cubillos et al., 2022).

Esta antesala consolida la necesidad por parte del ser humano de encontrar soluciones a la dependencia de los productos agroquímicos derivados del petróleo, para ello se ha optado a nivel internacional por estudiar los potenciales alelopáticos de algunos productos químicos derivados del metabolismo primario o secundario de especies macro y microscópicas que generen algún tipo de dominancia en ciertos ecosistemas (Abd-ElGawad et al., 2020; Chaïb et al., 2021; Reichert Júnior et al., 2019). Esta premisa busca encontrar las interacciones naturales que puedan llegar a presentar dos o más especies entre sí, generando efectos de mayor especificidad con compuestos químicos de bajo impacto ambiental debido a su baja vida media y a su baja concentración (Radhakrishnan et al., 2018). Con ello se busca manejar una diversificación de estructuras químicas que permita disminuir el consumo de derivados del petróleo. Se han reportado usos de aceites esenciales de plantas; extractos crudos de tallos, hojas, raíces y corteza de algunos árboles maderables, así como la extracción de compuestos provenientes de especies marinas, o algunas especies microscópicas como hongos y bacterias (Choudhary et al., 2023). En este orden de ideas, Colombia al ser un país megadiverso rico en especies endémicas, podría ofrecer un potencial bioquímico importante en aras de reducir su dependencia de sustancias agroquímicas derivadas del petróleo. Caso de este potencial podría ser el roble andino colombiano *Quercus humboldtii* una especie del género *Quercus* ampliamente utilizado en el mundo en el sector maderero y alimentario debido a la dureza de su madera y a su alta producción de compuestos antioxidantes como isoprenoides, taninos y flavonoides (García-Villalba et al., 2017; Morales, 2021; Socaciu et al., 2023). La importancia del roble andino colombiano radica en que es una especie de alturas que solo crece en los andes colombianos y que ha sido poco estudiada referente a diversas actividades biológicas.

Teniendo en cuenta el contexto presentado, este proyecto buscó estudiar el potencial alelopático que pueden presentar los extractos naturales provenientes de algunas especies dominantes de remanentes de bosques andinos de Antioquia, esperando

identificar especies con actividad promisorio como potencial bioherbicida. De esta manera se seleccionó el *Q humboldtii* para la caracterización de su potencial alelopático, así como realización un estudio de la química de los núcleos y compuestos mayoritarios que posiblemente puedan aportar explicaciones a dicho potencial promisorio como bioherbicida..

Objetivos

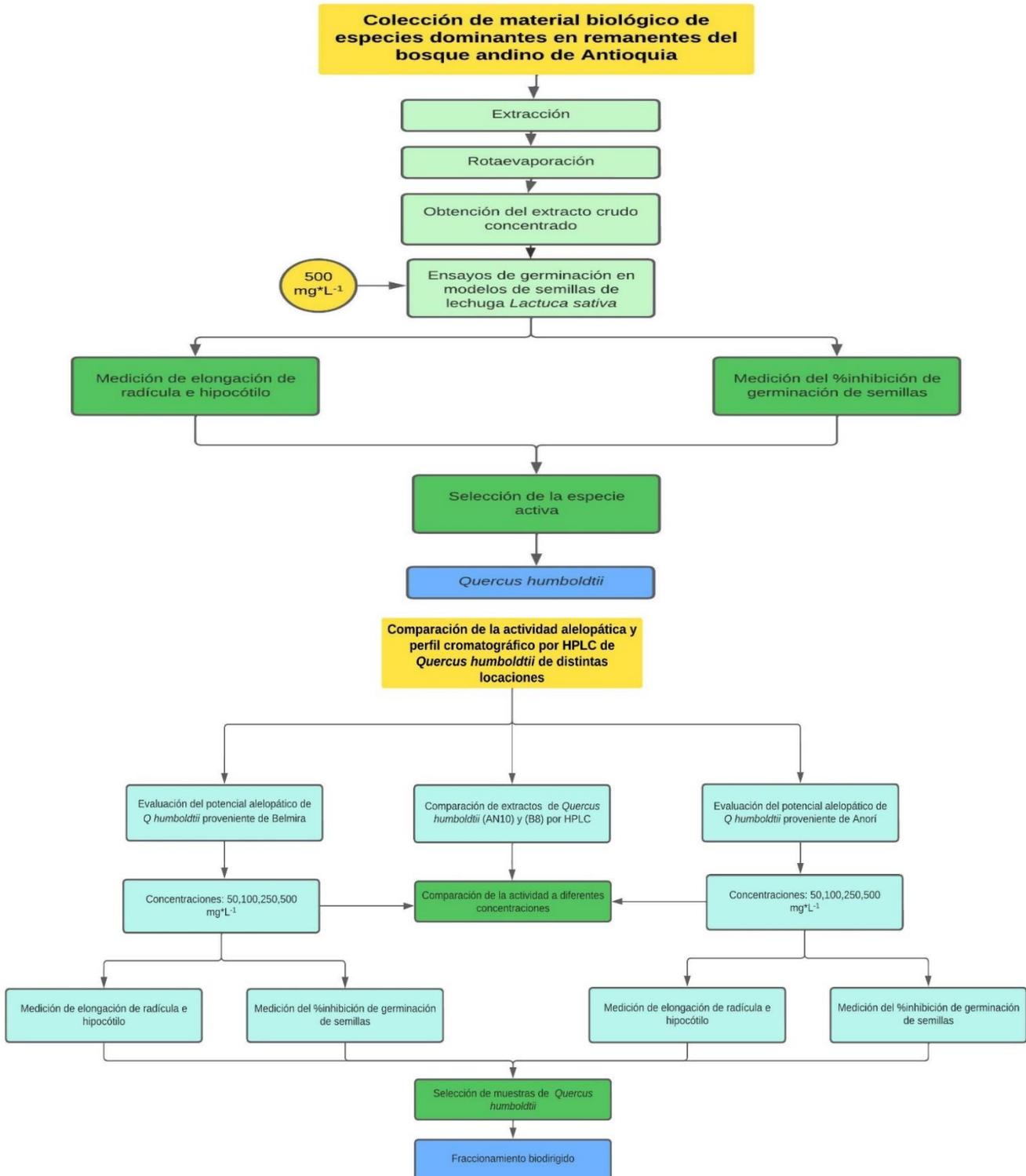
Objetivo general

Caracterizar el potencial bioactivo y fitoquímico del extracto natural proveniente de *Quercus humboldtii* roble andino colombiano.

Objetivos específicos

- Caracterizar el potencial alelopático del extracto crudo de *Quercus humboldtii* a partir de hojas y tallos.
- Estudiar la fitoquímica de fraccionamientos biodirigidos del extracto crudo para determinar la naturaleza probable de las familias de compuestos más prometedores con potencial bioherbicida.
- Caracterizar las familias de compuestos presentes en la fracción bioactiva más promisoría mediante técnicas instrumentales.

Metodología general



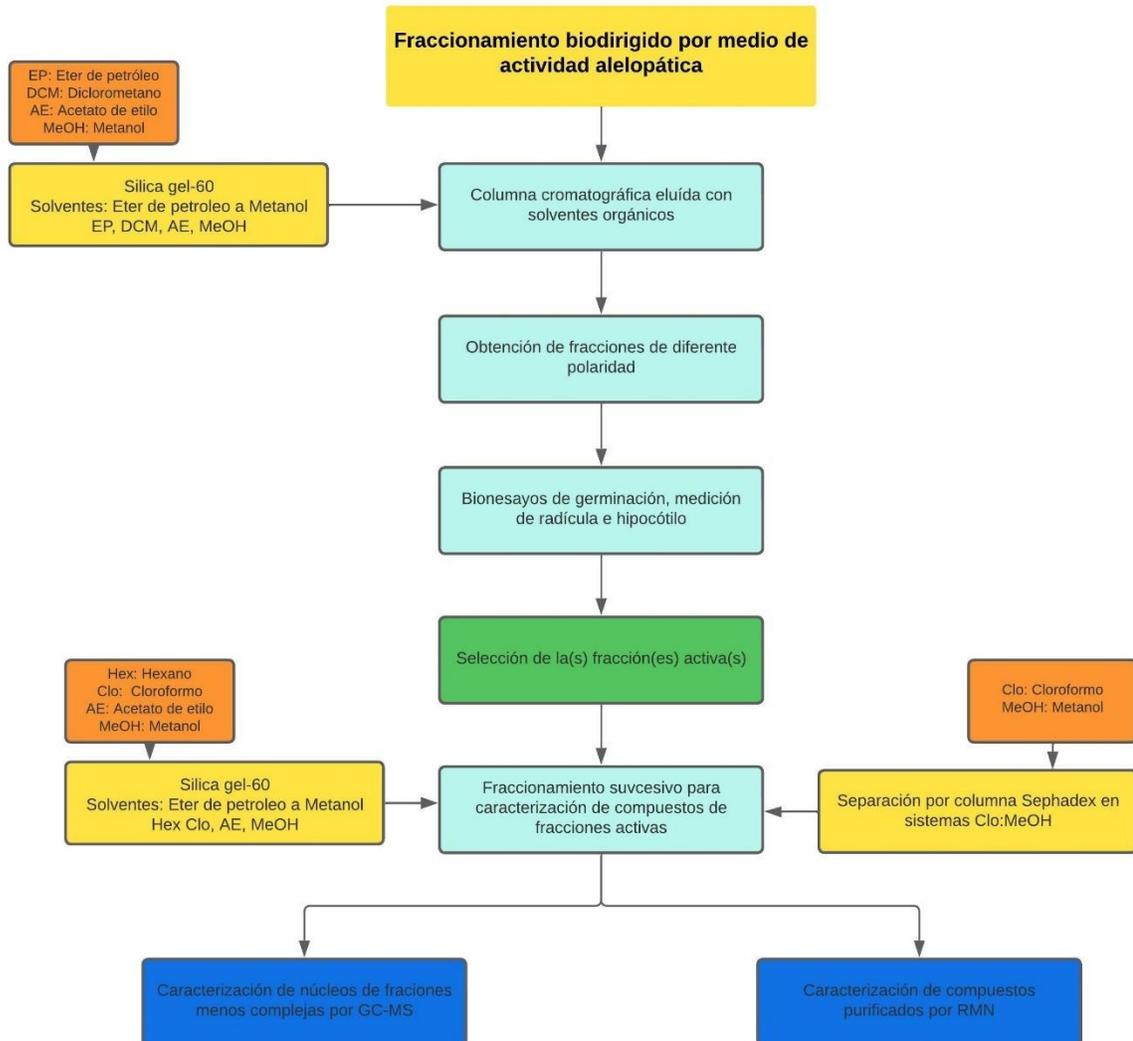


Figura 1 Metodología de trabajo desarrollada desde el tamizaje de especies de remanentes de bosque andino hasta la caracterización del potencial biológico y fitoquímico de la especie más promisoría.

1. Capítulo 1

Caracterización del potencial alelopático de especies endémicas del bosque andino antioqueño.

1.1 Resumen

En las últimas décadas el ser humano se ha visto en la necesidad de mantener la productividad del sector agropecuario desligándose paulatinamente del petróleo y sus derivados que han sido pieza fundamental de dicho desarrollo. Los agroquímicos de síntesis que juegan un papel indispensable en dicha cadena productiva han visto como en las últimas décadas su uso se vuelve cada vez más restringido debido al alto grado de peligrosidad para el ser humano y el medio ambiente. Como medida alternativa a estos productos, la agroecología y la farmacognosia han propuesto la utilización de estructuras químicas provenientes de la interacción entre especies macro y microscópicas que permitan así reducir el impacto ambiental generado por los agroquímicos sintéticos convencionales. En este orden de ideas la búsqueda de especies con potencial alelopático toma una gran importancia debido a que se trata de encontrar una interacción inter específica de la cual poder obtener estructuras químicas de bajo impacto medio ambiental generando usos sostenibles de especies endémicas. En la presente investigación se caracterizó el potencial alelopático de las especies con mayor abundancia de remanentes del bosque andino antioqueño, dando como resultado la selección del extracto crudo del roble andino colombiano *Quercus humboldtii* como potencial agente bioherbicida, exhibiendo una actividad inhibitoria en la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) mayor al 80% a una concentración de 500 mg*L⁻¹. A su vez la comparación de extractos crudos de la misma especie de dos locaciones distintas revela que presentan similitudes en su potencia bioactivo, siendo levemente más activo el extracto proveniente de una zona de páramo comparado con su homónimo de altitud media, esto deja entrever que el potencial bioactivo del roble esté ligado a la especie y no a una respuesta medio ambiental lo que puede situar al *Q. humboldtii* como una potencial fuente de metabolitos secundarios como potenciales agentes bioherbicidas.

1.2 Abstract

In recent decades, human beings have been in need to maintain the productivity of agriculture, gradually disassociating themselves from oil and its derivatives, which have been a fundamental part of development. Synthetic agrochemicals that play an essential role in this productive chain have seen how in recent decades their use has become increasingly restricted due to their high degree of danger to humans and the environment. As an alternative measure to these products, agroecology and pharmacognosy have proposed the use of chemical structures resulting from the interaction between macroscopic and microscopic species that thus allow reducing the environmental impact generated by conventional synthetic agrochemicals. In this way, the search for species with allelopathic potential gains significant importance because it is about finding an interspecific interaction from which to obtain chemical structures with low environmental impact, generating sustainable uses of endemic species. In the present investigation, the allelopathic potential of the species with the greatest abundance of remnants of the Antioquia Andean Forest was characterized, resulting in the selection of the crude extract of the Colombian Andean oak *Quercus humboldtii* as a potential bioherbicidal agent, affecting germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa*), exhibiting an inhibitory activity greater than 80% at a concentration of 500 mg*L⁻¹. Additionally, the comparison of crude extracts of the same species from two different locations reveals that they present similarities in their bioactive potency, the extract from the paramo area being slightly more active compared to the same species growing at medium altitude. This suggests that the potential oak bioactive is linked to the species and not to an environmental response, which can place *Q. humboldtii* as a potential source of secondary metabolites as potential bioherbicidal agents.

1.3 Introducción

En los últimos años el uso intensivo de productos agroquímicos derivados del petróleo ha marcado la forma de producción de alimentos en el mundo (von der Goltz et al., 2020). La FAO estima que desde los años noventa hasta la primera década de los dos mil un aumento del 50% en la producción de agroquímicos, dejando una cifra de 1.1 millones de toneladas comercializadas solo en el continente americano (FAO, 2022). Las técnicas derivadas de la revolución verde como es conocida, han facilitado a productores de materias primas las herramientas suficientes para aumentar la producción por hectárea de biomasa de cultivos puros destinados al consumo (von der Goltz et al., 2020). Adicional a esto, dichas materias primas son destinadas no solo a la alimentación humana sino que son utilizadas para la alimentación de especies animales de consumo como lo son, aves, porcinos, bovinos entre otros, que forman parte de la red trófica del ser humano (Boudebbouz et al., 2022). Para comienzos de año 2023 el planeta tierra superó los ocho mil millones de seres humanos (United Nations 2023), esto junto a la necesidad de alimentación para dichas personas plantea un reto al sistema agropecuario mundial, que se ve reflejado en el incremento sostenido de producción de granos, frutas y hortalizas así como cárnicos y derivados (Brief, 2022).

Estas sustancias sintéticas se caracterizan por su facilidad de producción que depende de derivados de la industria petrolera (Valbuena et al., 2021), su rapidez de acción en las diferentes especies objetivo los han posicionado como parte fundamental de la producción agrícola global. En el caso del glifosato, su baja especificidad puede controlar un gran número de especies de arvenses (Riaño et al., 2020). Estas características han logrado mantener la producción sostenida de alimentos que en el caso de algunos productos de consumo diario del ser humano se estimó una producción mundial de cereales de más de 2815 millones de toneladas solo en 2022 (FAO 2023), así como un crecimiento del 1,1% desde el 2021 respecto a frutas y hortalizas, producción de cárnicos (Brief, 2022). Este índice de producción permite dimensionar la necesidad y dependencia que se tiene a estas sustancias químicas.

Por otro lado, para el año 2030 la Unión Europea espera tener sistemas productivos no dependientes del petróleo y algunos de sus derivados (Comisión Europea 2023). Con ello busca disminuir el impacto medio ambiental de la liberación de material particulado a la atmósfera, acumulación de gases de efecto invernadero, así como el uso de polímeros recalcitrantes, entre ellos los micro plásticos y los agroquímicos de síntesis (Comisión Europea 2023). Sin embargo, la pandemia del SARS-Cov-II del año 2020, y la guerra entre Rusia y Ucrania iniciada en el año 2022 han mostrado la dependencia que aún mantiene el ser humano con respecto al petróleo y sus derivados, ejemplo de ello han sido las alzas en el precio de los combustibles y fertilizantes a nivel global, que a su vez encarecen los productos agrícolas y generan una crisis alimentaria y económica que ha afectado a los países en vías de desarrollo (FAO 2023). Adicionalmente, la importación y exportación global de agroquímicos de síntesis se mantiene en aumento a una tasa de aproximadamente 1,2% (FAO 2022).

Así mismo, la dependencia de dichos agentes agroquímicos ha evidenciado el surgimiento y crecimiento paulatino de enfermedades crónicas para el ser humano. Aumentos en los casos de cáncer y diabetes en seres humanos (Avelar Amado et al., 2020; Kass et al., 2020; C. Yang et al., 2021) y la posible malformación de fetos en animales (C. Yang et al., 2021). Además de daños en el medio ambiente, como pérdida considerable de insectos polinizadores, contaminación de suelos y cuerpos acuíferos y afectación de especies endémicas en zonas de aplicación, han sido uno de los factores determinantes para que se tomen consideraciones sobre el uso de algunos agentes agroquímicos, como los organoclorados, fosforados y azufrados, que para 2019 han sido vetados de gran parte de los países del continente europeo y Estados Unidos (Valbuena et al., 2021). Sin embargo, no es el caso de los países en vías de desarrollo que ven las leyes de veto como una oportunidad de adquirir tecnologías a bajos costos, con serias consecuencias ambientales (Valbuena et al., 2021).

Países como Brasil y Colombia se han visto afectados por el uso de estos agroquímicos debido a su vocación agropecuaria (Murillo-Sandoval et al., 2021; Van den Berg et al., 2022), la ganadería intensiva contribuye a la deforestación en beneficio de la obtención de terrenos aptos para el pastoreo intensivo, dependientes de fertilización artificial para la obtención de biomasa en beneficio del ganado bovino, los cuales son productores de gas metano, contribuyente directo del efecto invernadero en el planeta. En el caso específico de Colombia, el consumo por importaciones de herbicidas se ha visto en auge desde el año 2016 (Valbuena

et al., 2021), esto debido al incremento de la deforestación de zonas boscosas para la intensificación de actividades agropecuarias y mineras, como también en el marco de conflicto armado interno para la erradicación de cultivos ilícitos como los cultivos de hoja de coca y marihuana (Murillo-Sandoval et al., 2021). Esto hace que se vea una afectación notable en los ecosistemas de bosque húmedo tropical que ha experimentado cambios sustanciales en el paisaje y la distribución de especies por el territorio (Calle & Holl, 2019). Por otro lado, la afectación a la salud humana se ha convertido en una problemática en crecimiento, debido a que la aplicación de estos agroquímicos en algunas ocasiones se hace por aspersión aérea (Benner et al., 2016) generando aerosoles que pueden viajar a través de las corrientes de aire, teniendo alcances sobre especies no objetivo y el ser humano. Para el año 2018 se llegaron a reportar la presencia de agentes organoclorados de alta peligrosidad en el área metropolitana del valle del Aburrá más precisamente en la ciudad de Medellín (Avila et al., 2022).

Ante estas problemáticas, han surgido áreas de estudio e investigación como la agroecología y la farmacognosia (Avelar Amado et al., 2020; Radhakrishnan et al., 2018), estas ramas de las ciencias naturales buscan estudiar las interacciones que se presentan entre diversos organismos en un mismo ecosistema, así como el efecto al desarrollo celular de una sustancia química proveniente del metabolismo primario o secundario de un organismo macroscópico o microscópico sobre otro. A estos efectos se les conoce como potenciales alelopáticos y se han convertido en una ventana para reconocer estructuras químicas o grupos funcionales de dichas estructuras con un gran potencial de control biológico de una gran diversidad de especies (Cordeau et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2018). El control biológico como se le conoce, ejerce en la última década un impacto enorme en el estudio de sustancias de bajo impacto medio ambiental como posibles sustitutos de derivados del petróleo (Khursheed et al., 2022a). El uso de aceites esenciales de plantas como herbicidas, fungicidas o insecticidas, así como el uso de metabolitos secundarios de especies marinas, micotoxinas y otras especies han planteado un interés en la ciencia moderna por caracterizar los potenciales bioactivos de ciertas biomoléculas de cara a la formación de una alternativa sólida y sostenible ante la inminente desaparición del petróleo, que se espera sea para la década del 2050 (Khursheed et al., 2022a).

En este orden de ideas y tomando en cuenta que Colombia es considerado un país megadiverso, la potencialidad bioactiva de sus especies endémicas podría permitir la elucidación de una gran cantidad de compuestos bioactivos que faciliten una transición viable y sostenible de agentes derivados del petróleo a nuevas tecnologías. Tomando en cuenta la biodiversidad y la falta de estudios de especies arbóreas creciendo en remanentes de bosques andinos, en el presente trabajo se planteó como objetivo el evaluar el potencial alelopático de las especies forestales más abundantes colectadas en once locaciones distintas del bosque andino de la zona de Antioquia con el fin de reconocer especies endémicas con potenciales alelopáticos como posibles bioherbicidas.

1.4 Metodología

1.4.1 Colección y tratamiento del material vegetal

1.4.1.1 Colección del material vegetal

Las especies seleccionadas para este trabajo fueron priorizadas por su abundancia después de establecer varias parcelas permanentes de monitoreo de una hectárea, en diferentes pisos térmicos en remanentes de bosques andinos de Antioquia. Para determinar el criterio de colección en cuanto a la abundancia, nos apoyamos en trabajos previos del grupo de investigación y el macroproyecto donde se enmarca este estudio (Peña et al., 2018). La abundancia se definió como especies con mayor número de individuos por parcela. Se colectó material biológico en la zona del páramo de Belmira 6°61'N 75°65'O, que presenta una altitud media de 2928 m.s.n.m., una temperatura media de 12,8 °C y una precipitación anual de 2195 mm; el municipio de Maceo 6.33 N 74.47 O con una altitud media de 950 m.s.n.m., una temperatura media de 23,4 °C y una precipitación anual de 2701 mm; el municipio de Angelópolis 6.06 N 75.42 O, con una altura media de 2027 m.s.n.m., una temperatura media de 21 °C y una precipitación media de 240 mm; el municipio de Puerto Triunfo 5.52 N 74.36 O, con una altitud media de 150 m.s.n.m., una temperatura media de 28 °C y una precipitación media de 180 mm; el municipio de Anorí 7.04N 75.08 O, con una altitud media de 1740 m.s.n.m., una temperatura media de 15,1 °C y una precipitación media de 3057 mm; el corregimiento de Porce 6.33 N 75.9°, con una altitud media de 1800 m.s.n.m., temperatura media de 17 °C y una precipitación media de 300 mm; el municipio de Caicedo 6.24 N 75.59 O, con una altitud media de 1820 m.s.n.m., temperatura media de 22 °C y una precipitación media de 2092 mm; el municipio de Carepa 7.45 N 76.39 O, con una altitud media de 28 m.s.n.m., una temperatura media de 26 °C y una precipitación media de 200 mm; el municipio de Jardín 5.35 N 75.49 O, con una altitud media de 1750 m.s.n.m., una temperatura media de 13,9 °C y una precipitación media de 5557 mm; el Alto de Ventanas 7.07 N 75.46 O, una altitud de 2031 m.s.n.m., una temperatura media 18.2 °C y una precipitación media de 84.41 mm; el municipio de Támesis 5.38 N 75.42 O, con una altitud media de 1638 m.s.n.m., una temperatura media de 20 °C y una precipitación media de 200 mm. Para continuar el trabajo, se colectó 1 kg de hojas y tallos de las especies más abundantes de cada sitio de colección (entre 8 a 11 especies por sitio), para su secado a temperatura ambiente. Del material vegetal se realizó una molienda en una trituradora de madera para obtener un triturado adecuado para la extracción. Para la confirmar la identidad de las muestras vegetales, se colectó una muestra de cada especie que fue llevado al herbario del Jardín Botánico de Medellín (JAUM), donde se depositó el voucher y fueron identificadas por el Dr. Álvaro Idárraga (Líder del Herbario Jardín Botánico de Medellín).

1.4.1.2 Obtención de extractos etanólicos de las especies de remanentes de bosques antioqueños

El material vegetal (hojas y tallos) fue secado a temperatura ambiente, molido y luego se pesó y se extrajo con etanol destilado (96%) por percolación (1L x 100g). Finalmente, el extracto se concentró por rotaevaporación a presión reducida y a temperaturas no mayores de 50°C. El extracto seco obtenido se almacenó en la oscuridad y a temperatura de -17°C mientras se realizaron los bioensayos.

1.4.2 Actividad biológica

1.4.2.1 Evaluación del potencial alelopático de extractos crudos en semillas de lechuga *Lactuca sativa*

En la determinación de la inhibición de la germinación se empleó el ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L, variedad Black seeded Simpson) descrito por Sobrero (2004), que consistió en evaluar los efectos fitotóxicos de extractos en proceso de germinación de semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento.

Para el ensayo, se situaron dentro de cajas de Petri de 100 x 15 mm, discos de papel de filtro (Whatman #2) saturados con 6 mL de soluciones acuosas de los extractos obtenidos a partir de cada planta, en una concentración de 500 mg*L⁻¹. En seguida, se ubicaron 25 semillas de lechuga sobre los discos de papel filtro, dejando espacio suficiente para que la germinación de las semillas. Para cada muestra evaluada se realizaron 4 repeticiones cada una con 25 semillas, usando como control negativo agua filtrada y como control positivo un herbicida comercial (Panzer®) a la misma concentración de los extractos. Cada caja de Petri se recubrió con papel vinipel para evitar pérdidas de humedad y se incubó durante 120 horas (5 días) en la oscuridad a una temperatura de 22 ± 2°C. Transcurrido el tiempo del análisis, se evaluaron los siguientes parámetros:

Porcentaje de germinación y porcentaje de inhibición, se contabilizó el número de semillas germinadas (con aparición visible de radícula aprox. 2 mm) a su vez se calculó su inverso como porcentaje de inhibición, el cual se obtuvo de acuerdo con las siguientes formulas:

$$\text{Porcentaje de germinacion} = \frac{\text{Semillas T con radícula}}{\text{Semillas control negativo}} * 100 \quad (1)$$

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Semillas T con radícula}}{\text{Semillas control negativo}}\right) * 100 \quad (2)$$

Donde Semillas T con radícula, es el número de semillas tratadas con extracto que germinaron, Semillas control negativo es el número total de semillas germinadas en las cajas del control negativo (solo agua filtrada).

Longitud de la radícula e hipocótilo: se midió la longitud de la radícula y el hipocótilo con un calibrador Vernier digital y se comparó con el control negativo para mirar los efectos de cada extracto sobre su elongación.

1.4.3 Análisis estadístico

Se usó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar si existían diferencias significativas de la actividad frente inhibición de germinación de semillas de lechuga, de todos los extractos evaluados a $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para esto se empleó el software R versión 4.3.1 (RCommander 2023).

Este análisis también se aplicó ANOVA para evaluar si había diferencias en el porcentaje de inhibición entre los extractos de *Q. humboldtii* colectados en Anorí (An) y Belmira (B), a concentraciones de 50, 100, 250 y $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, como también para comparar la longitud de la radícula y el hipocótilo de las semillas germinadas a $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para los extractos. En todos los análisis se evaluó la significancia a una probabilidad del 95% ($\alpha \leq 0,05$). En los casos en los que se presentó diferencias significativas, se usó la prueba de Tukey para definir e identificar los factores entre los cuales se daban dichas diferencias, se usó el software R versión 3.5.3 (R Core Team, 2019).

Se hizo un diagrama de barras para entender la distribución de las frecuencias en relación con el porcentaje de inhibición de la germinación semillas. Las clases o intervalos, representados por las barras, agrupan las especies con las que se obtuvo el mismo porcentaje de inhibición. La altura de las barras muestra la frecuencia de los valores de datos para cada una de las clases. En total se analizaron 108 especies colectadas en 11 sitios diferentes. Estos análisis estadísticos fueron realizados usando el software R versión 3.5.3 (R Core Team, 2019).

1.4.4 Análisis por cromatografía líquida de los extractos seleccionados

La comparación de los extractos seleccionados se realizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Sedio et al. 2021). Se usó un cromatógrafo Vanquish Horizon Duo de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, United States), con una columna Accucore C₁₈ de 150 mm longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 2.6 μm de tamaño de partícula. La fase móvil fue un buffer A (0.1% v/v de ácido fórmico en agua) y un buffer B (0.1% v/v ácido fórmico en metanol), combinándose en un gradiente del 5 - 100% de buffer B durante 18 min. Los archivos cromatográficos obtenidos en este análisis se procesaron en MZmine 2.

1.5 Resultados

1.5.1 Actividad alelopática de las especies más abundantes de remanentes de bosques antioqueños

En la Tabla 1.1 se compila la información de las muestras vegetales colectadas en 11 localidades diferentes, con 87 especies identificadas (11 muestras solo identificadas hasta el género), pertenecientes a 72 géneros dentro de 38 familias botánicas, resultando en un total de 105 extractos evaluados. En los resultados iniciales del efecto de los extractos etanólicos en la germinación de las semillas de lechuga resaltan 26 muestras con un porcentaje de inhibición mayor al 70%.

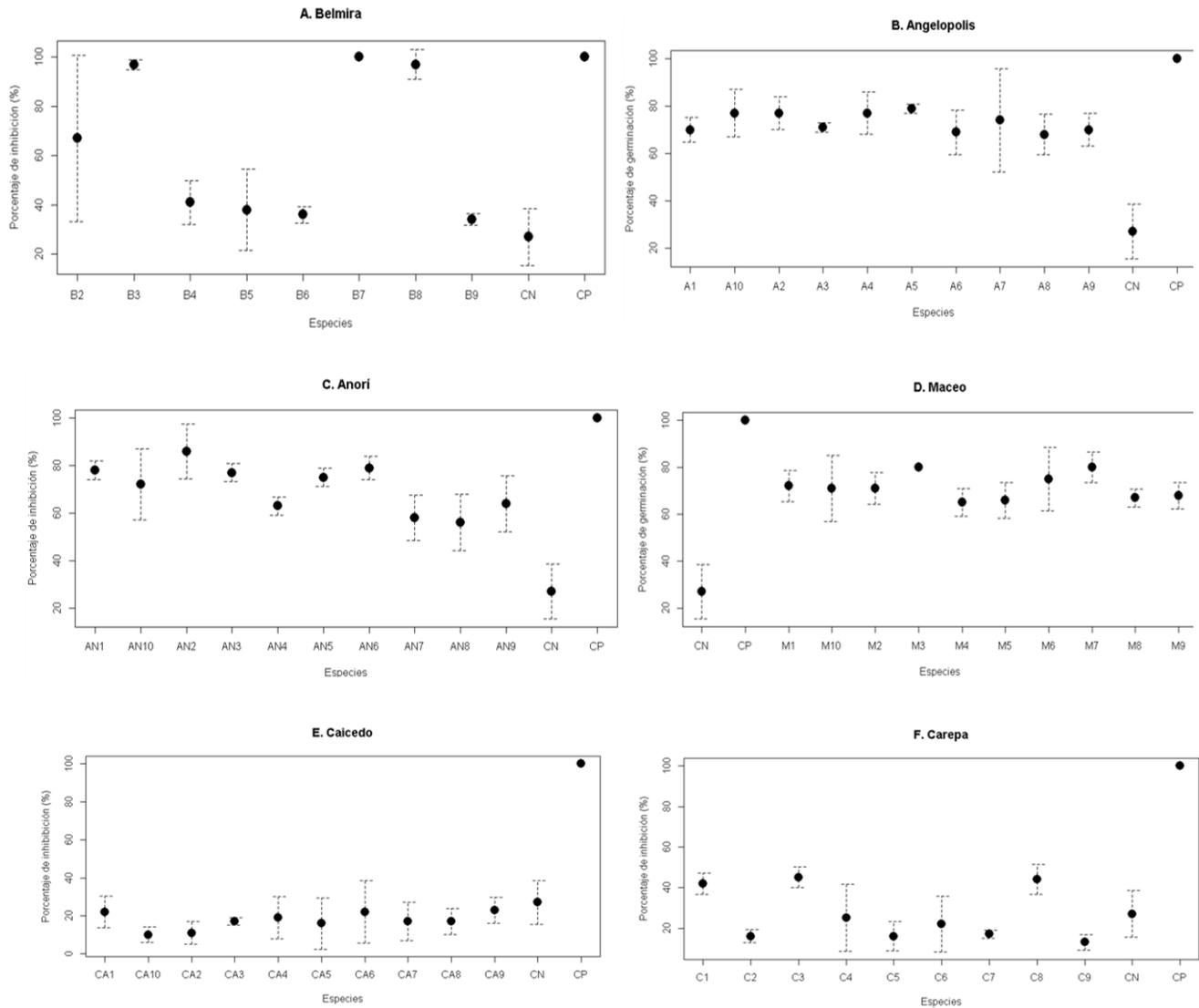
Tabla 1.1 Especies colectadas por cada sitio biogeográfico y porcentaje de inhibición de germinación de los extractos etanólicos sobre semillas de lechuga.

Sitio de colección	Código de muestra	Especies	Número de semillas germinadas	Porcentaje de inhibición (%)
Alto de Ventanas	V1	<i>Ruagea pubescens</i> H. Karst.	67	33
	V2	<i>Clethra fagifolia</i> Kunth	59	41
	V3	<i>Miconia poeppigii</i> Triana	76	24
	V4	<i>Vismia laevis</i> Triana & Planch.	78	22
	V5	<i>Elaeagia pastoensis</i> L.E. Mora	89	11
	V6	<i>Elaeagia karstenii</i> Standl.	87	13
	V7	<i>Alchornea coelophylla</i> Pax & K. Hoffm.	24	76
	V8	<i>Meriania</i> sp.	16	84
	V10	<i>Hieronyma duquei</i> Cuatrec.	27	73
Angelópolis	A1	<i>Allomaieta hirsuta</i> (Gleason) Lozano	30	70
	A2	<i>Palicourea angustifolia</i> Kunth	23	77
	A3	<i>Matudaea colombiana</i> Lozano	29	71
	A4	<i>Aphelandra scolnikiae</i> Leonard	23	77
	A5	<i>Croton smithianus</i> Croizat	21	79
	A6	<i>Piper albanense</i> Yunck.	31	69
	A7	<i>Palicourea guianensis</i> Aubl.	26	74
	A8	<i>Vismia macrophylla</i> Kunt	32	68
	A9	<i>Guettarda crispiflora</i> Vahl	30	70
Anorí	An1	<i>Dacryodes belemensis</i> Cuatrec.	22	78
	An2	<i>Cynometra bauhiniifolia</i> Benth.	14	86
	An3	<i>Virola sebifera</i> Aubl.	23	77
	An4	<i>Compsonaura</i> sp.	37	63
	An5	<i>Tovomita weddelliana</i> Planch. & Triana	25	75
	An6	<i>Dystovomita</i> sp.	21	79
	An7	<i>Chrysophyllum argenteum</i> Jacq.	42	58

	An8	<i>Miconia reducens</i> Triana	44	56
	An9	<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	36	64
	An10	<i>Quercus humboldtii</i> Bonpl.	28	72
Belmira	B2	<i>Ladenbergia macrocarpa</i> (Vahl) Klotzsch	33	67
	B3	<i>Gordonia fruticosa</i> (Schrad.) H. Keng	3	97
	B4	<i>Myrcia coriacea</i> (Vahl) DC.	59	41
	B5	<i>Miconia jahnii</i> Pittier	62	38
	B6	<i>Miconia superposita</i> Wurdack	64	36
	B7	<i>Miconia multiplinervia</i> Cogn.	0	100
	B8	<i>Quercus humboldtii</i> Bonpl.	3	97
	B9	<i>Billia rosea</i> (Planch. & Linden) C. Ulloa & P. Jørg.	66	34
Caicedo	Ca1	<i>Beilschmiedia costaricensis</i> (Mez & Pittier) C.K. Allen	78	22
	Ca2	<i>Weinmannia balbisiana</i> Kunth	89	11
	Ca3	<i>Ocotea balanocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Mez	83	17
	Ca4	<i>Billia rosea</i> (Planch. & Linden) C. Ulloa & P. Jørg.	81	19
	Ca5	<i>Piper obliquum</i> Ruiz & Pav.	84	16
	Ca6	<i>Alchornea verticillata</i> Renteria y Franco	78	22
	Ca7	<i>Hieronyma antioquensis</i> Cuatrec.	83	17
	Ca8	<i>Ilex danielis</i> Killip & Cuatrec.	83	17
	Ca9	<i>Ocotea</i> sp.	77	23
	Ca10	<i>Palicourea garciae</i> Standl.	90	10
Carepa	C1	<i>Protium</i> sp.	58	42
	C2	<i>Virola</i> sp.	84	16
	C3	<i>Piper reticulatum</i> L.	55	45
	C4	<i>Castilla tunu</i> Hemsl.	75	25
	C5	<i>Batocarpus costaricensis</i> Standl. & L.O. Williams	84	16
	C6	<i>Lunania parviflora</i> Spruce ex. Benth.	78	22
	C7	<i>Piper urense</i> Callejas	83	17
	C8	<i>Pouteria subrotata</i> Cronquist	56	44
	C9	<i>Inga acrocephala</i> Steud.	87	13
Jardín	J1	<i>Palicourea demissa</i> Standl.	68	32
	J2	<i>Palicourea andaluciana</i> Standl.	89	11
	J3	<i>Besleria formosa</i> C.V. Morton	55	45
	J4	<i>Miconia acanthocoryne</i> Wurdack	78	22
	J5	<i>Ladenbergia macrocarpa</i> (Vahl) Klotzsch	88	12
	J6	<i>Eschweilera antioquensis</i> Dugand & Daniel	72	28
	J7	<i>Beilschmidtia</i> sp.	63	37

	J8	<i>Billia rosea</i> (Planch. & Linden) C. Ulloa & P. Jørg.	86	14
	J9	<i>Hieronyma antioquiensis</i> Cuatrec.	79	21
	J10	<i>Ocotea floribunda</i> (Sw.) Mez	75	25
Maceo	M1	<i>Aniba perutilis</i> Hemsl.	28	72
	M2	<i>Warszewiczia uxpanapensis</i> (Lorence) C.M. Taylor	29	71
	M3	<i>Virola flexuosa</i> A.C. Sm.	20	80
	M4	<i>Pourouma bicolor</i> Mart.	35	65
	M5	<i>Tetragastris panamensis</i> (Engl.) Kuntze	34	66
	M6	<i>Miconia elata</i> (Sw.) DC.	25	75
	M7	<i>Maquira guianensis</i> Aubl.	20	80
	M8	<i>Coussarea grandifolia</i> Rusby	33	67
	M9	<i>Hieronyma</i> sp.	32	68
	M10	<i>Allomaieta pancurana</i> Lozano	29	71
Porce	P1	<i>Cordia bicolor</i> A. DC.	70	30
	P2	<i>Amaioua corymbosa</i> Kunth	66	34
	P3	<i>Matayba arborescens</i> (Aubl.) Radlk.	81	19
	P4	<i>Pseudolmedia laevigata</i> Trécul	63	37
	P5	<i>Pourouma bicolor</i> Mart.	82	18
	P6	<i>Erythroxylum citrifolium</i> A. St.-Hil.	86	14
	P7	<i>Pera arborea</i> Mutis	83	17
	P8	<i>Guatteria</i> sp.	57	43
	P9	<i>Miconia elata</i> (Sw.) DC.	86	14
	P10	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don	68	32
Puerto Triunfo	Pt1	<i>Brownea rosa-de-monte</i> Bergius	39	61
	Pt2	<i>Rinorea hirsuta</i> Hekking	37	63
	Pt3	<i>Ampelocera cf. longissima</i> Todzia	30	70
	Pt4	<i>Ephedranthus colombianus</i> Maas & Setten	49	51
	Pt5	<i>Brosimum alicastrum</i> Sw.	36	64
	Pt6	<i>Coccoloba padiformis</i> Meisn.	60	40
	Pt7	<i>Isidodendron tripterocarpum</i> Fern. Alonso, Pérez Zab. & Idárraga	59	41
	Pt8	<i>Cynometra cf. schottiana</i> Hochr.	74	26
	Pt9	<i>Oxandra longipetala</i>	72	28
	Pt10	<i>Talisia</i> sp.	68	32
Támesis	T1	<i>Trophis racemosa</i> (L.) Urb.	74	26
	T2	<i>Clarisia biflora</i> Ruiz & Pav.	81	19
	T3	<i>Casearia aculeata</i> Jacq.	77	23
	T4	<i>Pterocarpus</i> sp.	63	37
	T5	<i>Cordia panamensis</i> L. Riley	78	22
	T6	<i>Cupania latifolia</i> Kunth	55	45
	T7	<i>Astronium lecointei</i> Ducke	86	14
	T8	<i>Guapira costaricana</i> (Standl.) Woodson	74	26
	T9	<i>Licaria applanata</i> van der Werff	77	23
	T10	<i>Dalbergia</i> sp.	43	57

En la figura 1.1, se muestra el análisis de varianza del porcentaje de inhibición de cada extracto y sus respectivos controles, por cada sitio de colección. En algunos sitios de colección se observan valores muy homogéneos con una actividad marginal, mientras que en otros resaltan algunos extractos con valores por encima del 60% de inhibición, con diferencias significativas con respecto al control negativo y en algunos casos con actividad cercana al control positivo. El mayor número de extractos que afectaron la germinación de las semillas de lechuga fueron colectadas en Angelópolis, Anorí, Belmira, Maceo y Puerto Triunfo (figura 1.1). En otros sitios de colección, se presentaron menos especies con un porcentaje de inhibición promisorio, como en Alto de Ventanas y Porce.



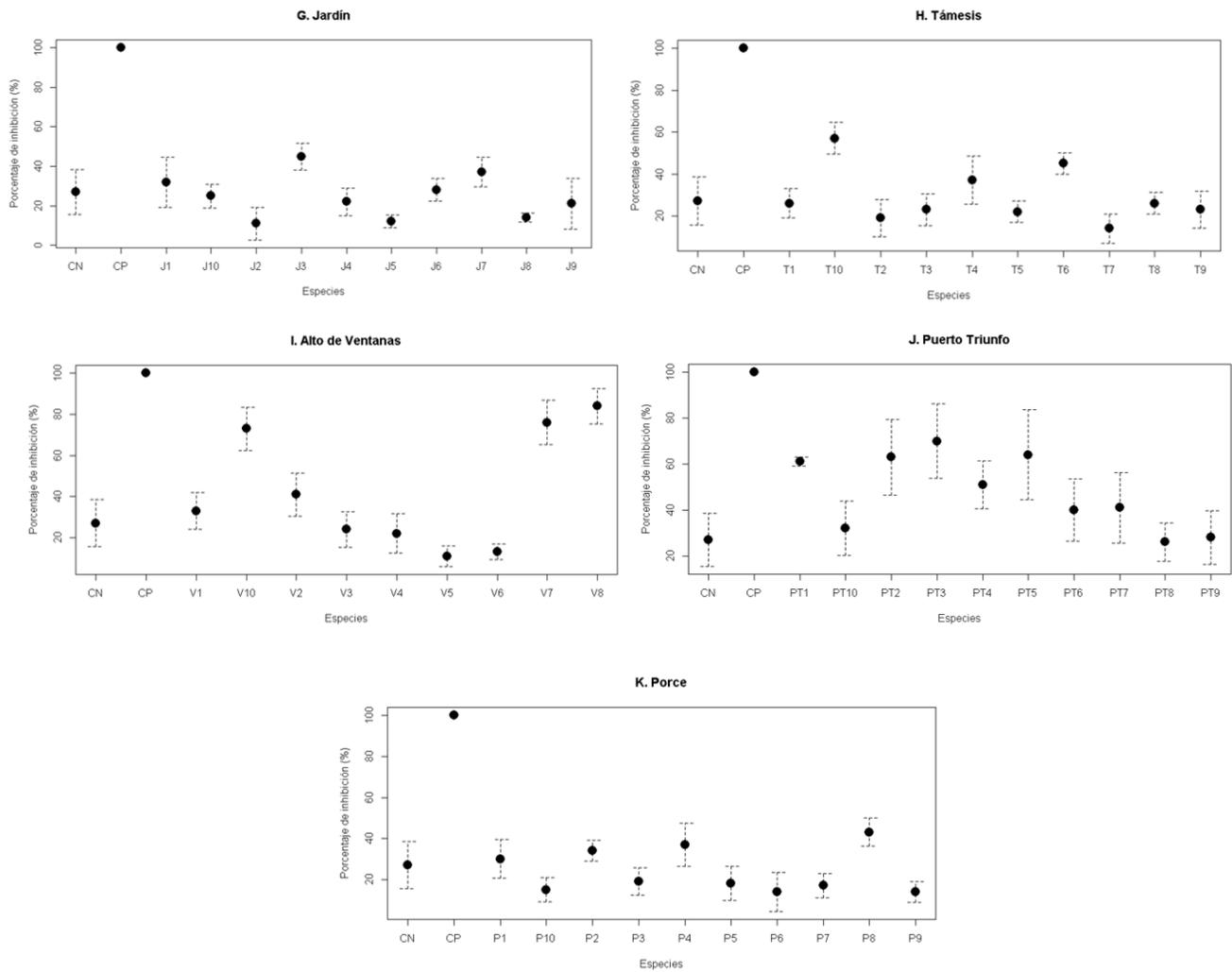


Figura 1.1. Análisis de la variación de los porcentajes de inhibición de la germinación de semillas de las especies por sitios de colección. CN: control negativo, CP: control positivo

Por otro lado, para destacar las especies promisorias, considerando el conjunto de datos por extractos individuales, se analizaron todos los resultados de los porcentajes de inhibición (figura 1.2). Se observa especies con una actividad marginal cercana al control negativo, mientras que hay unas especies que parecen promover la germinación. Entre las muestras promisorias, con un comportamiento similar al control positivo, se encuentran B7 (*Miconia multiplinervia*), B8 y An10 (*Quercus humboldtii*).

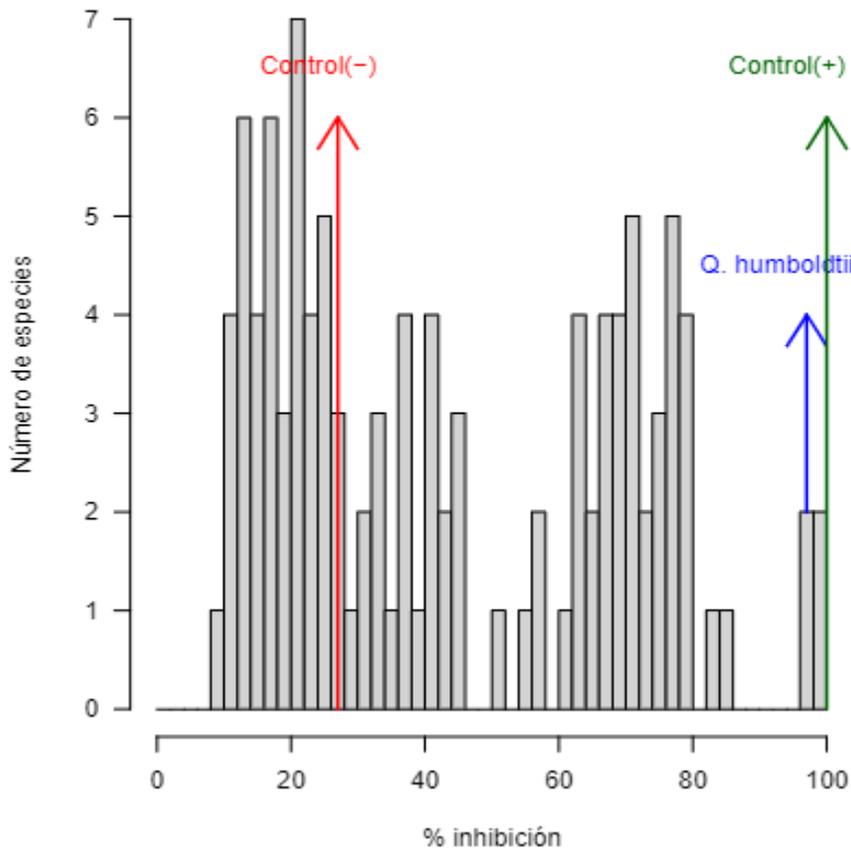


Figura 1.2 Distribución de las frecuencias de los porcentajes de inhibición de la germinación de semillas de lechuga respecto a los extractos etanólicos de las especies evaluadas.

Las dos especies de *Q. humboldtii*, colectadas en localidades diferentes (Anorí y Belmira), fueron seleccionadas y comparadas con ensayos y pruebas adicionales.

1.5.2 Comparación biológica y química de *Q. humboldtii* con origen en dos sitios biogeográficos diferentes.

En los análisis comparativos con los extractos de *Q. humboldtii* colectados en dos locaciones diferentes (Belmira y Anorí) que presentan diferencias en su altitud media (2958 m.s.n.m. y 1538 m.s.n.m. respectivamente) se presentaron los resultados en cuanto al efecto sobre la germinación de las semillas (figura 1.3).

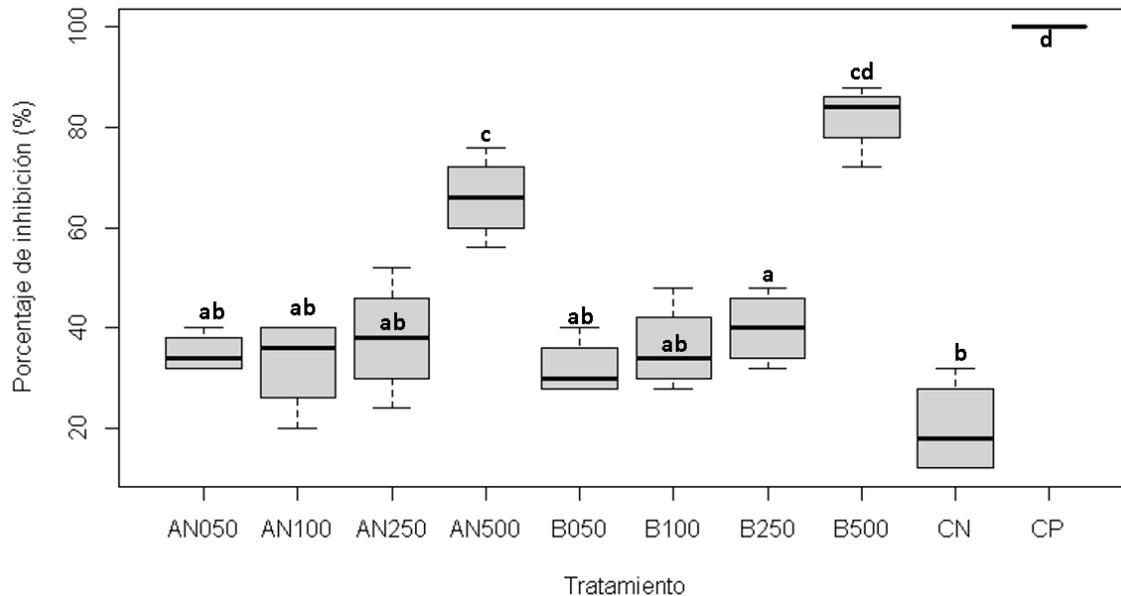


Figura 1.3 ANOVA del número de semillas germinadas frente a los extractos de *Quercus humboldtii* colectados en Anorí (An) y Belmira (B) desde de 50-500 mg*L⁻¹ en comparación con el control negativo (CN) y Control positivo (CP). Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Para ambos extractos, la actividad se incrementa hacia la concentración de 500 mg*L⁻¹, con una ligera tendencia a presentar un mejor potencial inhibitorio con la muestra colectada en Belmira (figura 1.3). Sin embargo, al analizar las diferencias en cuanto a la inhibición de la germinación de las semillas mediante la prueba de Tukey, estas no son significativas entre ambas muestras.

En cuanto al efecto de ambos extractos sobre la elongación de la radícula y el hipocótilo de las semillas que alcanzaron a germinar, de nuevo se observa una tendencia a inhibir la longitud de la radícula mayor para la muestra colectada en Belmira, pero esta no alcanza a ser significativa mediante la prueba de Tukey (figura 1.4). Ambos extractos de *Q. humboldtii*, presentan diferencias con respecto al control negativo.

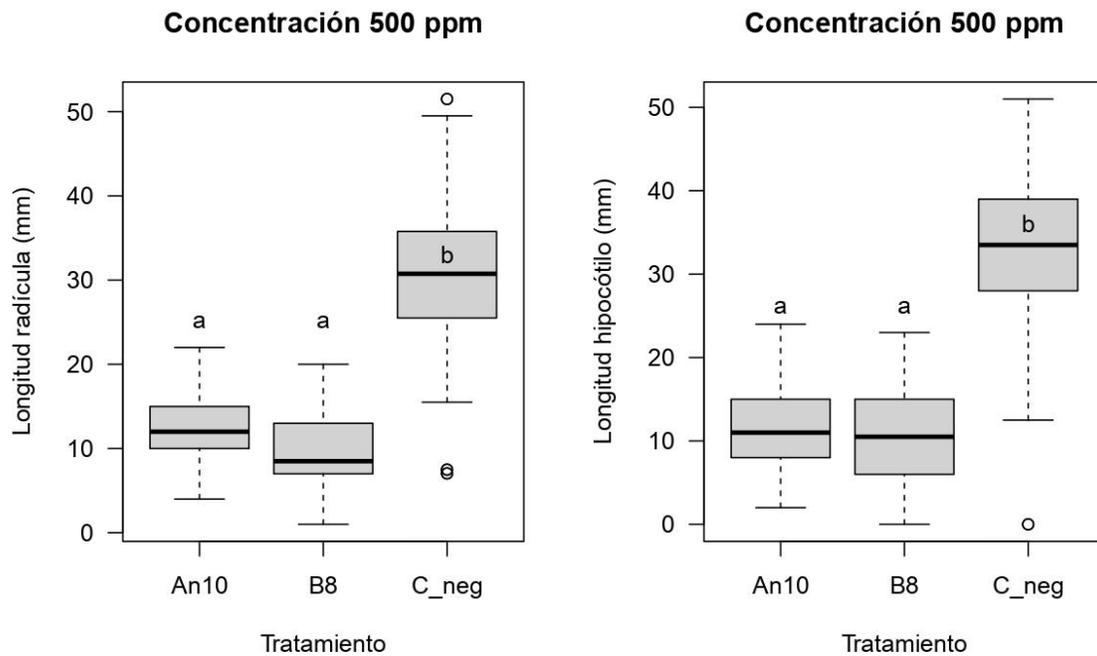


Figura 1.4 ANOVA de las mediciones de la longitud de las radículas y los hipocótilos de las semillas germinadas frente a los extractos de *Quercus humboldtii* colectados en Anorí (AN10) y Belmira (B8) a 500 mg*L⁻¹. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

En cuanto a los perfiles cromatográficos de ambos extractos etanólicos de *Q. humboldtii* (B8 y An10), en la figura 1.5. se sobreponen los cromatogramas de HPLC, evidenciando la similitud en los perfiles, con cambios en la intensidad de algunos de los picos.

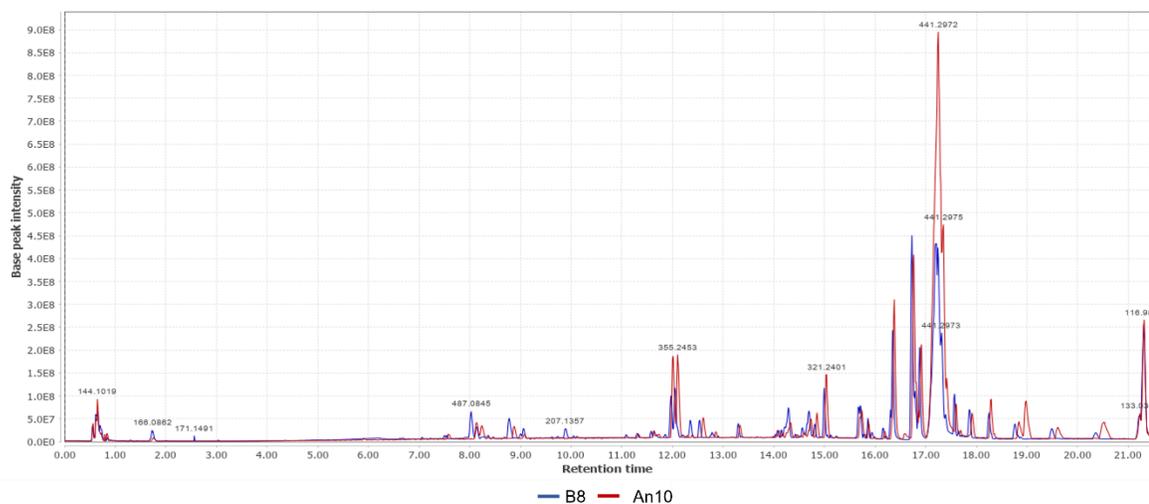


Figura 1.5 Perfiles cromatográficos por medio de HPLC de extractos etanólicos de *Q. humboldtii* colectado en Anorí (An10) color rojo y Belmira (B8) color azul.

1.6 Discusión

1.6.1 Análisis de la actividad alelopática

Uno de los mayores retos de la agricultura orgánica es el manejo de arvenses que perturban el desarrollo y la calidad de plantas en los cultivos, encareciendo costos y disminuyendo su rendimiento (Böcker et al., 2019). Como se planteó en este trabajo, el uso intensivo de agroquímicos sintéticos ha derivado en un impacto negativo en el medio ambiente y la salud humana que a su vez se ve reflejado en la disminución de la fertilidad inherente de los suelos, con el costo adicional de la utilización de sustancias de origen petroquímico (Madani & Carpenter, 2022). La búsqueda de alternativas derivadas de especies endémicas de remanentes de bosques poco explorados seguida en este estudio, derivó en el tamizaje inicial de 105 extractos de los cuales 26 afectaron la germinación en un porcentaje mayor al 70% (Tabla 1.1). Considerando la biodiversidad del territorio colombiano, los resultados apoyan el estudio de las especies endémicas ya que la mayoría de los trabajos donde evalúan la fitotoxicidad basados en relaciones alelopáticas de las especies vegetales, reportan análisis sobre especies de grupos taxonómicos diferentes a las estudiadas (Kaab et al., 2020; Mominul Islam et al., 2018) donde se realizaba énfasis en tamizar el potencial bioherbicida con base en la etnobotánica, así evaluar el potencial de especies presentes en una misma zona geográfica con similitudes en sus condiciones climáticas. En consecuencia, se encontraron reportes enfocados a extractos de especies de zonas templadas (Balah, 2020; Jiang et al., 2021; Scavo et al., 2020), mientras que no hay reportes sobre potenciales germinicidas o herbicidas de las especies andinas tratadas en este trabajo. Cabe aclarar que algunas especies incluidas en este estudio tienen reportes encaminados a estudios en farmacología y el uso alimentario, donde se estudió la aportación de compuestos volátiles a las características de añejamiento del vino carmenere con respecto al tiempo de maduración donde se destaca la presencia de antioxidantes en la matriz leñosa de las especies estudiadas, la utilización de frutos de especies maderables como sustituto del café debido a la presencia de compuestos químicos con similitudes organolépticas a las que presenta el café, así como el valor nutricional de dichos frutos con perspectiva alimentaria así como, algunos usos medicinales según la tradición de las comunidades. Estos estudios están enfocados a buscar productos de origen forestal con usos no maderables que aluden a la necesidad de generar valor agregado más allá del sector maderero, buscando prodigar el cuidado de especies forestales apoyados en las comunidades cercanas a dichas especies (García-Villalba et al., 2017; González et al., 2008; Martínez-Gil et al., 2018; Potosí Gutierrez et al., 2017; Socaciu et al., 2023).

En cuanto al método de selección de las muestras vegetales, la abundancia de una especie en un ecosistema depende de múltiples mecanismos adaptativos, siendo uno de estos la capacidad de sintetizar compuestos que contribuyan a fortalecer procesos de defensa y supervivencia, manteniendo sus poblaciones y la dominancia en su hábitat (Wink, 2003; Thakur et al., 2019). Es por ello por lo que se seleccionaron las especies más abundantes de cada sitio de colección buscando mayores opciones de muestras bioactivas. En este

sentido, en la figura 1.1, se observa que, en algunos sitios de colección se presentó una afectación a la germinación de semillas de lechuga de forma homogénea y consistente (alta o baja). Es de destacar que en Angelópolis, Anorí y Maceo todos los extractos presentaron un porcentaje de inhibición cercano o mayor al 60%, en las muestras de Caicedo, Carepa, Jardín y Porce no se presentaron efectos fitotóxicos significativos. Esto concuerda con la estructura de estos bosques que presentan comunidades más homogéneas (Peña et al 2018). Por otro lado, se encontró que en parcelas ubicadas en tierras más altas (Paramo de Belmira y Alto de Ventanas) se encontraron solo unas especies con actividad significativa. Esto evidencia que los efectos alelopáticos juegan un rol determinante en la estructura de los bosques, pues resalta el caso de los robledales en la parcela de Belmira, donde el *Q. humboldtii* forma poblaciones dominantes a lo largo del transecto, lo cual se vio reflejado en su actividad sobre la germinación de las semillas en el laboratorio (figura 1.2). Con respecto estudios en la composición química y su relación con gradientes altitudinales por medio de análisis metabolómicos de extractos, varios autores llegaron a la conclusión que, a mayores elevaciones se da menor diversidad de metabolitos secundarios, pero se detectaron en mayores concentraciones de algunos metabolitos (Kergunteuil et al, 2018; Sedio et al., 2021.; Volf, 2020). Aunque el presente estudio se hizo a menor escala que los trabajos citados, los resultados sugieren que el efecto de especies dominantes en el bosque podría estar en concordancia a lo descrito por estos autores. Sin embargo, no se puede descartar realizar comparaciones por factores climáticos debido a las dinámicas que está sufriendo el bosque húmedo por el cambio climático y la intervención humana en función de las actividades legales (Ganadería, minería, explotación maderera) así como actividades ilegales (narcotráfico, y comercio ilegal de especies animales y vegetales), pero que no fueron el objetivo de este estudio (Hrabanski & Le Coq, 2022).

Por parte del bioensayo implementado, en la literatura especializada se reportan metodologías para la descripción del potencial alelopático desde la fitotoxicidad observando el potencial de inhibición de la germinación en semillas de lechuga (Avelar Amado et al., 2020; Bouafiane et al., 2021; da Silva et al., 2019; Fernandes et al., 2023; Sobrero & Ronco, 2004). En este sentido, se valida el uso de las semillas de lechuga *L. sativa* como modelo prueba para evaluar el efecto sobre la germinación, y la elongación de radícula y el hipocótilo. También se observó en la literatura que la extracción del contenido intracelular con etanol es ampliamente referenciado y utilizado al romper efectivamente la pared y membrana celular (Scavo et al., 2020; Vieira et al., 2020), así como se plantea una metodología prometedora para la obtención sin solventes dependientes del petróleo, punto clave de cara a la explotación sostenible y en cumplimiento del mencionado acuerdo de París (Santos et al., 2022). En dichos estudios se aboga por el uso de soluciones hidroalcohólicas, que permitan reducir la extracción de material intracelular con solventes orgánicos. En tanto a la referencia de la concentración inicial utilizada para evaluar el efecto de los extractos vegetales, es un parámetro que suele ser variable en la literatura debido a diversos factores, uno de ellos las características físicas de las moléculas a las cuales se le atribuya un posible efecto alelopático o

estandarización de protocolos con respecto a referencias utilizadas, así como una posible forma de aplicación debido a factores como la polaridad, esto debido a la solubilidad que pueda tener en un medio. Aun así el rango en el que oscilan dichas concentraciones pueden variar entre los microgramos hasta gramos por litro de solución (Castola et al., 2002; Radhakrishnan et al., 2018; Vieira et al., 2020). Esto hace intuir que el desarrollo utilizado en el presente trabajo se encuentra acorde a lo referenciado en la literatura, y que lo innovador del presente estudio se caracteriza por las concentraciones utilizadas $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, que resultan ser considerablemente bajas a otras reportadas (da Silva et al., 2019; Kaab et al., 2020; Mominul Islam et al., 2018). Con esto, se encontró que la especie *Q. humboldtii* posee una actividad promisoriosa, y que su extracto natural puede ser utilizado como un potencial agente alelopático con características bioherbicidas.

1.6.2 Selección de *Q. humboldtii* y comparación biológica y química de muestras con origen biogeográficos diferentes.

De acuerdo con lo señalado en la figura 1.2 el roble andino *Q. humboldtii*, fue de interés no solo por sus resultados promisorios, sino por la dominancia de sus poblaciones en los dos sitios de colección encontrado, evidenciando un efecto alelopático en el bosque que fue corroborado en el laboratorio. Aunque no se encontraron estudios de la actividad alelopática de esta especie en particular, *Q. humboldtii* ha sido objeto de atención por presentar mono dominancia en bosques andinos colombianos influyendo en la estructura de las comunidades vegetales (Kattan y Murcia, 2012). Patrones mono dominantes de varias especies de *Quercus*, han sido reportadas en bosques de otras latitudes derivándose en el estudio de efectos alelopáticos tanto en el bosque (Djurđević et al., 2005; Fernandez et al, 2016; Li et al, 2007), como en experimentos de fitotoxicidad en el laboratorio (Arababah et al., 2009; Bhupendra et al., 2016; Dastagir & Hussain, 2015; Pranab et al., 2010), demostrando en efecto interferencia química en el desarrollo de otras plantas. Sin embargo, al no encontrar información en cuanto al potencial alelopático para el *Q. humboldtii* se optó por realizar una comparación entre la misma especie colectada en Anorí y Belmira. Esto debido a que en ambas locaciones se presentan diferencias altitudinales, de precipitación y de temperatura, por lo que se evaluó si se presentaba variaciones en su actividad biológica, producto de una respuesta inducida por el ambiente en referencia a su metabolismo secundario. Todo ello debido a los reportes que prueban que la medida de la plasticidad de las defensas químicas es variable a nivel intraespecífico, como el contenido de estructuras lipídicas en respuesta a un cambio respecto a las condiciones climáticas y la variación de las especies en su distribución en ecosistemas (Huang et al., 2023). Además, los resultados iniciales donde presentaron un porcentaje de inhibición de la germinación del 72% y 97% para las muestras colectadas en Anorí y Belmira (Tabla 1.1) respectivamente, hizo pensar en diferencias en cuanto a su composición química. Sin embargo, tanto en los ensayos posteriores de la inhibición de la germinación de semillas de lechuga a diferentes concentraciones (figura 1.3), como en el efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo (figura 1.4), no se observaron diferencias significativas entre los extractos de ambos sitios de colección. Debido a ello, se sugiere que la actividad presentada podría estar ligada a metabolitos secundarios

constitutivos, los cuales son sintetizados y almacenados en la planta sin previo estímulo (Kesler, 2015; Piasecka et al., 2015). Es así como en la figura 1.5 se observa un perfil similar para ambas muestras del extracto de *Q. humboldtii*, con unas leves diferencias en la abundancia de algunos compuestos, lo cual apoya los resultados biológicos. Además, este resultado está en concordancia con lo propuesto por Zorrilla y colaboradores (2021), donde se plantea que la variabilidad genotípica del roble andino no atraviesa por una depresión genética como se ha hipotetizado en otros trabajos y que existe una interconexión de la especie en la cordillera de los Andes que permite explicar su dominancia con base en la expresión genética producto de factores ambientales, donde posiblemente se mantenga un alto flujo genético y que permita una adaptabilidad a diversos ambientes teniendo una composición similar entre lugares de colección. Por otro lado, en especies de roble de otras regiones se ha encontrado una homogeneidad en las características químicas de los compuestos presentes en especies como *Q. cerris*, *Q. coxifera* y *Q. ilex* (Jaber, 2023; López-Hidalgo et al., 2021; Sari et al., 2019; Vieira et al., 2020) donde se observa una predominancia de compuestos de baja polaridad, y provenientes de la ruta del ácido gálico, antioxidantes como flavonoides y taninos presentes en la corteza o raíz de dichas especies.

Los resultados obtenidos abren nuevas posibilidades para especies nativas como el roble andino *Q. humboldtii*, ya que es relevante destacar que el roble andino colombiano es una especie protegida debido a la deforestación ilegal producto del conflicto armado interno (Avella & Cardenas, 2010) así como su apetencia por ser un forestal de madera resistente y de alto valor comercial (Avella & Cardenas, 2010), por lo cual este tipo de trabajos propone un uso alternativo con miras a su aprovechamiento sostenible. Hasta la fecha, la utilización del roble andino en el sector alimentario apunta a conservación y servicio de vinos, esto debido al gran contenido de moléculas antioxidantes reportadas en la literatura. Esta especie es fuente de guaiacol, molécula aromática característica de la combustión de la madera, que está presente en la matriz leñosa de este roble, lo que lo hace adecuado y propicio para la maduración de licores (Martínez-Gil et al., 2018), también se tiene referencia del posible uso de sus semillas como un sustituto del café debido al contenido de compuestos aromáticos volátiles que posee las semillas del roble (Díaz-Rojas et al., 2019). Adicional a esto, se reportan estudios en antioxidantes y aceites esenciales con potenciales farmacológicos como tratamientos contra la proliferación de tipos de cáncer en humanos (Morales, 2021; Tian et al., 2022).

Finalmente, para afianzar los resultados de este trabajo, se sugiere incluir otras variables ambientales y temporales para validar la reproducibilidad de la actividad biológica. Esto es relevante ya que esta especie presenta potencial para generar una formulación de un producto bioherbicida. Dicha formulación comprende un punto crítico para el establecimiento de un candidato que pueda llegar a ser pensado como un producto comercial derivado del material biológico de la planta. En este sentido se ha planteado en la literatura especializada lo complejo que puede resultar la estandarización de un producto natural debido a la composición de una matriz celular que cuenta con una variedad de compuestos químicos, que a su vez pueden presentar actividades sinérgicas o

antagónicas a una o varias sustancias que, puras, pueden llegar a ejercer diversos potenciales, esto dicho no solo para el sector agropecuario sino también para el sector farmacológico (Elkordy et al., 2021; Hu et al., 2019). Algunas investigaciones proponen incluso la utilización de inteligencias artificiales asociadas al análisis de datos (Big data) que permita predecir la actividad biológica de especies en consonancia con los posibles potenciales reportados hasta el momento (Xue et al., 2022). Es por ello por lo que como paso a seguir con miras a una formulación se debe partir de la caracterización química de los extractos, lo cual se desarrolla en el capítulo 2 de este trabajo.

1.7 Conclusiones

Luego de realizar el tamizaje inicial de especies de remanentes de bosque andino de Antioquia y analizar los diferentes potenciales alelopáticos de las 105 especies estudiadas se puede enunciar que hay varias especies con potencial alelopático, lo cual se ve reflejado en su actividad fitotóxica: esto además de generar información ecológica referente a la composición de cada uno de los sitios de colecta, les da un valor agregado a las especies nativas de este estudio. Con la selección del *Q. humboldtii* para estudios posteriores, se destaca que es la primera vez que se enuncia un reporte de este tipo para la especie, y abre una posibilidad para la realización de análisis a profundidad con respecto a la composición fitoquímica del extracto que pueda elucidar una o varias familias de moléculas que estén implicadas en dicho potencial bioactivo. Esto abre la posibilidad de ahondar en el estudio de esta especie con miras a proponer un bioherbicida biodegradable con menor impacto en el medio ambiente. Se requieren de más estudios al respecto para el establecimiento del rol ambiental en la producción de estructuras fitoquímicas con potencial bioherbicida, donde se pueda establecer si estas estructuras químicas son producto del metabolismo primario o secundario de la especie, así como el rol sinérgico y/o antagónico de una matriz compleja como lo es un extracto crudo proveniente de hojas y tallos de plantas.

Así mismo se abre la posibilidad de una futura formulación y prospección de un producto natural comercial que permita mancomunar el saber popular junto con el saber académico y brindar una alternativa sostenible al medio ambiente y al ser humano que contribuya a la transición a tecnologías de bajo impacto y con alto impacto social.

1.8 Referencias

- Avelar Amado, P., Fonsêca Castro, A. H., Samúdio Santos Zanuncio, V., Stein, V. C., Brentan da Silva, D., & Alves Rodrigues dos Santos Lima, L. (2020). Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192(July 2019), 110310. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110310>
- Avella, A., & Cardenas, L. (2010). Conservación y uso sostenible de los bosques de roble enelcorredor de conservación Guantiva-LaRusia-Iguaque departamentos de Santander y Boyacá, Colombia. *Colombia Forestal*, 13(1), 5–26.
- Avila, B. S., Mendoza, D. P., Ramírez, A., & Peñuela, G. A. (2022). Occurrence and distribution of persistent organic pollutants (POPs) in the atmosphere of the Andean city of Medellin, Colombia. *Chemosphere*, 307(52). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135648>
- Balah, M. A. (2020). Weed control ability of Egyptian Natural Products against annual, perennial and parasitic weeds. *Acta Ecologica Sinica*, 40(6), 492–499. <https://doi.org/10.1016/J.CHNAES.2020.10.005>
- Benner, P., Mena0, H., & Schneider, R. (2016). Modeling Glyphosate aerial spray drift at the Ecuador-Colombia border. *Applied Mathematical Modelling*, 40(1), 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2015.04.057>
- Berhanu, Y., Dalle, G., Sintayehu, D. W., Kelboro, G., & Nigussie, A. (2023). Land use/land cover dynamics driven changes in woody species diversity and ecosystem services value in tropical rainforest frontier: A 20-year history. *Heliyon*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13711>
- Böcker, T., Möhring, N., & Finger, R. (2019). Herbicide free agriculture? A bio-economic modelling application to Swiss wheat production. *Agricultural Systems*, 173(August 2018), 378–392. <https://doi.org/10.1016/j.agry.2019.03.001>
- Bouafiane, M., Khelil, A., Cimmino, A., & Kemassi, A. (2021). Prediction and evaluation of allelopathic plants species in Algerian Saharan ecosystem. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 53(October). <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2021.125647>
- Boudebouz, A., Boudalia, S., Boussadia, M. I., Gueroui, Y., Habila, S., Bousbia, A., & Symeon, G. K. (2022). Pesticide residues levels in raw cow's milk and health risk assessment across the globe: A systematic review. *Environmental Advances*, 9(April). <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100266>
- Brief, F. A. (2022). Agricultural production statistics 2000–2021. *Agricultural Production Statistics 2000–2021*. <https://doi.org/10.4060/cc3751en>
- Calle, A., & Holl, K. D. (2019). Riparian forest recovery following a decade of cattle exclusion in the Colombian Andes. *Forest Ecology and Management*, 452(August). <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117563>
- Castola, V., Bighelli, A., Rezzi, S., Melloni, G., Gladiali, S., Desjobert, J. M., & Casanova,

- J. (2002). Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.). *Industrial Crops and Products*, 15(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00091-7)
- Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C., & Guillemin, J. P. (2016). Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection*, 87, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016>
- da Silva, U. P., Furlani, G. M., Demuner, A. J., da Silva, O. L. M., & Varejão, E. V. V. (2019). Allelopathic activity and chemical constituents of extracts from roots of *Euphorbia heterophylla* L. *Natural Product Research*, 33(18), 2681–2684. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1460829>
- Díaz-Rojas, L., Galán-Bernal, N., Forero, D. P., Linares, E. L., Marín-Loaiza, J. C., & Osorio, C. (2019). Characterization of odour-active volatiles and sensory analyses of roasted oak (*Quercus humboldtii* bonpl.) acorns, a coffee substitute. *Vitae*, 26(1), 44–50. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v26n1a05>
- Elkordy, A. A., Haj-Ahmad, R. R., Awaad, A. S., & Zaki, R. M. (2021). An overview on natural product drug formulations from conventional medicines to nanomedicines: Past, present and future. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63(March). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102459>
- FAO. (2022). Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators - Global, regional and country trends, 1990–2020. *FAOSTAT Analytical Briefs*, No. 46, 13. <https://doi.org/10.4060/cc0918en> <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cc0918en>
- Fernandes, S. Y., de Araújo, D., Pontes, M. S., Santos, J. S., Cardoso, C. A. L., Simionatto, E., Martines, M. A. U., Antunes, D. R., Grillo, R., Arruda, G. J., & Santiago, E. F. (2023). Pre-emergent bioherbicide potential of *Schinus terebinthifolia* Raddi essential oil nanoemulsion for *Urochloa brizantha*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47(January). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102598>
- García-Villalba, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Rocha-Guzmán, N. E. (2017). Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63(June), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.034>
- González, R., Calderón, L., & Cabeza, R. (2008). Cuantificación de Sustancias Marcadoras de Envejecimiento en *Quercus humboldtii* por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. *Temas Agrarios*, 13(2), 56–63. <https://doi.org/10.21897/rta.v13i2.670>
- Hrabanski, M., & Le Coq, J. F. (2022). Climatisation of agricultural issues in the international agenda through three competing epistemic communities: Climate-smart agriculture, agroecology, and nature-based solutions. *Environmental Science and Policy*, 127(October 2021), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2021.10.022>
- Hu, S., Li, S. wen, Yan, Q., Hu, X. peng, Li, L. yun, Zhou, H., Pan, L. xin, Li, J., Shen, C. pu, & Xu, T. (2019). Natural products, extracts and formulations comprehensive therapy for the improvement of motor function in alcoholic liver disease. *Pharmacological Research*, 150(November).

- <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104501>
- Huang, L. B., Guan, X., Aritsara, A. N. A., Zhu, J. J., Jansen, S., & Cao, K. F. (2023). Lipid concentration and composition in xylem sap of woody angiosperms from a tropical savanna and a seasonal rainforest. *Plant Diversity, In press*. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2023.07.001>
- Jaber, S. A. (2023). In vitro alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activity and in vivo antidiabetic activity of *Quercus coccifera* (Oak tree) leaves extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(7), 0–5. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103688>
- Jiang, C., Zhou, S., Liu, L., Toshmatov, Z., Huang, L., Shi, K., Zhang, C., & Shao, H. (2021). Evaluation of the phytotoxic effect of the essential oil from *Artemisia absinthium*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112856. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112856>
- Kaab, S. B., Rebey, I. B., Hanafi, M., Hammi, K. M., Smaoui, A., Fauconnier, M. L., De Clerck, C., Jijakli, M. H., & Ksouri, R. (2020). Screening of Tunisian plant extracts for herbicidal activity and formulation of a bioherbicide based on *Cynara cardunculus*. *South African Journal of Botany*, 128, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.018>
- Kass, L., Gomez, A. L., & Altamirano, G. A. (2020). Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 508(September 2019), 110789. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110789>
- Khursheed, A., Rather, M. A., Jain, V., Wani, A. R., Rasool, S., Nazir, R., Malik, N. A., & Majid, S. A. (2022). Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microbial Pathogenesis*, 173(PA), 105854. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105854>
- López-Hidalgo, C., Trigueros, M., Menéndez, M., & Jorriñ-Novó, J. V. (2021). Phytochemical composition and variability in *Quercus ilex* acorn morphotypes as determined by NIRS and MS-based approaches. *Food Chemistry*, 338(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127803>
- Madani, N. A., & Carpenter, D. O. (2022). Effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides like Roundup™ on the mammalian nervous system: A review. *Environmental Research*, 214(July). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113933>
- Martínez-Gil, A. M., del Alamo-Sanza, M., Gutiérrez-Gamboa, G., Moreno-Simunovic, Y., & Nevares, I. (2018). Volatile composition and sensory characteristics of Carménère wines macerating with Colombian (*Quercus humboldtii*) oak chips compared to wines macerated with American (*Q. alba*) and European (*Q. petraea*) oak chips. *Food Chemistry*, 266(May), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.123>
- Mominul Islam, A. K. M., Hasan, M., Musha, M. M. H., Uddin, M. K., Juraimi, A. S., & Anwar, M. P. (2018). Exploring 55 tropical medicinal plant species available in Bangladesh for their possible allelopathic potentiality. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(1), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.05.005>

- Morales, D. (2021). Oak trees (*Quercus* spp.) as a source of extracts with biological activities: A narrative review. *Trends in Food Science and Technology*, 109(November 2020), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.029>
- Murillo-Sandoval, P. J., Gjerdseth, E., Correa-Ayram, C., Wrathall, D., Van Den Hoek, J., Dávalos, L. M., & Kennedy, R. (2021). No peace for the forest: Rapid, widespread land changes in the Andes-Amazon region following the Colombian civil war. *Global Environmental Change*, 69(May). <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102283>
- Potosi Gutierrez, A., Villalba Malaver, J. C., & Arboleda Pino, L. Y. (2017). Productos forestales no maderables asociados a bosques de roble *Quercus humboldtii* Bonpl en La Vega, Cauca. *Bioteconología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 22. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\)22-29](https://doi.org/10.18684/bsaa(15)22-29)
- Radhakrishnan, R., Alqarawi, A. A., & Abd Allah, E. F. (2018). Bioherbicidas: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158(November 2017), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>
- Riaño, C., Ortiz-Ruiz, M., Pinto-Sánchez, N. R., & Gómez-Ramírez, E. (2020). Effect of glyphosate (Roundup Active®) on liver of tadpoles of the colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126287>
- Ruiz-Agudelo, C. A., Gutiérrez-Bonilla, F. de P., Cortes-Gómez, A. M., & Suarez, A. (2022). A first approximation to the Colombian Amazon basin remnant natural capital. Policy and development implications. *Trees, Forests and People*, 10(May). <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2022.100334>
- Santos, M. B., Sillero, L., Gatto, D. A., & Labidi, J. (2022). Bioactive molecules in wood extractives: Methods of extraction and separation, a review. *Industrial Crops and Products*, 186(April). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115231>
- Sari, S., Barut, B., Özel, A., Kuruüzüm-Uz, A., & Şöhretoğlu, D. (2019). Tyrosinase and α -glucosidase inhibitory potential of compounds isolated from *Quercus coccifera* bark: In vitro and in silico perspectives. *Bioorganic Chemistry*, 86(October 2018), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.015>
- Scavo, A., Pandino, G., Restuccia, A., & Mauromicale, G. (2020). Leaf extracts of cultivated cardoon as potential bioherbicide. *Scientia Horticulturae*, 261(November 2018), 109024. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109024>
- Sedio, B. E.; Spasojevic, M. J.; Myers, J. A.; Wright, S. J.; Person, M. D.; Chandrasekaran, H.; Dwenger, J. H.; Prechi, M. L.; López, C. A.; Allen, D. N.; et al. Chemical Similarity of Co-Occurring Trees Decreases With Precipitation and Temperature in North American Forests. *Front. Ecol. Evol.* 2021, 9 (May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.679638>.
- Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. *Imta*, 55–67.
- Socaciu, M. I., Anamaria Semeniuc, C., Andruța Mureșan, E., Pușcaș, A., Tanislav, A., Ranga, F., Dulf, F., Páll, E., Maria Truță, A., Pașca, C., Severus Dezmiorean, D., & Mureșan, V. (2023). Characterization of some Fagaceae kernels nutritional

- composition for potential use as novel food ingredients. *Food Chemistry*, 406(November 2022), 0–2. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135053>
- Tian, H., Zhai, W., Sun, K., Zhu, Y., Zhou, H., & Wan, P. (2022). Chemical composition and potential bioactivities of essential oil from *Quercus mongolica* bark. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(9). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104076>
- Valbuena, D., Cely-Santos, M., & Obregón, D. (2021). Agrochemical pesticide production, trade, and hazard: Narrowing the information gap in Colombia. *Journal of Environmental Management*, 286(March). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112141>
- Van den Berg, L., Behagel, J. H., Verschoor, G., Petersen, P., & Gomes da Silva, M. (2022). Between institutional reform and building popular movements: The political articulation of agroecology in Brazil. *Journal of Rural Studies*, 89(March 2021), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2021.11.016>
- Vieira, P. G., de Melo, M. M. R., Şen, A., Simões, M. M. Q., Portugal, I., Pereira, H., & Silva, C. M. (2020). *Quercus cerris* extracts obtained by distinct separation methods and solvents: Total and friedelin extraction yields, and chemical similarity analysis by multidimensional scaling. *Separation and Purification Technology*, 232(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115924>
- von der Goltz, J., Dar, A., Fishman, R., Mueller, N. D., Barnwal, P., & McCord, G. C. (2020). Health Impacts of the Green Revolution: Evidence from 600,000 births across the Developing World. *Journal of Health Economics*, 74, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2020.102373>
- Xue, H. T., Stanley-Baker, M., Kong, A. W. K., Li, H. L., & Goh, W. W. Bin. (2022). Data considerations for predictive modeling applied to the discovery of bioactive natural products. *Drug Discovery Today*, 27(8), 2235–2243. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.009>
- Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2021). Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 248(April), 109103. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109103>

2. Capítulo 2

Caracterización fitoquímica del extracto crudo de *Quercus humboldtii* roble andino colombiano como potencial bioherbicida

2.1 Resumen

Tras el acuerdo de París del año 2015 el ser humano ha quedado ligado a una promesa de desvinculación del petróleo máxima para el año 2050. Esto puede afectar dramáticamente la producción de agroquímicos de síntesis dada su implicación como derivados del petróleo, y en consecuencia la productividad del sector agropecuario mundial. Por otro lado, los agroquímicos debido a su alta toxicidad y baja selectividad han provocado que un gran número de países proponga vetos a su producción y aplicación. Como alternativa, innovadora, sostenible y viable a estas sustancias nocivas para el ser humano y el medio ambiente, la agroecología y la farmacognosia han propuesto la utilización de estructuras químicas provenientes de especies macro y microscópicas, que posean una mayor selectividad y un bajo impacto medioambiental. Debido al potencial alelopático que puede llegar a presentar el extracto crudo de *Quercus humboldtii*, el presente trabajo estudió la naturaleza fitoquímica probable que dicha especie endémica de los Andes colombianos es capaz de presentar, dando como resultado luego de dos etapas de fraccionamiento por gradiente de polaridad y reconocimiento de estructuras por GC-MS y RMN se pudo establecer que uno de los compuestos presentes en la fracción que presentó potencial de inhibición de germinación y elongación de radícula e hipocótilo en semillas de lechuga *Lactuca sativa*, es la Friedelina, compuestos de estructura esteroideal posiblemente provenientes de la ruta metabólica del escualeno, algunos isoprenoides como el pinano, así como ácidos grasos e hidrocarburos. Es el primer reporte que se realiza sobre Friedelina en la especie, así como una caracterización fitoquímica en

la especie y que pueden generar valor agregado a futuro con respecto a posibles bioherbicidas, o moléculas con un potencial antioxidante.

2.2 Abstract

After the Paris agreement of 2015, the human being has been linked to a promise to disengage from oil, especially by the year 2050. This can dramatically affect the production of synthetic agrochemicals given their involvement as oil derivatives, and consequently productivity. of the world agricultural sector. On the other hand, agrochemicals due to their high toxicity and low selectivity have caused many countries to propose vetoes on their production and application. As an innovative, sustainable, and viable alternative to these harmful substances for humans and the environment, agroecology and pharmacognosy have proposed the use of chemical structures from macro and microscopic species, which have greater selectivity and low environmental impact. Due to the allelopathic potential that the crude extract of *Quercus humboldtii* may present, the present work studied the probable phytochemical nature that this endemic species of the Colombian Andes is capable of presenting, resulting after two fractionation stages by polarity gradient. and recognition of structures by GC-MS and NMR, it was possible to establish that one of the compounds present in the fraction that presented potential for inhibition of germination and radicle and hypocotyl elongation in *Lactuca sativa* lettuce seeds, is Friedelin, compounds with a steroidal structure. possibly from the squalene metabolic pathway, some isoprenoids such as pinane, as well as fatty acids and hydrocarbons. It is the first report that is carried out on Friedelina in the species as well as a phytochemical characterization in the species and that can generate added value in the future with respect to possible bioherbicides, or molecules with antioxidant potential.

2.3 Introducción

En los últimos años, el ser humano a afrontado un incremento sostenido en su población, la necesidad de alimentos ha hecho posible la formulación de productos químicos para el sector agropecuario que ha permitido un aumento considerable en su producción (Bezner Kerr et al., 2021), dicho incremento ha sido en detrimento de las condiciones medio ambientales, debido al uso de agroquímicos de síntesis que en su mayoría no son selectivos en su uso, esto genera afectaciones a especies no objetivos y en consecuencia ayuda generar daños medio ambientales y a la salud humana (Raj et al., 2023).

Para el año 2015 sustancias como los órgano clorados, órgano fosforados y órgano azufrados, sustancias utilizadas en el control sistemático de especies no deseadas en cultivos puros, fueron prohibidas en la Unión Europea debido a su alta peligrosidad (Valbuena et al., 2021), entre estos compuestos se encuentra el glifosato (N-

fosfometilglicina), un compuesto órgano fosforado utilizado en el control de especies vegetales debido a su potencial activo de interferencia en la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa, que evita la formación de ácido shiquimico precursor de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, tirosina y triptófano (Avelar Amado et al., 2020), este compuesto se creía que solo afectaba especies vegetales, sin embargo, se ha reportado en la literatura posibles incidencias de dicho compuesto en la proliferación de cáncer en humanos (Kass et al., 2020), obesidad (Ren et al., 2020), malformación de fetos en bovinos (C. Yang et al., 2021) entre otros. Aun así, es el herbicida de síntesis más utilizado en el mundo debido a su eficiencia y eficacia en el control de especies vegetales, debido a que es un agente de uso por contacto (ingresa por los estomas a la planta), sistémico (se disemina por toda la planta usando su sistema vascular) generando afectaciones en todo el sistema y reduciendo la elongación de la radícula, impidiendo a la planta absorber agua y nutrientes del suelo, generando así la senescencia y muerte de la planta (Avelar Amado et al., 2020). Se ha reportado que este producto también afecta a especies de hongos fotosintéticos (Riaño et al., 2020), lo que pone en duda su inocuidad a otras especies.

Otro caso de herbicidas comerciales comunes es el del paraquat (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), este compuesto es utilizado debido a que es un herbicida de amplio espectro por contacto que, así como el glifosato genera senescencia en plantas, aun así, este compuesto es recalcitrante (cuenta con una vida media prolongada) y puede acumularse en suelos y cuerpos acuíferos (Chen et al., 2021).

En el caso de Colombia, su vocación agrícola hace que estos productos sean necesarios para mantener un sistema agropecuario productivo y competitivo (Valbuena et al., 2021), adicional a esto, en el marco del conflicto armado interno, se utilizan estas sustancias herbicidas para controlar algunos cultivos llamados ilícitos debido a que son la materia prima para la producción de psicotrópicos como es el caso de la cocaína (Camacho & Mejía, 2017). En algunos casos dicha erradicación suele ser manual, sin embargo, en los últimos años hasta el año 2016 dicha erradicación se realizó vía aspersión aérea debido a la geografía del territorio generando daños en ciertos ecosistemas por la generación de aerosoles que afectaban especies no objetivo y comunidades cercanas (Benner et al., 2016). Esto conllevó a que en el año 2017 la corte constitucional de Colombia prohibiera la aspersión aérea de estos agentes agroquímicos (Abramovits, 2022), sin embargo, para 2018 en la ciudad de Medellín se reportaron índices de hasta 28 partes por millón de compuestos plaguicidas órganoclorados, que generan cierta alarma de la forma como se manejan estos agentes (Avila et al., 2022).

Por otro lado, la agroecología y la farmacognosia han generado un interés en el descubrimiento y análisis de interacciones entre especies macro y microscópicas en las cuales se observan la aparición de compuestos químicos naturales, de bajo impacto medioambiental debido a su baja concentración y su alta selectividad (Bezner Kerr et al., 2021; Khursheed et al., 2022b) esto se apoya en la competitividad de especies vivas que puedan ser de uso para el ser humano (Radhakrishnan et al., 2018). Esto aunado a la necesidad de encontrar alternativas al uso de agroquímicos de síntesis, puede abrir un

espacio para la investigación de especies con potencial bioactivo (Avella & Cardenas, 2010). Colombia al ser un país megadiverso ofrece una amplia variedad de especies endémicas que podrían ofrecer un potencial bioactivo que pueda ser encaminado a bioherbicidas.

Este puede ser el caso del roble andino colombiano *Quercus humboldtii* Bonpl (Fagaceae), una especie del género *Quercus* utilizada en la industria maderera para la fabricación de muebles, en la industria alimentaria para la fabricación de barricas para la maduración de bebidas alcohólicas y recientemente en la industria farmacológica para la obtención de agentes antioxidantes (Díaz-Rojas et al., 2019; Martínez-Gil et al., 2018). No han sido reportados aun potenciales herbicidas en la especie, sin embargo, otras especies del género han sido estudiadas, pero no para dicha potencia.

Con la poca exploración que ha tenido esta especie en agroecología, a pesar de la evidencia ecológica que demuestra la estructura dominante de los robledales (León et al, 2009), sugiriendo un potencial alelopático, se planteó la hipótesis de la presencia de compuestos fitotóxicos en *Q. humboldtii*. Esta premisa fue soportada por la actividad preliminar que presentaron los extractos del roble andino frente a la germinación de semillas de lechuga (capítulo 1), lo cual llevó al objetivo de este capítulo enfocados en el estudio de la bioactividad naturaleza fitoquímica de *Q. humboldtii*, como una alternativa por su potencial bioherbicida.

2.4 Metodología

2.4.1 Dosificación del extracto de *Q. humboldtii*

La muestra vegetal seleccionada para estudios de dosificación y caracterización fitoquímica fue la especie de *Q. humboldtii* colectada en el páramo de Belmira. Para establecer las dosis inhibitorias del extracto y para seguir el fraccionamiento biodirigido, se realizaron los ensayos de inhibición de la germinación de semillas de lechuga descritas en el apartado 1.4.2.1. Para los ensayos de inhibición de la germinación de la semilla de lechuga, las concentraciones evaluadas con el extracto etanólico fueron 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 mg*L⁻¹, con el fin de calcular la concentración a la que se logra un 50 % de inhibición de la germinación (IC₅₀). Asimismo, con fines comparativos, el control positivo (herbicida comercial con principio activo glifosato) también se evaluó a 1000, 2500 y 5000 mg L⁻¹.

2.4.2 Análisis estadístico de la evaluación biológica

Para identificar la variación en el porcentaje de inhibición de la germinación, la longitud del hipocótilo y la elongación de la radícula entre el extracto, fracciones y los controles se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), se realizó una prueba de rangos de Tukey. Para esto se empleó

el software R versión 4.3.1 (RCommander 2023). Los gráficos de barras de los ensayos de actividad biológica se realizaron en el software Rstudio 2023.

Para analizar la dosis media del extracto de *Q. humboldtii* necesaria para inhibir la germinación de semillas, en comparación con el control negativo, se realizó una regresión logística (análisis PROBIT). Para evaluar la probabilidad de la inhibición de la germinación de semillas se usó una función que expresa dicha probabilidad (p) de la siguiente manera:

$$p = \frac{e^{a+bx}}{1 + e^{a+bx}}$$

Donde x es las concentraciones del extracto de *Q. humboldtii* evaluadas y a y b son los parámetros del modelo (Crawley, 2012). Basados en el modelo logístico ajustado, se calculó la concentración necesaria para inhibir la germinación del 50% de las semillas (IC50). Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en el software R versión 3.5.3 (R Core Team, 2019).

2.4.3 Fraccionamiento biodirigido de *Q. humboldtii*

Para el fraccionamiento biodirigido de *Q. humboldtii* se realizaron los estudios de fitotoxicidad en semillas de lechuga trabajados previamente en el apartado 1.4.2.1. Las fracciones obtenidas se evaluaron en los ensayos de fitotoxicidad y solo se seleccionaron las fracciones con mayor potencial de inhibición de germinación para continuar con la caracterización de núcleos por GC-MS y aislamiento de compuestos mayoritarios y posterior caracterización por RMN.

Inicialmente el extracto crudo se llevó a una columna de gravedad usando silica gel 60 (63-200 μm) (Panreac) eluída a gradiente con éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Las fracciones obtenidas fueron evaluadas los bioensayos de germinación a 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

A partir de los resultados de la evaluación en ensayos de germinación de semillas de estas fracciones, se seleccionaron las más activas, las cuales fueron comparadas por medio de cromatografía de capa fina (CCF) y en bioensayos a diferentes concentraciones para seleccionar la más promisoría. Con la fracción seleccionada se continuo el fraccionamiento, para la depuración de las muestras, aislamiento de compuestos mayoritarios y caracterización de núcleos de fracciones menos complejas. Para esta etapa se realizaron fraccionamientos sucesivos por medio de cromatografía de columna usando silica gel 60 (63-200 μm) como fase estacionaria, eluídas por solventes orgánicos. Para la purificación de compuestos se usaron columnas "flash" usando Sephadex® LH20 (Sigma Aldrich) como fase estacionaria eluídas con una fase móvil de cloroformo y metanol en una proporción 9:1 mL.

2.4.4 Caracterización de núcleos mayoritarios y elucidación de compuestos

2.4.4.1 Análisis de fracciones por GC-MS

Las fracciones menos complejas, derivadas de la fracción activa fueron sometidas a análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS por sus siglas en inglés). Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas simple cuadrupolo Agilent 5973N. A partir de las fracciones secas se prepararon soluciones de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en cloroformo. Se usó una columna DB-1MS marca Agilent 122-0132 de $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm d.i} \times 0.25 \text{ } \mu\text{m}$ de película. El método cromatográfico/espectrométrico corresponde a una temperatura del inyector de $250 \text{ }^\circ\text{C}$, modo de inyección split (1:1), flujo de la columna 0.20 mL/min , rampas de temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C/min}$ hasta $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), de $5 \text{ }^\circ\text{C/min}$ hasta $150 \text{ }^\circ\text{C}$ (6 min), de $5 \text{ }^\circ\text{C/min}$ hasta $200 \text{ }^\circ\text{C}$ (6 min) y de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ hasta $250 \text{ }^\circ\text{C}$ (15 min), gas de arrastre helio y volumen de inyección $0.10 \text{ } \mu\text{L}$. El modo de ionización fue ionización electrónica, la temperatura de la fuente de iones $230 \text{ }^\circ\text{C}$, la temperatura de la interfase de $150 \text{ }^\circ\text{C}$. La adquisición se hizo en modo SCAN, con m/z entre 30-800 UMA.

El pretratamiento de los archivos se realizó utilizando el software OpenChrom, aplicando una filtración de los scan vacíos, reducción del nivel de ruido y suavizamiento con el algoritmo de Savitsky-Golay. Posteriormente, los cromatogramas se trataron en MZmine V2.53 conforme lo establecido en la plataforma ADAP. La identificación presuntiva se realizó en el software NIST-MS Search, comparando con bases de datos espectrales NIST y GNPS (Mingxun Wang et al., 2016).

2.4.4.2 Caracterización de compuestos aislados por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los compuestos purificados, fueron caracterizados por medio de espectroscopia de RMN a temperatura ambiente ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$) utilizando un espectrómetro Bruker Avance DPX-300 MHz. Se corrieron experimentos unidimensionales ^1H , ^{13}C y DEPT-135 y bidimensionales de COSY, HMBC, HMQC utilizando el software del fabricante de acuerdo con la complejidad del compuesto. Los desplazamientos químicos en los espectros fueron registrados en partes por millón (ppm) sobre la escala δ , y las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hz.

2.5 Resultados

2.5.1 Concentración media inhibitoria y efectividad del extracto de *Q. humboldtii*

Para determinar la significancia del potencial del extracto de *Q. humboldtii* frente a los controles, se realizó una comparación de su actividad germinativa a diferentes concentraciones, contrastando su actividad con respecto al control positivo (CP) a base de glifosato a las mismas concentraciones. Esta prueba fue realizada a 1000, 2500 y 5000 mg*L⁻¹ tanto para los extractos de B8 como para CP, a su vez, se incluyó el control negativo (CN) de agua filtrada (figura 2.1). Se encontraron diferencias significativas entre el control positivo y el extracto a 1000 mg*L⁻¹, pero no a concentraciones mayores.

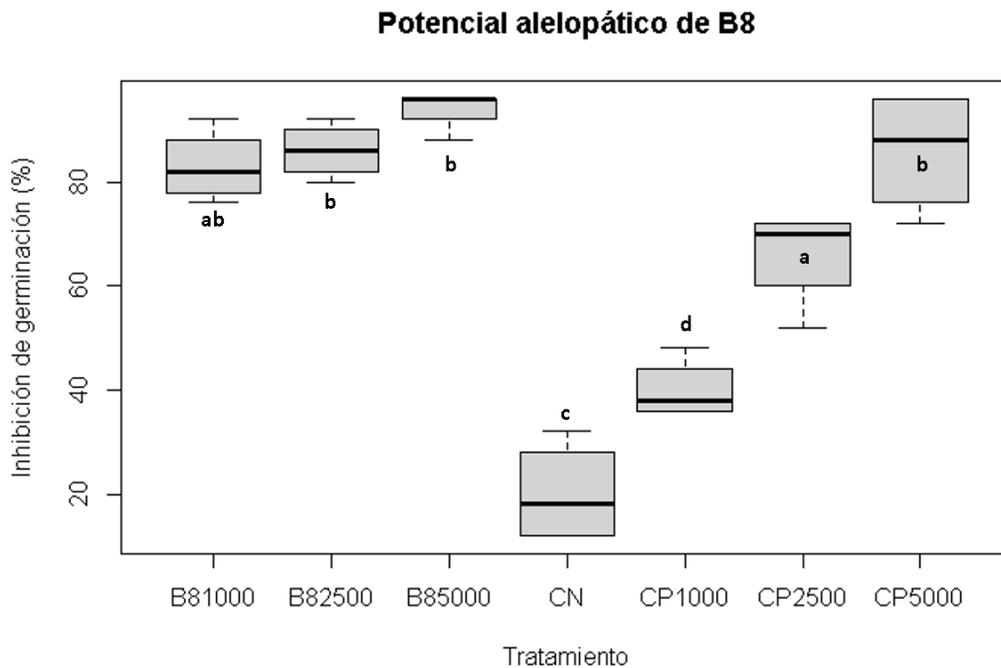


Figura 2.1 Comparación entre el porcentaje de inhibición entre el extracto de *Q. humboldtii* (B8) y CP a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L⁻¹. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo.

Al comparar en las semillas germinadas, la elongación de la radícula fue menor a las semillas del control negativo, pero a su vez se observaron diferencias significativas para todas las concentraciones de B8 con respecto a las muestras de control positivo (figura 2.2). Sin embargo, a concentraciones de a 5000 mg*L⁻¹ el extracto B8, exhibe un resultado

inhibitorio comparable a las concentraciones de 1000 y 2500 del herbicida comercial usado como control positivo.

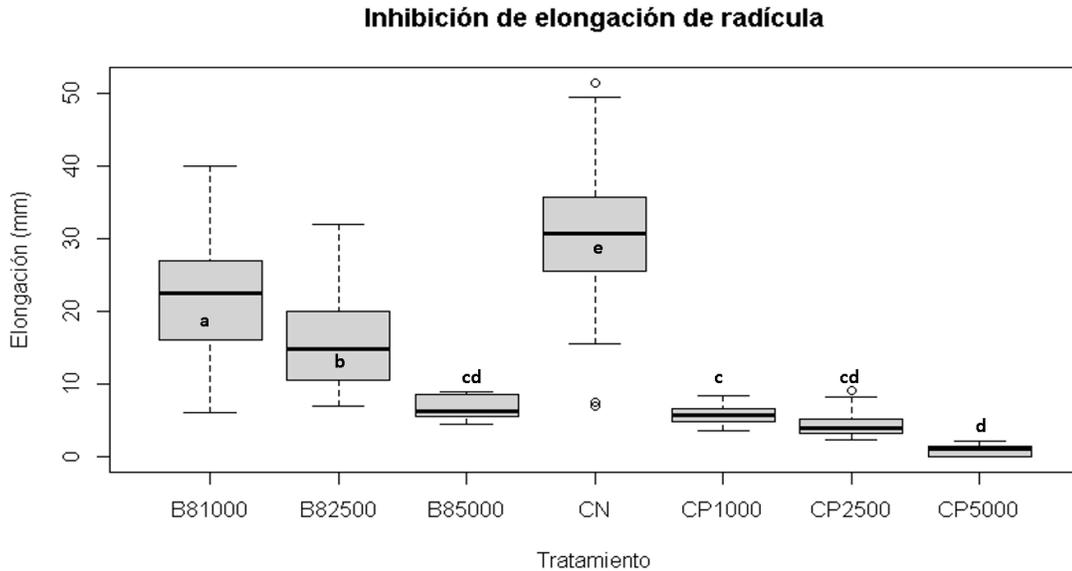


Figura 2.2 Comparación de los valores de elongación de la radícula de las semillas de lechuga germinadas a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L⁻¹ del extracto de *Q. humboldtii* (B8) y CP. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo.

En cuanto a la elongación del hipocótilo de las semillas germinadas, se observaron diferencias significativas a 2500 y 5000 mg*L⁻¹ con respecto al CN. Sin embargo, esta actividad no es tan fuerte como la del herbicida comercial (CP) (figura 2.3).

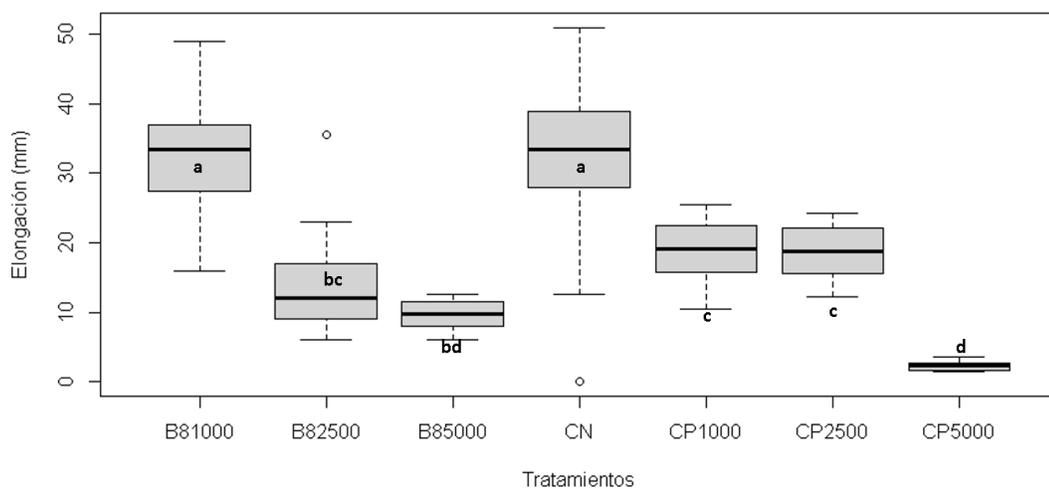


Figura 2.3 Comparación de los valores de elongación del hipocótilo de las semillas de lechuga germinadas a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L⁻¹ del extracto de *Q.*

humboldtii (B8) y CP. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo.

Luego de las comparaciones del efecto del extracto de *Q. humboldtii* con los controles (CP y CN), frente a la inhibición de la germinación de semillas, la elongación de la radícula y del hipocótilo, se determinó que la actividad más significativa se centró en la inhibición de la germinación de las semillas (germinicida). Por ello se calculó la dosis media (IC_{50}) del extracto para inhibir la germinación de las semillas de lechuga (figura 2.4). Se obtuvo una IC_{50} de 198 ppm para el extracto etanólico de *Q. humboldtii*.

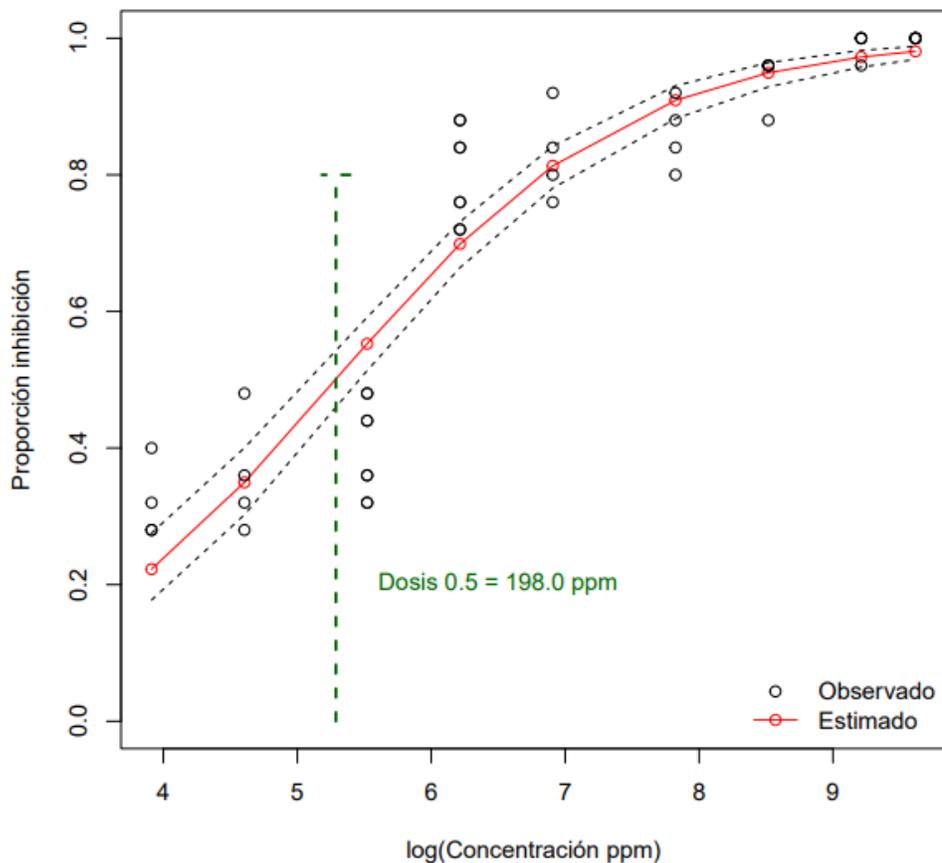


Figura 2.4 Grafica comparativa para la estimación de la dosis letal media (IC_{50}) en semillas de lechuga. Se utilizaron valores de concentración entre los 50 y los 10000 $mg \cdot L^{-1}$.

2.5.1.1 Fraccionamiento biodirigido

Los pasos seguidos para el fraccionamiento biodirigido con el extracto de *Q. humboldtii* desde el extracto inicial hasta la identificación de las fracciones activas y caracterización de los núcleos y compuestos en estas fracciones, se ilustra en la figura 2.5.

En el fraccionamiento inicial del extracto etanólico se obtuvieron fracciones (F1-F4), las cuales fueron sometidas a evaluación biológica (Tabla 2.1)

Tabla 2.1 Sistema de solventes a gradiente y fracciones obtenidas del fraccionamiento inicial del extracto crudo de *Q. humboldtii* proveniente de Belmira (B8)

Sistema de solventes	Relación	Volumen (mL)	Peso fracción (g)	Fracción final
EP	1	4000	5.308 x10 ⁻¹	F1
DCM	1	4000	4.230	F2
AE	1	4000	1.374	F3
M	1	4000	25.431	F4

Nota: EP: éter de petróleo, DCM: diclorometano, AE: acetato de etilo, M: metanol

Los resultados de las fracciones obtenidas en el primer fraccionamiento. F1, F2, F3 y F4, en los ensayos de inhibición de germinación de semillas de lechuga a una concentración inicial de 500 mg*L⁻¹ (figura 2.6), evidencian que F2 y F3, presentaron diferencias significativas con respecto a ambos controles (CP y CN).

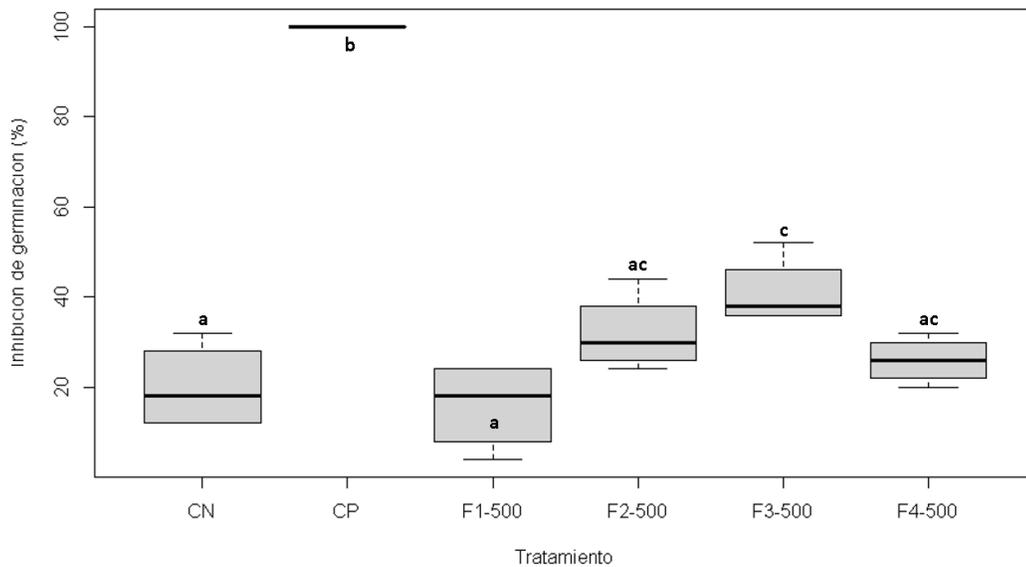


Figura 2.6 Comparación del potencial de inhibición de la germinación de semillas de lechuga a 500 mg*L⁻¹ de las fracciones F1-F4 de *Q. humboldtii*. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo

Al dosificar el control positivo a las mismas concentraciones de F2 y F3, se presentaron porcentajes de inhibición comparables al control positivo (figura 2.7).

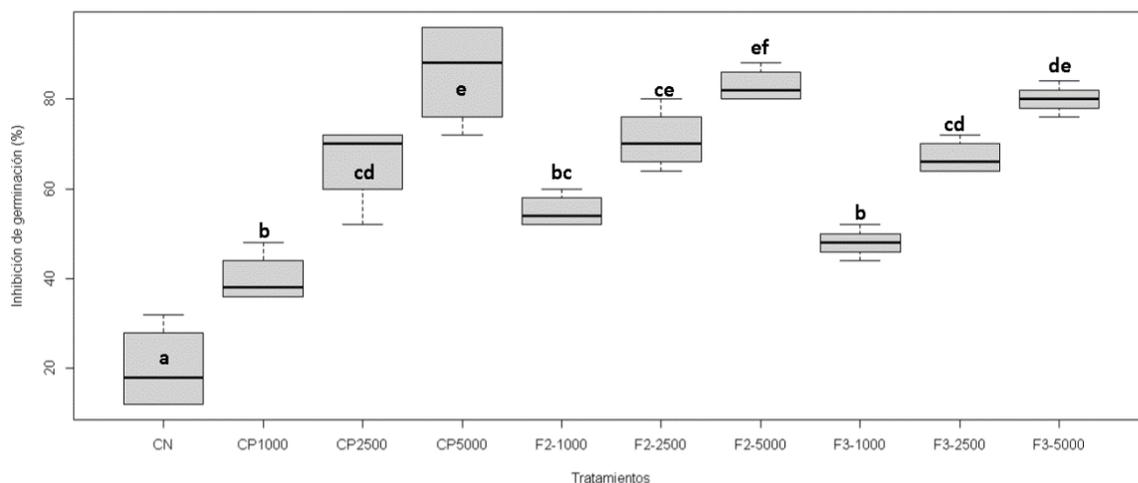


Figura 2.7 Comparación del porcentaje de inhibición de las fracciones F2 y F3 derivadas de *Q. humboldtii* con dosificación del control positivo (CP) a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L⁻¹. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo

Al ser F2 y F3, fracciones consecutivas en el fraccionamiento del extracto, se compararon por CCF con varios sistemas de solventes, pero no se agruparon por tener un perfil diferente como se observa en la figura 2.8.

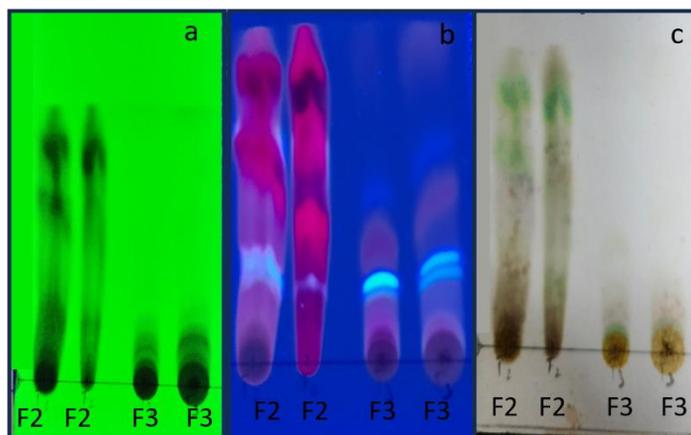


Figura 2.8 Comparación mediante CCF de la fracción F2 y F3. El sistema de elución hexano: acetato de etilo 4.5:0.5 ml. a-) Imagen a luz UV de 235 nm; b-) Imagen a luz UV 312 nm; c-) Imagen a luz visible utilizando revelador universal.

En los ensayos de inhibición de la elongación de radícula se observó que la fracción F2 a menor concentración es capaz de generar una inhibición en la elongación de la radícula, comparado con F3 a la misma concentración (figura 2.9).

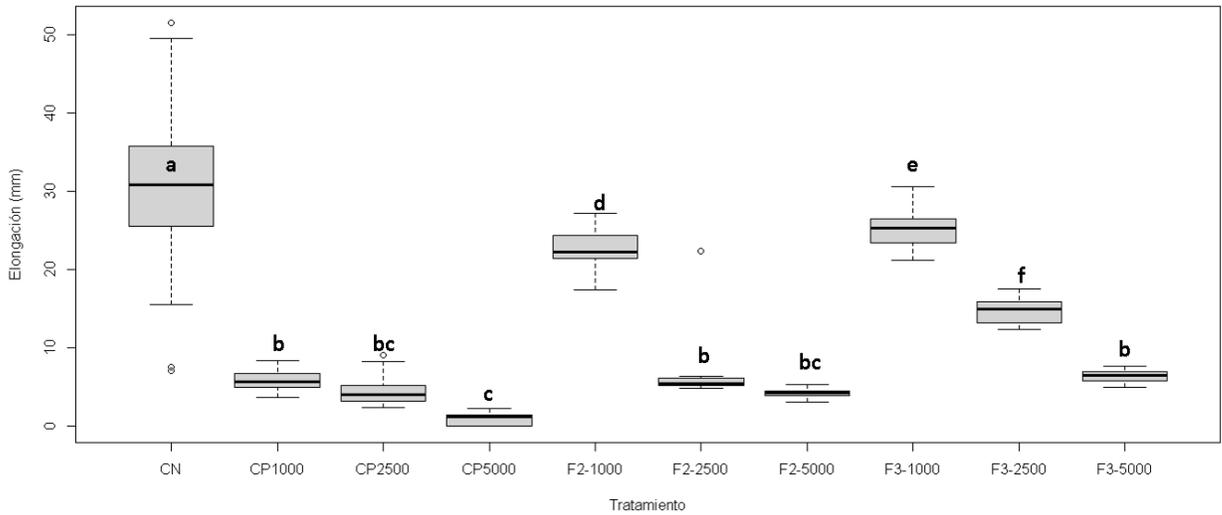


Figura 2.9 Comparación de la inhibición de la elongación de la radícula de semillas de lechuga por parte de las fracciones F2 y F3 derivadas de *Q. humboldtii* a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L⁻¹. Las muestras que poseen diferentes letras representan diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo

A su vez, en la inhibición de la elongación de la radícula la fracción F2 generó mayor inhibición que la fracción F3 a la misma concentración (figura 2.10).

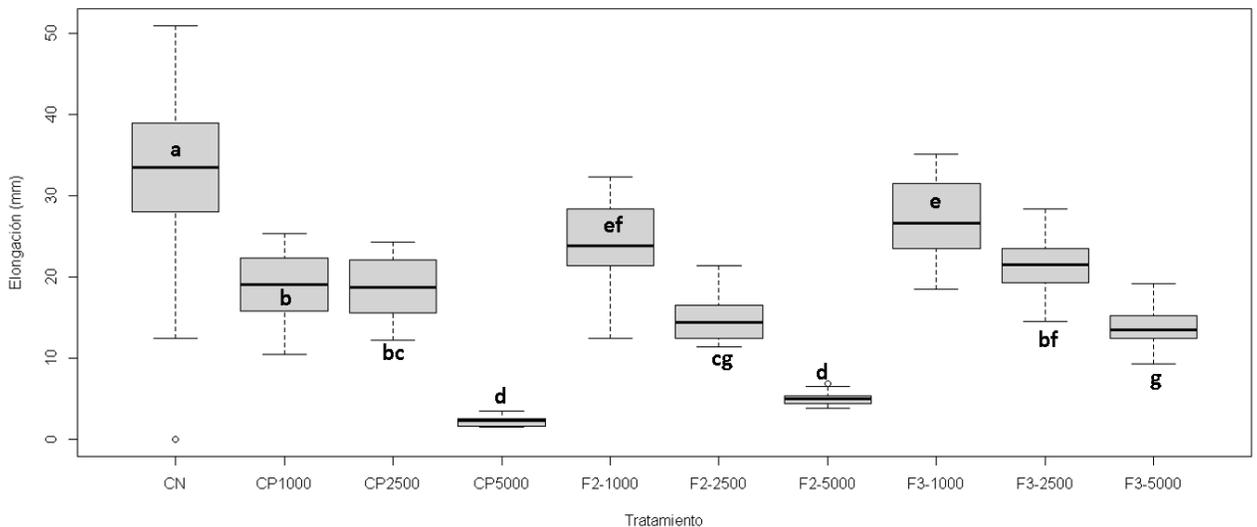


Figura 2.10 Comparación de la inhibición de la elongación del hipocótilo de semillas de lechuga por parte de las fracciones F2 y F3 derivadas de *Q. humboldtii* a concentraciones de 1000, 2500 y 5000 mg*L⁻¹. Las muestras que poseen diferentes letras representan

diferencias significativas entre sí según la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). CN: control negativo, CP: control positivo

Tras realizar los análisis respectivos de la elongación de la radícula y el hipocótilo de las semillas de lechuga sometidas a las fracciones F2 y F3 a diferentes concentraciones, se priorizo la fracción F2 para continuar con el fraccionamiento ya que a partir de una concentración de $2500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ comienza a presentar diferencias significativas con respecto a la fracción F3. Para el fraccionamiento de F2 por medio de cromatografía de columna con solventes orgánicos a gradiente, se obtuvieron 23 fracciones finales (Tabla 2.2), de las cuales las fracciones menos complejas F2-P, F2-2, F2-3, F2-8, F2-9, F2-10, se caracterizaron luego de pasar por GC-MS o fueron seleccionadas para la purificación de compuestos. Las fracciones con más clorofila no fueron caracterizadas en este trabajo.

Tabla 2.2 Sistema solventes a gradiente y fracciones obtenidas en el fraccionamiento de la fracción proveniente del extracto natural inicial (B8) con mayor potencial alelopático (F2)

Sistemas de solventes	Relación	Volumen (mL)	Fracción inicial	Peso fracción (mg)	Fracción final
H	1	200	F2-1	22	F2-1
H/C	9:1	200	F2-2	2	F2-2
H/C	8:2	200	F2-3	12	F2-3
H/C	7:3	200	F2-4	64	F2-4
H/C	6:4	200	F2-5	52	F2-5
H/C	1:1	200	F2-6		
H/C	4:6	200	F2-7	23	F2-6
H/C	3:7	200	F2-8	35	F2-7
H/C	2:8	200	F2-9	31	F2-8
H/C	1:9	200	F2-10	49	F2-9
C	1	200	F2-11		
C/AE	9:1	1600	F2-12	450	F2-10
C/AE	8:2	200	F2-13	125	F2-11
C/AE	7:3	200	F2-14	89	F2-12
C/AE	6:4	200	F2-15	52	F2-13
C/AE	1:1	200	F2-16	46	F2-14
C/AE	4:6	200	F2-17	53	F2-15
C/AE	3:7	200	F2-18	34	F2-16
C/AE	2:8	200	F2-19	41	F2-17
C/AE	1:9	200	F2-20	32	F2-18
AE	1	200	F2-21	45	F2-19
AE/M	9:1	400	F2-22	42	F2-20
AE/M	8:2	200	F2-23	35	F2-21
AE/M	7:3	200	F2-24	31	F2-22
AE/M	1:1	200	F2-25	50	F2-23
AE/M	3:7	200	F2-26		
M	1	200	F2-27		

Nota: H: Hexano, C: Cloroformo, AE: Acetato de etilo, M: Metanol

Derivado de la fracción F2, se obtuvo un precipitado (F2-P), el cual fue examinado por GC-MS junto con las fracciones menos complejas derivadas de F2 (F2-2, F2-3, F2-8, F2-9 y F2-10). Las fracciones F2-4, F2-5 y F2-6 fueron sometidas a purificación del núcleo mayoritario.

2.5.2 Caracterización de compuestos presentes en la fracción F2

2.5.2.1 Análisis de compuestos de la fracción F2 por GC-MS

En cuanto a la caracterización química de las fracciones derivadas de F2 por medio de GC-MS, se obtuvo inicialmente un precipitado de dicha fracción, el cual se denominó F2-P. Se reportaron 6 picos mayores, los cuales se asignaron tentativamente 4 núcleos esteroidales y 2 triterpenos (figura 2.11, espectros de masas en información suplementaria de los ANEXOS).

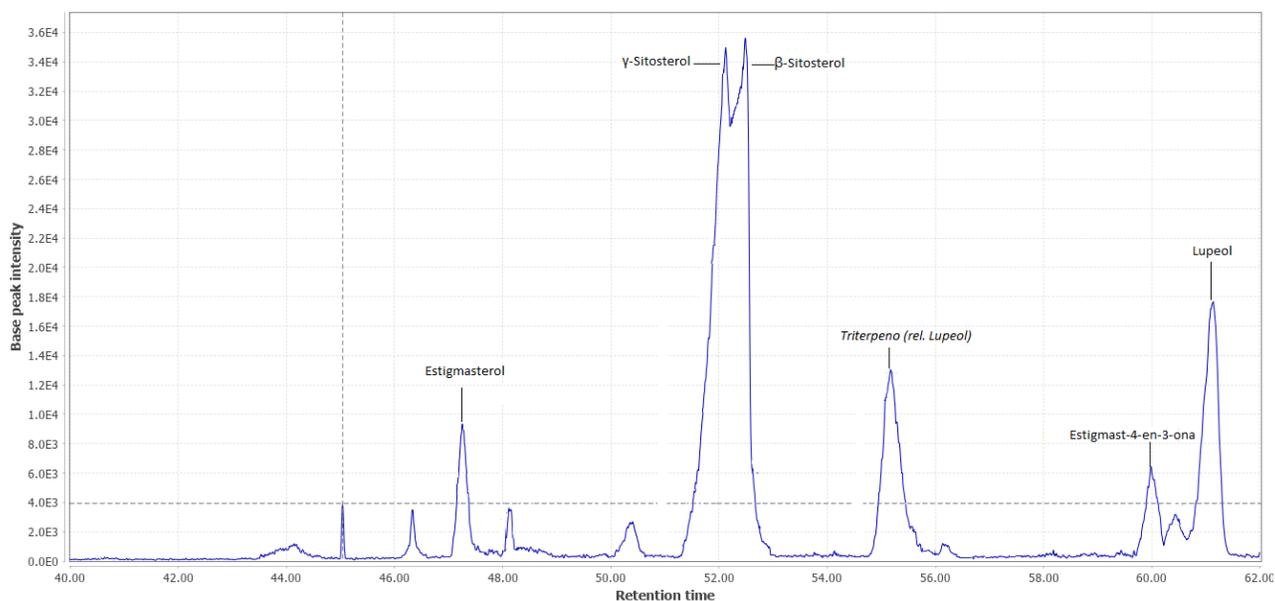


Figura 2.11 Cromatograma del precipitado (F2-P) obtenido de la fracción F2.

En las fracciones derivadas de F2, se detectaron núcleos de hidrocarburos, ácidos grasos, esteroides y triterpenos. Los compuestos tentativos que se asignaron estructuralmente se consignaron en la Tabla 2.3, junto con los fragmentos principales (m/z) y su abundancia relativa.

Tabla 2.3 Compuestos detectados por GC-MS en la fracción F2 de *Q. humboldtii*

Compuesto/Núcleo propuesto	Fracción	TR (min)	Abundancia relativa	Fragmentos m/z (intensidad relativa %)
Estigmasterol	F2-P	47.248	6.49	412 (30), 300 (16), 255 (22), 213 (12), 83 (54), 81 (51), 69 (64), 55 (100), 43 (61)
Sitosterol		52.122	42.05	414 (38), 381 (19), 354 (10), 329 (20), 303 (85), 255(46), 213 (27) 173, 145 (37), 107 (48), 81 (53), 43 (100).
		52.449	25.51	
<i>Triterpeno</i>		55.500	7.83	426, (21), 315 (12), 207 (49), 175 (19), 147 (27), 121 (48), 95 (72), 81 (74), 69 (75), 55 (84), 43 (100), 32 (20)
Estigmast-4-en-3-ona		61.139	4.07	412 (24), 124 (88), 95(33), 69 (32), 57 (42), 43 (100), 41 (52)
Lupeol		62.849	15.22	426 (10), 315 (12), 207(54), 81 (75), 55 (86), 44 (81), 43 (91), 32 (100)
6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona	F2-2	31.167	3.93	71 (37), 59 (33), 58 (79), 43 (100)
Heneicosanol		45.117	0.16	55 (92), 44 (83), 43 (100), 41 (77), 32 (94)
ester de ácido bis(2-etilhexil) hexanedioico		45.976	0.65	129 (100), 57 (75), 55 (60), 43 (61), 41 (50)
1-Docoseno		47.566	0.59	281 (10), 207 (13), 125 (15), 97 (53), 69 (67), 57 (82), 41 (71), 43 (100)
Ciclotetracosano		48.357	2.64	336 (4), 207 (7), 153 (8), 125 (13), 97 (68), 83 (71), 69 (72), 57 (88), 43 (100)
1-Hexacoseno		53.772	2.54	207 (10), 111 (25), 83 (55), 69 (54), 57 (86), 55 (68), 43 (100)
1-Dotriacontanol		57.554	1.85	281 (9), 207 (11), 111 (27), 83 (61), 57 (78), 55 (76), 44 (81), 43 (100), 32 (71)

17-Pentatriaconteno		57.898	4.67	355 (5), 281 (7), 221 (10), 153 (13), 125 (19), 97 (70), 83 (70), 57 (99) 55 (83), 43 (100)
Ácido dodecanoico etil ester	F2-3	21.573	0.65	228 (4), 183 (9), 157 (12), 101 (43), 88 (100), 55 (30), 41 (31)
Ácido pentadecanoico etil ester		29.533	1.53	256 (4), 213 (9), 157 (14), 101 (49), 88 (100), 55 (29), 41 (33)
Pinano		31.372	0.42	123 (26), 95 (72), 68 (84), 57 (75), 43 (100), 41 (69), 27 (53)
Ácido pentadecanoico etil ester		32.705	1.11	270 (4), 227 (7), 157 (12), 101 (51), 88 (100), 55 (29), 43 (44), 55 (29)
Isofitol		34.303	0.24	207 (2), 123 (5), 95 (10), 71 (100), 55 (16), 43 (29), 41 (16), 32 (22)
Ácido hexadecanoico etil ester		35.490	29.28	284 (13), 241 (14), 199 (7), 157 (18), 101 (63), 88 (100), 55 (23), 41 (19)
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico metil ester		37.742	0.46	258 (8), 150 (15), 108 (32), 91 (86), 79 (100), 67 (71), 55 (73), 41 (91)
Ácido heptadecanoico etil ester		37.871	2.02	298 (6), 255 (6), 157 (12), 101 (55), 88 (100), 55 (34), 43 (48), 41 (35)
Ácido 9,12-Octadecadienoico		38.773	4.06	280 (6), 109 (22), 82 (84), 81 (73), 67 (82), 55 (100), 41 (94)
Ácido 9,12-Octadecadienoico etil ester		39.710	8.62	308 (4), 263 (6), 150 (10), 123 (20), 95 (60), 81 (88), 67 (100), 55 (77), 41 (64)
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico etil ester		39.839	2.64	306 (2), 261 (4), 173 (4), 135 (12), 108 (32), 95 (53), 79 (100), 67 (71), 55 (52), 41 (59)
Etil oleato		40.037	7.25	310 (5), 264 (14), 222 (12), 180 (9), 110 (17), 83 (52), 69 (65), 55 (100), 43 (54), 41 (68)
Ácido octadecanoico etil ester		41.060	3.84	312 (10) 157 (12), 101 (58), 88 (100), 55 (31), 43 (47)

Ergosta-5-en-3-ol		55.981	1.61	414 (8), 323 (8), 273 (7), 231 (5), 205 (10), 163 (15), 123 (22), 95 (46), 69 (61), 57 (59), 55 (78), 43 (100), 41 (58)
Friedooleanan-2-ona		56.128	0.76	426 (34), 302 (16), 273 (19), 231 (20), 205 (18), 123 (42), 95 (64), 69 (91), 55 (86), 43 (100), 41 (71)
Fitol	F2-8	38.446	6.96	123 (20), 97 (14), 71 (100), 57 (34), 55 (30), 43 (44), 41 (33)
α -Tocoferol		46.182	12.03	430 (50), 165 (100), 164 (33), 55 (20), 43 (39)
1-Docosanetirol		47.583	2.32	355 (10), 207 (8), 147 (12), 111 (28), 83 (67), 69 (65), 57 (81), 55 (86), 43 (100)
1-Formil-2,2-dimetil-3-trans-(3-metil-but-2-enil)-6-metilidene-ciclohexano		49.569	1.53	275 (10), 207 (16), 165 (25), 123 (27), 95 (53), 69 (74), 55 (75), 44 (86), 43 (73), 32 (100)
Friedooleanan-3-ol		49.758	4.57	428 (10), 395 (12), 275 (16), 231 (24), 165 (67), 69 (96), 55 (100), 44 (84), 43 (78)
Cyclotetracosane		51.133	3.62	281 (3), 207 (8), 125 (20), 97 (64), 83 (73), 57 (90), 55 (90), 43 (100)
Friedooleanan-3-ona		51.606	19.53	426 (12), 341 (16), 302 (15), 273 (16), 109 (62), 95 (79), 81 (66), 69 (100), 55 (86), 41 (58)
<i>Triterpeno</i>		57.546	3.69	444 (62), 201 (95), 55 (57), 43 (100), 41 (56)
Estigmastan-3,5-dieno		61.233	3.69	396 (52), 147 (48), 81 (32), 55 (64), 44 (90), 43 (100), 41 (59), 32 (89)
5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil 2(4H)-Benzofuranona,		F2-9	18.840	3.08
6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona	31.209		0.49	207 (3), 109 (14), 71 (37), 58 (67), 57 (39), 43 (100), 32 (47)

Ácido n-hexadecanoico	35.180	19.92	256 (16), 213 (16), 185 (8), 157 (10), 139 (35), 97 (19), 73 (100), 60 (86), 57 (72), 43 (98), 41 (78)
Ácido 9,12-Octadecadienoico	39.134	0.65	280 (5), 207 (3), 95 (40), 67 (61), 55 (65), 43 (67), 41 (77), 32 (100)
Ácido 9-Octadecenoico	39.461	4.44	264 (10), 111 (16), 83 (46), 69 (68), 55 (100), 43 (64), 41 (81)
Ácido Octadecanoico	40.380	2.95	284 (12), 241 (9), 185 (10), 129 (28), 97 (20), 73 (73), 57 (67), 55 (68), 43 (100), 41 (69)
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olido	45.057	1.10	429 (11), 355 (17), 281 (14), 221 (20), 147 (37), 99 (59), 73 (100), 55 (25), 43 (36)
Ácido eicosanoico	45.753	1.14	312 (15), 269 (6), 129 (24), 97 (20), 73 (66), 57 (68), 55 (70), 43 (100), 41 (69)
<i>Triterpeno</i>	46.174	0.45	424 (15), 207 (10), 95 (42), 69 (58), 55 (92), 43 (100), 41 (74), 32 (67)
Ácido docosanoico	48.907	2.03	340 (13), 129 (24), 98 (22), 73 (62), 57 (79), 55 (66), 43 (100), 41 (59)
β -Amirina	51.873	5.92	218 (100), 189 (16), 95 (22), 69 (36), 43 (33), 55 (31)
α -Amirina	54.812	4.68	218 (100), 189 (22), 161 (16), 69 (32), 55 (40), 43 (44), 41 (31)
<i>Núcleo esteroidal</i>	60.563	1.56	416 (23), 273 (12), 151 (48), 123 (37), 95 (52), 69 (75), 55 (81), 44 (81), 43 (77), 32 (100)
Lupeol	62.712	3.69	426 (11), 315 (10), 207 (47), 147 (76), 73 (100), 55 (48), 43 (56), 32 (47)
<i>Triterpeno</i>	63.537	2.69	413 (10), 275 (12), 231 (24), 165 (67), 95 (83), 69 (99), 55 (100), 43 (91), 32 (97)

Friedooleanan-3-ona		65.136	3.55	426 (10), 273 (19), 123 (52), 95 (71), 81 (62), 69 (100), 55 (90), 41 (60), 32 (70)
Ácido n-hexadecanoico	F2-10	35.180	10.79	256 (16), 213 (13), 129 (33), 73 (100), 60 (86), 57 (72), 43 (98), 41 (78)
Ácido -9-Octadecenoico		40.071	34.67	264 (10), 111 (14), 83 (49), 69 (67), 67 (50), 55 (100), 43 (55), 41 (81)
Ácido octadecanoico		40.724	5.37	284 (10), 129 (21), 98 (29), 73 (61), 57 (63), 55 (98), 43 (100), 41 (97)
(E)-5-Eicoseno		41.403	2.60	280(10), 123 (12), 97 (31), 69 (62), 57 (66), 55 (92), 43 (100), 41 (86)
(Z)-9-Octadecenal		47.154	4.75	295(12), 129 (59), 81 (43), 69 (53), 55 (100), 43 (55), 41 (73)
Acido (Z)-, 2-hidroxy-1-(hidroxymeti- 9-octadecenoico etil ester		50.790	7.54	256 (16), 129 (33), 97 (18), 73 (100), 60 (86), 57 (72), 43 (98), 41 (78)

TR: Tiempo de retención

De esta serie de compuestos se destacan alcoholes y ácidos grasos de cadena larga, monoterpenos cíclicos, triterpenos, esteroides y productos derivados de la ruta metabólica del escualeno. Este último fue detectado en por GC-MS en la fracción F1 (TR. 54.185 min, (Mz/Abundancia) (191 (1), 149 (5), 121 (9), 95 (14), 81 (48), 69 (100), 67 (15), 55 (18), 41 (38)). Adicionalmente en esta fracción F1, se encontró 2-metil-Z,Z-3,13-octadecadienol (TR. 47.008), (Mz/Abundancia) (336 (1), 207 (3), 163 (5), 129 (17), 95 (42), 81 (67), 67 (89), 55 (100), 43 (63), 41 (95)).

En la figura 2.12 se observan las estructuras químicas de los terpenos y esteroides detectados en por GC-MS, por medio de las librerías de NIST y GNPS, los cuales se asignaron como los compuestos allí presentados.

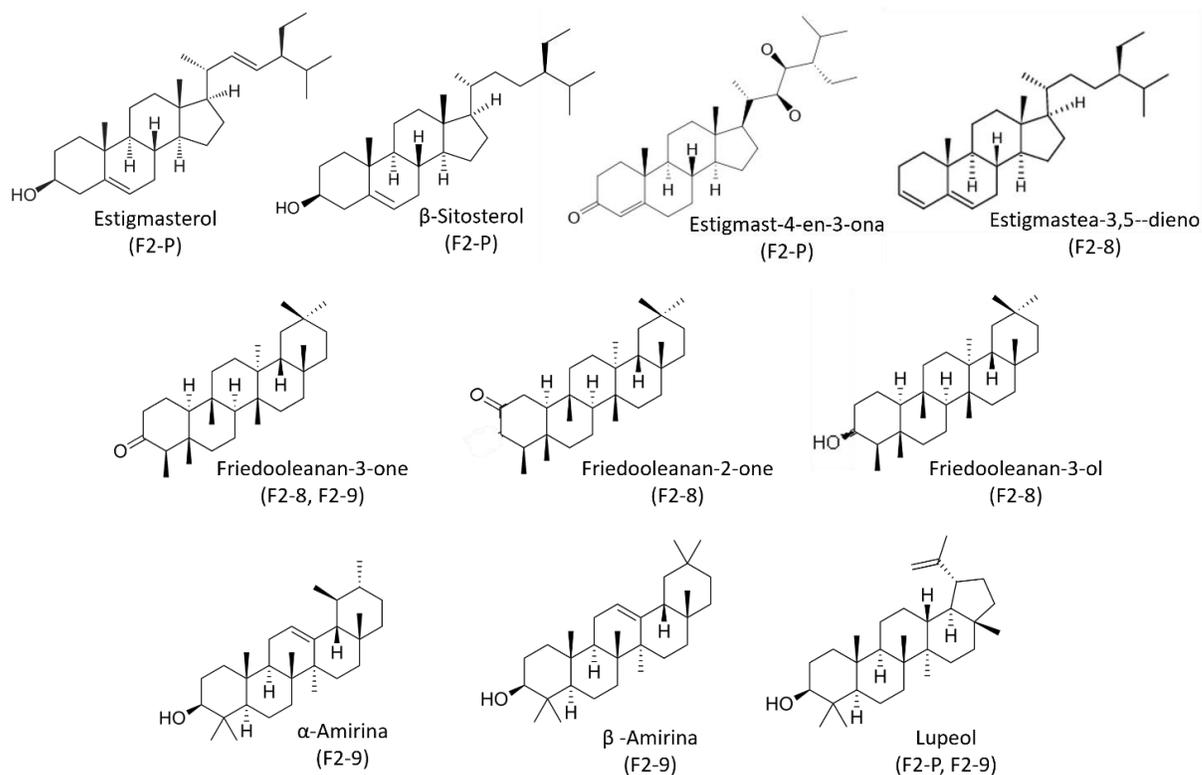


Figura 2.12 Esteroides y triterpenos detectados por GC-MS en las fracciones derivadas de F2 de *Q. humboldtii*.

Algunos de estos compuestos fueron confirmados con el posterior aislamiento e identificación por RMN descrita a continuación. Espectros de RMN completos se incluyeron en información suplementaria de los ANEXOS.

2.5.2.2 Aislamiento y elucidación estructural de compuestos purificados de F2

El compuesto **C1**, se precipitó de F2-1, como un líquido incoloro que al secar deja un residuo blanco. Las señales espectrales para este compuesto fueron: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1.32 (20H, s, CH_2 -2 - CH_2 -11), 0.92 (6H, m, CH_3 -1, CH_3 -12); ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 31.96 (CH_2 -3, CH_2 -10), 29.75 (CH_2 -5, CH_2 -8), 29.49 (CH_2 -4, CH_2 -9), 22.73 (CH_2 -2, CH_2 -11), 14.18 (CH_3 -1, CH_3 -12) ppm. Con esta información, el compuesto este alcano fue identificado como dodecano (https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_112-40-3_1HNMR.htm).

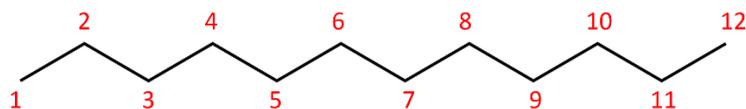


Figura 2.13 Estructura del compuesto **C1** (dodecano), aislado de la fracción F2 de *Q. humboldtii*.

El compuesto **C2** fue purificado de las fracciones F2-4 y F2-5 por precipitación. Ambas fracciones presentaron un precipitado por lo que fueron re-suspendidas con éter de petróleo frío (-17 °C), el sobrenadante se separó por decantación y luego de realizar este procedimiento en varias oportunidades se obtuvo un cristal blanco. En CCF, se verificó su pureza con un R_f de 0.6 con el sistema hexano/cloroformo 6:4. Este compuesto (cristal blanco) exhibió las siguientes señales espectrales: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 2.40 (1H, dd, H_a -2), 2.40 (1H, dd, H_b -2), 2.32 (1H, q, H-4), 2.00 (1H, m, H_a -1), 1.83 (1H, d, H_a -6), 1.77 (1H, m, H_b -1), 1.76 (1H, m, H_a -16), 1.74 (1H, m, H-18), 1.64 (2H, m, H_a -21), 1.63 (1H, m, H-10), 1.59 (1H, m, H_a -7), 1.52 (2H, m, H-11), 1.52 (1H, m, H_a -15), 1.42 (1H, m, H_a -19), 1.40 (1H, d, H-8), 1.38 (1H, m, H_b -7), 1.38 (2H, m, H-12), 1.36 (1H, m, H_b -19), 1.34 (2H, m, H-12), 1.34 (1H, m, H_b -16), 1.29 (1H, m, H_b -21), 1.23 (1H, m, H_b -15), 1.22 (3H, s, CH_3 -28), 1.09 (3H, s, CH_3 -27), 1.03 (3H, s, CH_3 -26), 1.02 (3H, s, CH_3 -30), 0.99 (3H, s, CH_3 -29), 0.92 (3H, s, CH_3 -23), 0.91 (3H, s, CH_3 -25), 0.76 (3H, s, CH_3 -24); ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 213.39 (C-3), 59.48 (C-10), 58.25 (C-4), 53.12 (C-8), 42.80 (C-18), 42.19 (C-5), 41.57 (C-2), 41.30 (C-6), 39.72 (C-14), 39.28 (C-22), 38.32 (C-13), 37.46 (C-9), 36.03 (C-16), 35.36 (C-19), 35.2 (C-11), 35.07 (C-30), 32.78 (C-21), 32.44 (C-12), 32.12 (C-28), 31.8 (C-29), 30.53 (C-15), 30.00 (C-17), 28.20 (C-20), 22.32 (C-1), 20.30 (C-27), 18.90 (C-26), 18.71 (C-7), 18.30 (C-25), 14.30 (C-24), 6.80 (C-23) ppm.

La información espectroscópica obtenida de ^1H RMN, se presenta en la figura 2.14 un acercamiento de las señales obtenidas.

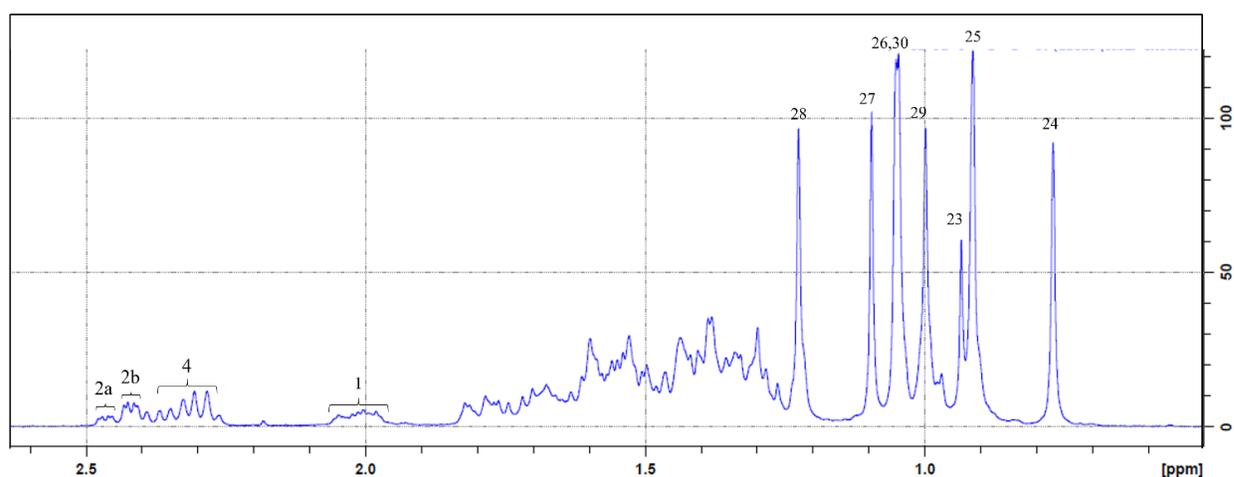


Figura 2.14 Acercamiento del espectro de ^1H RMN del compuesto **C2**.

El espectro de ^{13}C RMN indico la presencia de un esqueleto de 30 carbonos, como se muestra en la figura 2.14.

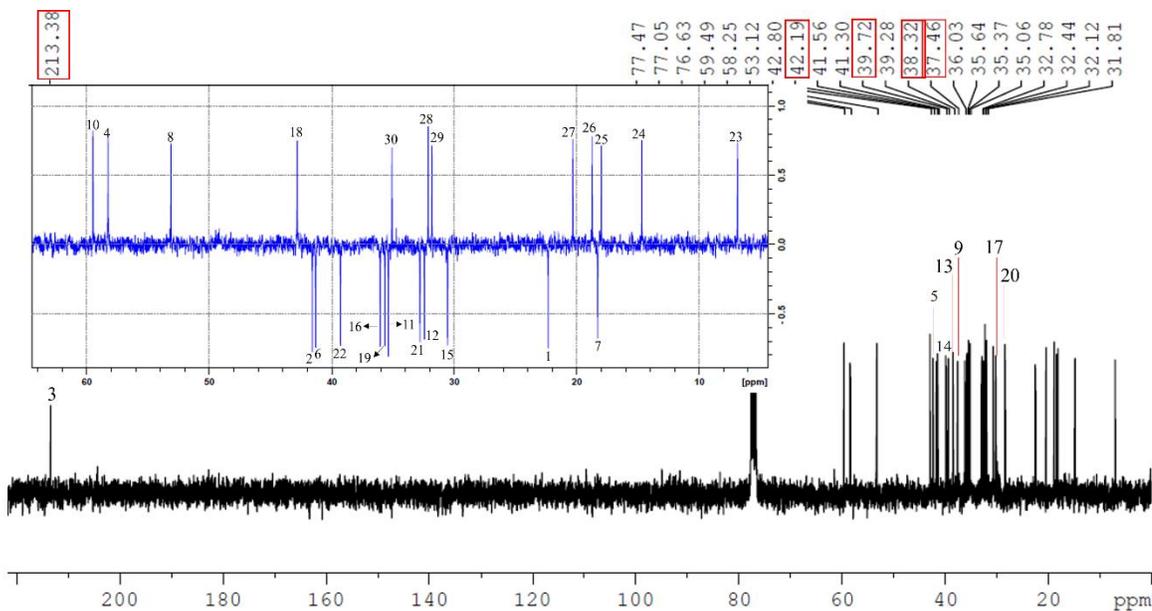


Figura 2.15 Espectro de ^{13}C RMN y Dept-135 del compuesto **C2** con asignaciones de los carbonos

Los datos espectrales fueron comparados con los datos reportados y con ello se confirmó la estructura del triterpeno pentacíclico, Friedooleanan-3-ona, conocido como Friedelina (Escobedo-Martínez et al., 2012) (figura 2.16).

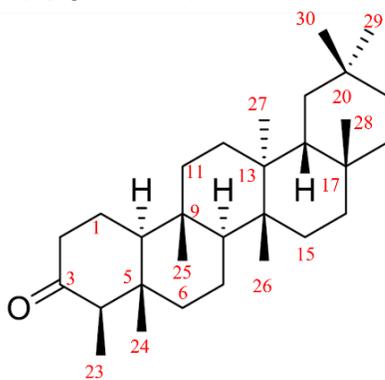


Figura 2.16 Estructura del compuesto **C2** (Friedelina), aislado de la fracción F2 de *Q. humboldtii*.

De la fracción F2-6 (figura 2.5), resultado de la cromatografía de columna con Sephadex-L20 en un sistema cloroformo/metanol 6:4, se separó un sólido blanco de la fracción F2-6 se obtuvo un sólido de color amarillo tenue, el cual fue re-suspendido con hexano frío (-17 °C), luego de esto el sobrenadante fue retirado dejando un sólido blanco. La pureza del

compuesto se verificó por CCF con los sistemas de solventes: hexano/acetona (7:3), $R_f = 0,6$ y cloroformo/metanol (9:1), $R_f = 0,8$

El compuesto **C3** exhibió las siguientes señales espectrales: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 5.34 (1H, t, H-6), 3.51 (1H, m, H-3), 2.33 (1H, d, Ha-12), 2.27 (1H, d, Hb-12), 0.95 (3H, d, CH_3 -19), 0.88 (3H, t, CH_3 -24), 0.85 (3H, d, CH_3 -26), 0.83 (3H, d, CH_3 -27), 0.71 (3H, s, CH_3 -29), 0.64 (3H, s, CH_3 -28); ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 140.78 (C-5), 121.78 (C-6), 71.85 (C-3), 56.79 (C-14), 56.06 (C-17), 50.14 (C-9), 45.84 (C-22), 42.34 (C-13), 42.34 (C-4), 39.79 (C-12), 37.27 (C-1), 36.53 (C-10), 36.18 (C-18), 33.95 (C-20), 31.92 (C-8), 31.68 (C-7), 29.74 (C-2), 29.14 (C-25), 28.29 (C-16), 26.05 (C-21), 24.34 (C-15), 23.07 (C-23), 22.5 (C-11), 20.2 (C-26), 19.8 (C-27), 18.9 (C-28), 18.6 (C-19), 12.2 (C-29), 12.1 (C-24) ppm.

El compuesto **C3** mostró la presencia de seis señales de metilos, y señales para 29 carbonos, las cuales se pudieron asignar con apoyo del espectro dept-135. Por medio de la comparación de los datos espectrales con lo reportado en la literatura, se identificó este núcleo esteroidal como el β -sitosterol (Saeidnia et al, 2014) (figura 2.17).

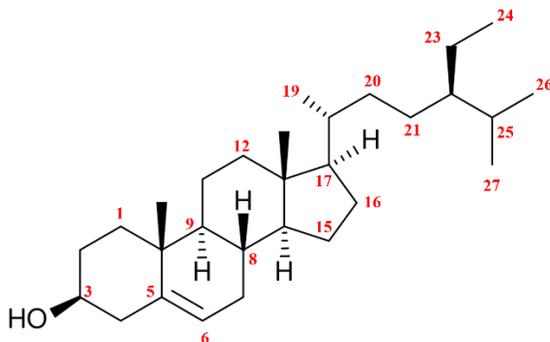


Figura 2.17 Estructura del compuesto **C3** (β -Sitosterol), asilado de la fracción F2 de *Q. humboldtii*.

2.6 Discusión

2.6.1 Dosificación del extracto de *Q. humboldtii*

El potencial alelopático de *Q. humboldtii* pudo evidenciarse al comparar el efecto del extracto crudo contra el control positivo a las mismas dosis sobre la germinación y desarrollo de semillas de lechuga como especie receptora (figuras 2.1 a 2.3). Entendiendo la alelopatía como la “inhibición del crecimiento de una planta por el efecto de un compuesto bioquímico liberado en el medio por otra planta” (Mallik, 2008), el uso del modelo de germinación de semillas de rápido desarrollo (ej. Lechuga) es ampliamente validado (Avelar Amado et al., 2020; Bouafiane et al., 2021). Sin embargo, en la literatura no se reporta comúnmente el uso de un control positivo (CP) evaluando comparativamente el efecto dosis-respuesta, para validar la eficacia de los extractos o muestras de origen vegetal. De tal forma, el extracto crudo de *Q. humboldtii* presentó un mayor potencial

germinicida respecto al CP como se observa en la figura 2.1 y adicional a esto, presentó similitudes en su potencial inhibitorio de elongación de radícula (figura 2.2) que es una de las funciones que cumple el glifosato en campo. A la luz de estas evidencias, se debe anotar que el uso principal del glifosato no es de inhibición de germinación dado que este compuesto es utilizado como inhibidor de la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa, que afecta la ruta del ácido shiquímico y la obtención de aminoácidos aromáticos, que derivan en la senescencia de las plantas por la reducción de la elongación de su radícula, así como la imposibilidad de producir proteínas constitutivas (Avelar Amado et al., 2020). Por ello, la inhibición de la radícula con el extracto de *Q. humboldtii*, es considerada como promisoría.

Adicionalmente, cabe destacar que el control positivo fue un solo compuesto activo (glifosato), y además se puede pensar que dicha comparación acude a la premisa de que su condición de herbicida de baja selectividad, de carácter sistémico y ampliamente utilizado en la agricultura (Riaño et al., 2020) pueda ser útil para percibir los posibles puntos de acción que pueda presentar el extracto crudo. Sin embargo, dicho el extracto crudo de *Q. humboldtii*, es una mezcla compleja de todas las posibles estructuras químicas presentes en el citosol en el momento de la extracción con etanol, por lo cual cada metabolito está a concentraciones menores en esta mezcla. Esto quiere decir que su potencial alelopático se basa en una serie de interacciones entre moléculas con respecto al modelo de prueba, lo que hace pensar que el extracto puede ser un candidato para una formulación de un producto natural asociado. Con respecto al cálculo de la concentración media inhibitoria de la germinación (IC_{50} 198 ppm), se encontró que para los rangos manejados para otras plantas que se les ha evaluado su potencial alelopático, esta se encuentra dentro del rango de valores reportados en la literatura encontrada ya que (Hamdi et al., 2017) reportó una dosis media inhibitoria de $1,09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en extractos de *Haplophillum tuberculatum*, así como (Mominul Islam et al., 2018) reporta dosificaciones medias de 5% (w/v) en diversas especies de plantas medicinales de Egipto. Se destaca que el género *Quercus* no ha sido reportada la actividad alelopática, debido a que el enfoque predominante está en la farmacéutica, y alimentación humana (Morales, 2021).

Por último, cabe resaltar que el roble andino no ha sido estudiado con el objetivo de caracterizar su potencial alelopático, sino que los estudios realizados apuntan más al sector alimentario en la búsqueda de compuestos antioxidantes (González et al., 2008; Martínez-Gil et al., 2018; Misra et al., 1989), así como el uso de las bellotas como reemplazante del café debido a la presencia de compuestos aromáticos de características específicas (Díaz-Rojas et al., 2019). De esta búsqueda se observó que la funcionalidad del roble en Europa, Estados Unidos y México está dedicada a las actividades vitivinícolas (Martínez-Gil et al., 2018), de obtención de antioxidantes de carácter terpenico (Vieira et al., 2020) así como caracterizaciones de especies como *Q. cerris* (Vieira et al., 2020), *Q. coccifera* (Sari et al., 2019), *Q. suber* (Castola et al., 2002).. Esto invita a pensar que posiblemente el extracto de roble andino pueda llegar a ser un potencial agente germinicida. Además, es de destacar que las sustancias de origen natural pueden presentar un bajo impacto al medio ambiente debido a que su procedencia y finalidad está

marcada por un organismo vivo que busca su supervivencia en un entorno afectando específicamente a un competidor o un depredador específico (Kaur et al., 2022).

2.6.2 Fraccionamiento biodirigido

La literatura especializada reporta que en especies con potencial alelopático pueden existir preferencias a los extractos polares que contienen un gran contenido de ácidos aromáticos, fenoles, flavonoides y taninos (García-Villalba et al., 2017). A su vez la literatura reporta que el ácido gálico, así como sus derivados producto de su ruta metabólica presentan un potencial alelopático para el control del crecimiento de plantas (Touati et al., 2015). Por otro lado, existen registros de la utilización de estructuras terpenoides provenientes tanto de la ruta del escualeno como monoterpenos como el α -pineno utilizado con estos fines (Khursheed et al., 2022b). Además, el uso de aceites esenciales con una cantidad considerable de ácidos grasos y compuestos apolares cíclicos ha venido tomando fuerza (Abd-ElGawad et al., 2020; Jiang et al., 2021), y es interesante esta afirmación ya que gran parte de las plantas del mundo en sus hojas y tallos poseen una gran concentración de dichos compuestos. Se ha reportado que, en las especies del neotrópico, el xilema de las plantas ha presentado una concentración de agentes apolares pertenecientes a estas familias de compuestos (Huang et al., 2023), lo que apoya el uso de extractos de hojas rico en compuestos apolares como una opción viable en la búsqueda de agentes bioherbicidas. Como lo demuestra la literatura, la probabilidad de encontrar actividad en diferentes fracciones de un extracto es amplia por lo que con el fraccionamiento biodirigido es posible enfocar la búsqueda de metabolitos activos.

Con respecto al fraccionamiento biodirigido de *Q. humboldtii* (figura 2.5) se observó que del fraccionamiento inicial (Tabla 2.1), las fracciones de baja a mediana polaridad F2 y F3 fueron las más promisorias (figura 2.6). De estas dos fracciones, la de menor polaridad (F2) se destacó en los ensayos con dosificaciones (figuras 2.9 y 2.10), enfocando la purificación y detección de compuestos hacia la menor polaridad. En cuanto al tipo de compuestos poco polares presentes en estas fracciones, la actividad es comparable con lo reportado en la literatura con especies de cardos *Cynara cardunculus*, así como arbustos pequeños como *Artemisia scoparia*, *Bassia muricata*, *Haplophyllum tuberculatum* (Abd-ElGawad et al., 2020; Kaab et al., 2020; Hamdi et al., 2017; Scavo et al., 2020). También se destaca el estudio realizado sobre los extractos poco polares de *Banisteropsis anisandra* (Freitas et al., 2015). Fracciones y extractos poco polares como potencial agente de pre emergencia de plántulas también se reportó con aceites esenciales de *Schinus terebinthifolia*, así como el estudio realizado con *Mesosphaerum suaveolens*, en estos estudios se observó la posible afectación a las plántulas emergentes que en su hábitat se da al realizar la descomposición de sus hojas al desarrollo de otras especies (Almeida-Bezerra et al., 2022; Fernandes et al., 2023).

Por lo general la condición de la polaridad de los compuestos resulta crucial para la actividad biológica, en fracciones como F2 de baja-media polaridad, es de considerar la presencia de ácidos grasos, pueden generar alteraciones en la permeabilidad de la

membrana celular, lo que puede provocar daños a la célula debido a un efecto osmótico (Cordeau et al., 2016; Reichert Júnior et al., 2019). Adicional a esto se cree posible que existan moléculas que por su potencial antioxidante y debido a su concentración, en una actividad sinérgica con ácidos grasos u otro tipo de moléculas también afectan la permeabilidad de la membrana celular, al ingresar al citoplasma de las plantas y generar un efecto en el desarrollo celular (Avelar Amado et al., 2020). Así mismo ciertos compuestos con actividad antioxidante pueden verse relacionados con una actividad inhibitoria de enzimas relacionadas al metabolismo primario celular como la α -amilasa, α -glucosidasa y la tirosinasa (Sari et al., 2019), las cuales son fundamentales en la obtención de energía por el desdoblamiento de almidón, glucosa y proteína respectivamente, pueden ser objetivos de estos productos naturales. Cabe resaltar que estos posibles mecanismos de acción están supeditados a interacciones complejas y que su estudio depende de modelos específicos que abordan solo partes de una posible ruta metabólica a afectar teniendo en cuenta factores antagónicos por parte de otro tipo de moléculas no estudiadas y que puedan tener efectos adversos al buscado en este estudio (potenciales fertilizantes) (Choudhary et al., 2023; Radhakrishnan et al., 2018).

2.6.3 Núcleos y compuestos presentes en la fracción activa F2

Tras el análisis de los resultados de GC-MS y contrastando los hallazgos con la literatura, los compuestos encontrados tienen una consonancia con lo mencionado por varios autores (Castola et al., 2002; Elham et al., 2021; López-Hidalgo et al., 2021; Touati et al., 2015; Vieira et al., 2020), respecto a los componentes apolares como ácidos grasos, terpenoides y esteroides (Tabla 2.3). Estos dos últimos grupos relacionados biosintéticamente, fueron los más abundantes en el análisis por GC-MS, además en un tamizaje inicial de la fracción F1 que, aunque no presento bioactividad se consideró relevante por tener semejanzas cromatográficas con F2, se detectó escualeno, compuesto precursor de estos grupos. Otro hallazgo relevante en F1 fué el compuesto 2-metil-Z,Z-3,13-octadecadienol, el cual ha sido reportado como agente herbicida proveniente de *Lagenaria brevifolia* (Adeyemi et al., 2018) observando así una relación con respecto a la presencia de potenciales agentes herbicidas o que expliquen el potencial herbicida en fracciones menos polares. Siguiendo con el enfoque en F2, en su caracterización se observó que se presentan núcleos estructurales de monoterpenos y triterpenos, de estos últimos se observó la presencia de estructuras tetra y penta cíclicas, que son típicas de la formación de estructuras esteroidales, esto se puede confirmar debido a ciertos patrones de fragmentación observados en los espectros de masas obtenidos en el análisis de GC-MS, donde la mayoría de compuestos triterpenoides de tipo esteroideal presentaban picos significativos en los fragmentos de masa de 426, 373 o 347, 207, 191, 109, 101, 55, 43, 32, este patrón resulta característico dado que algunos autores (Manoharan et al., 2005; Rodrigues et al., 2017; Salazar et al., 2000) también reportan resultados similares en su patrón de fragmentación en GC-MS, aun así es de resaltar que los métodos de ionización para reconocimiento de fragmentos puede llegar a variar, aun así, los fragmentos presentan similitudes. Estas estructuras de las cuales se destacan los lupanos, oleanos y friedelanos, hacen presencia y se posicionan como uno de los compuestos mayoritarios, esto debido a

que su posible ruta biosintética los implica como productos intermedios y sucesivos para su respectiva obtención (Dinday & Ghosh, 2023). De tal forma, la presencia de estos núcleos en el roble andino es concordante con lo apreciable en la literatura, ya que, en otras especies del género, como lo son *Q. coxifera*, *Q. cerris* y *Q. suber* la obtención de compuestos terpenoides está documentada (Castola et al., 2002; Elham et al., 2021; López-Hidalgo et al., 2021; Touati et al., 2015; Vieira et al., 2020). En este sentido es de destacar la presencia del estigmasterol, γ -sitosterol y friedooleanan-3-ona, compuestos reportados en especies del género *Quercus*, el último triterpeno, reportado en 12 especies del género (Chandler, 1979; Vieira et al., 2020). Todos ellos cuentan con potencial inhibitorio de enzimas como la α -amilasa y α -glucosidasa (Rodrigues et al., 2017; Sari et al., 2019). Así mismo es de destacar la presencia de estructuras derivadas del pineno como el pinano que está reportado como un potencial bioherbicida (Khursheed et al., 2022b).

Es de destacar que los compuestos estigmasterol y el sitosterol son recurrentes en plantas, estos pueden llegar ser más conocidos como stigmastanos en especial el sitosterol que se conoce también como el fitosterol, presentes en las células vegetales para brindar resistencia a la estructura de la membrana celular de las hojas. Estos compuestos han reportado presencia en pruebas del potencial alelopático de *Euphorbia heterophylla* (da Silva et al., 2019). Este resultado proyecta una posible relación del potencial alelopático en relación con lo observado en la fracción F2 del presente trabajo. Se podría plantear entonces el potencial alelopático de *Q. humboldtii* en las estructuras provenientes de extractos de baja polaridad, como algunas ceras y ácidos grasos, monoterpenos y triterpenos provenientes del ciclo del escualeno debido a que son estructuras mayoritarias en el extracto, así mismo se podría plantear una nueva referencia respecto a las moléculas que pueden presentar potenciales alelopáticos.

Por parte de los compuestos purificados, para **C1**, se presentaron 2 señales en el espectro de ^1H RMN, una correspondiente a grupos metilo (δ 0.92) y la otra en δ 1.32 a metilenos. Por la integración de estos picos se identificó el dodecano, lo cual fue confirmado por las señales en los espectros de ^{13}C RMN y dept-135 (https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_112-40-3_1HNMR.htm)

Es de destacar que la presencia del dodecano en las hojas y tallos de esta especie toma concordancia con respecto al sistema de producción de ceras que tienen las plantas. Estos hidrocarburos alifáticos, se presentan en las hojas para dar estructura y resistencia a la membrana celular de las hojas. Se observó en la literatura que las ceras cumplen un papel importante dado que en tiempos de lluvia permite la protección de los estomas y el daño mecánico que pueda producir el agua, a su vez en épocas calurosas estas cadenas de alcanos se transforman a sus respectivos ácidos grasos para brindar una resistencia a la membrana celular contra el efecto lumínico (Yang et al., 2021). En el caso del territorio colombiano que no se poseen estaciones marcadas, solo estaciones lluviosas y poco lluviosas, la correlación de ceras y ácidos grasos puede indicar que el roble andino responde de manera similar a la que responde su homólogo asiático *Quercus chenii*. Es de destacar que se ha mencionado un aumento en los compuestos grasos presentes en el xilema de las plantas debido al cambio climático, así como se ha reportado que en el

roble la aparición de compuestos alcanos, ácidos grasos y triterpenos influenciados por la aparición de dichas ceras lo que hace presentar una consistencia entre la aparición de estos compuestos en hojas y la posible presencia de compuestos con potencial alelopático (E. Conde, M. C. García-Vallejo, 1999; Zhang et al., 2021).

Para el compuesto **C2**, se presentaron 8 señales singletes características de metilos entre δ 1,22-0,76, además de las señales desplazadas de los carbonos 2 y 4 (figura 2.14). En el espectro de ^{13}C RMN se observaron 30 picos de los cuales se confirmaron 8 metilos, 11 metilenos y 4 metinos de acuerdo con el espectro dept-135, y siete carbonos cuaternarios, uno de ellos con a δ 213.39, en el espectro de ^{13}C RMN (figura 2.15). Los experimentos bidimensionales, contribuyeron a la asignación de los grupos metilos y la confirmación de la estructura de la friedooleanan-3-ona (Anexos). A pesar de que este compuesto, ha sido aislado de otras especies de *Quercus*, es el primer reporte para *Q. humboldtii* (Chandler, 1979). La friedelina como se conoce comúnmente, es un compuesto químico catalogado en el grupo de los friedelanos por presentar una estructura penta cíclica (5 anillos de 5 carbonos) con 2 metilaciones en su carbono 20 y un grupo carbonilo en el carbono 3, además de tener una metilación en el carbono 4 y el carbono 5 respectivamente diferenciando así dicho grupo del grupo oleano que presenta dichas metilaciones en el carbono 4 junto con las antes mencionadas en el carbono 20.

El compuesto **C3** mostró un triplete típico en δ 5.34 del protón olefínico del C-6 y la señal correspondiente al H-3 se visualizó como un multiplete en δ 3.51, típico de un protón oxigenado. Además, la presencia de seis señales de metilos, de las cuales dos señales aparecieron como singletes en δ 0.71 y 0.64; tres dobletes correspondientes a metilos en δ 0.83, 0.85 y 0.95 y un triplete de un metilo en δ 0.88. En el espectro de ^{13}C RMN se visualizaron 29 señales, con dos carbonos olefínicos en δ 140.78 (C-5) y 121.78 (C-6) y un metino oxigenado en δ 71.85 (C-3), lo cual en conjunto apoya la asignación de este compuesto como β -sitosterol (Figura 2.17). Este compuesto se le conoce comúnmente como fitosterol, presente en gran variedad de plantas, este compuesto ha reportado presencia en diversas plantas del género *Quercus* y presenta reportes como compuesto caracterizado en reportes de alelopatías de extractos naturales sobre semillas de lechuga *L. sativa* (Castola et al., 2002; da Silva et al., 2019; Manoharan et al., 2005).

Llegados a este punto de la investigación, se centró la mirada en C2 ya que en la literatura se reportó que friedooleanan-3-ona mejor conocido como friedelina, reporta una incidencia directa en la germinación de semillas de lechuga *L. sativa* y de cebolla *Allium cepa*, donde se observó que a una concentración de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ el compuesto fue capaz de inhibir la germinación de semillas y la posible elongación de radículas de las mismas (Freitas et al., 2015). Con lo anterior mencionado y teniendo en cuenta el hallazgo de Friedelina en F2 al menos en 3 fracciones analizadas por gases (F2-3, F2-8, F2-9) y 2 analizadas por RMN (F2-4 y F2-5) como uno de los compuestos mayoritarios, podría hacer pensar que dicho compuesto es uno de los implicados en dicha actividad herbicida, más teniendo en cuenta que en el presente trabajo se encontraba inmersa en una matriz compleja de moléculas de las cuales no se conoce que posibles interacciones pueda llegar a establecer, aun así presentado resultados similares a los reportados por Freitas y colaboradores. Así mismo,

es de destacar que dado que este compuesto se encuentra en hojas y existen reportes dentro del género *Quercus* donde también hace presencia en raíces y corteza (Chandler, 1979), es más que posible pensar que este compuesto sea de carácter constitutivo de la planta y cumpla una labor de inhibición de crecimiento de otras especies vegetales cercanas, lo que quizá pueda probar un factor inicial de dominancia del roble, particularmente el roble andino, en las zonas donde habita. Sumado a esto, existe evidencia de la relación que existen entre los 3 compuestos caracterizados dentro de una ruta biosintética de compuestos de baja polaridad presentes en tallos y hojas (E. Conde, M. C. García-Vallejo, 1999) lo que podría establecer un por qué inicial del potencial inhibitorio de germinación de F2, la relevancia de los compuestos aislados y la relación que presentan estos en la dominancia del roble andino en sus zonas de influencia.

2.7 Conclusiones

Tras contrastar en la literatura los resultados obtenidos y observar que la Friedelina que se reportó como compuesto mayoritario en los análisis de GC-MS y se pudo elucidar a través de RMN, y en virtud de la alta gama de compuestos triterpenoides de cuerpo esteroidal reportados, se puede concluir que el roble andino colombiano *Q. humboldtii*, se presenta como un reservorio natural de compuestos esteroidales con un potencial prometedor como bioherbicida, dados los resultados como inhibidor de germinación y como inhibidor de la elongación de la radícula de semillas comparables a los reportados en la literatura tanto de mezclas complejas como de sustancias puras. Este estudio puede ser el punto de partida de investigaciones futuras que se planteen el uso sostenible del roble andino como posible producto natural en beneficio de la desvinculación del ser humano de los agentes derivados del petróleo, o como objeto de estudio por parte de la potencialidad no solo herbicida de las moléculas presentes en la planta.

2.8 Referencias

- Abd-ElGawad, A., El Gendy, A. E. N., El-Amier, Y., Gaara, A., Omer, E., Al-Rowaily, S., Assaeed, A., Al-Rashed, 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. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.018>
- Adeyemi, A., Ekunseitan, D., Abiola, S., Dipeolu, A., Egbeyale, T., & Sogunle, M. (2018). Phytochemical Analysis and GC-MS Determination of *Lagenaria breviflora* R. Fruit. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(07). <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i07.11178>
- Almeida-Bezerra, J. W., da Silva, V. B., da Silva, M. A. P., Rodrigues, F. C., de Brito, E. S., Ribeiro, P. R. V., Meiado, M. V., & Oliveira, A. F. M. de. (2022). Leaf decomposition of *Mesosphaerum suaveolens* affects the growth of Cactaceae species in the Brazilian Seasonally Dry Tropical Forest. *Journal of Arid Environments*, 198(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104681>
- Avelar Amado, P., Fonsêca Castro, A. H., Samúdio Santos Zanuncio, V., Stein, V. C., Brentan da Silva, D., & Alves Rodrigues dos Santos Lima, L. (2020). Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192(July 2019), 110310. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110310>
- Avella, A., & Cardenas, L. (2010). Conservación y uso sostenible de los bosques de roble en el corredor de conservación Guantiva-LaRusia-Iguaque departamentos de Santander y Boyacá, Colombia. *Colombia Forestal*, 13(1), 5–26.
- Avila, B. S., Mendoza, D. P., Ramírez, A., & Peñuela, G. A. (2022). Occurrence and distribution of persistent organic pollutants (POPs) in the atmosphere of the Andean city of Medellín, Colombia. *Chemosphere*, 307(52). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135648>
- Benner, P., Mena, H., & Schneider, R. (2016). Modeling Glyphosate aerial spray drift at the Ecuador-Colombia border. *Applied Mathematical Modelling*, 40(1), 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2015.04.057>
- Bezner Kerr, R., Madsen, S., Stüber, M., Liebert, J., Enloe, S., Borghino, N., Parros, P., Mutyambai, D. M., Prudhon, M., & Wezel, A. (2021). Can agroecology improve food security and nutrition? A review. *Global Food Security*, 29(March). <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2021.100540>
- Bouafiane, M., Khelil, A., Cimmino, A., & Kemassi, A. (2021). Prediction and evaluation of allelopathic plants species in Algerian Saharan ecosystem. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 53(October). <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2021.125647>
- Camacho, A., & Mejía, D. (2017). The health consequences of aerial spraying illicit crops: The case of Colombia. *Journal of Health Economics*, 54, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2017.04.005>

- Castola, V., Bighelli, A., Rezzi, S., Melloni, G., Gladiali, S., Desjobert, J. M., & Casanova, J. (2002). Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.). *Industrial Crops and Products*, 15(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00091-7)
- Chandler, R. F. (1979). Review Friedelin a N D Associated Triterpenoids *. *Phytochemistry*, 18, 711–724.
- Chen, J., Su, Y., Lin, F., Iqbal, M., Mehmood, K., Zhang, H., & Shi, D. (2021). Effect of paraquat on cytotoxicity involved in oxidative stress and inflammatory reaction: A review of mechanisms and ecological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112711. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112711>
- Choudhary, C. S., Behera, B., Raza, M. B., Mrunalini, K., Bhoi, T. K., Lal, M. K., Nongmaithem, D., Pradhan, S., Song, B., & Das, T. K. (2023). Mechanisms of allelopathic interactions for sustainable weed management. *Rhizosphere*, 25(January). <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100667>
- Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C., & Guillemin, J. P. (2016). Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection*, 87, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016>
- da Silva, U. P., Furlani, G. M., Demuner, A. J., da Silva, O. L. M., & Varejão, E. V. V. (2019). Allelopathic activity and chemical constituents of extracts from roots of *Euphorbia heterophylla* L. *Natural Product Research*, 33(18), 2681–2684. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1460829>
- Díaz-Rojas, L., Galán-Bernal, N., Forero, D. P., Linares, E. L., Marín-Loaiza, J. C., & Osorio, C. (2019). Characterization of odour-active volatiles and sensory analyses of roasted oak (*Quercus humboldtii* bonpl.) acorns, a coffee substitute. *Vitae*, 26(1), 44–50. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v26n1a05>
- Dinday, S., & Ghosh, S. (2023). Recent advances in triterpenoid pathway elucidation and engineering. *Biotechnology Advances*, 68(July). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108214>
- Dodecane(112-40-3) 1H NMR. (s/f). Chemicalbook.com. Recuperado el 25 de agosto de 2023, de https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_112-40-3_1HNMR.htm
- E. Conde, M. C. García-Vallejo, E. C. (1999). Waxes composition of reproduction cork from *Quercus suber* and its variability throughout the industrial processing. *Wood Science and Technology*, 33.
- Elham, A., Arken, M., Kalimanjan, G., Arkin, A., & Iminjan, M. (2021). A review of the phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological evaluation of *Quercus Infectoria* galls. *Journal of Ethnopharmacology*, 273(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113592>
- Fernandes, S. Y., de Araújo, D., Pontes, M. S., Santos, J. S., Cardoso, C. A. L., Simionatto, E., Martines, M. A. U., Antunes, D. R., Grillo, R., Arruda, G. J., & Santiago, E. F. (2023). Pre-emergent bioherbicide potential of *Schinus terebinthifolia* Raddi essential oil nanoemulsion for *Urochloa brizantha*. *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology*, 47(January). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102598>
- Freitas, L. B. O., Boaventura, M. A. D., Santos, W. L., Stehmann, J. R., Junior, D. D., Lopes, M. T. P., Magalhães, T. F. F., Da Silva, D. L., & De Resende, M. A. (2015). Allelopathic, cytotoxic and antifungic activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). *Phytochemistry Letters*, 12, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.02.006>
- García-Villalba, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Rocha-Guzmán, N. E. (2017). Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63(June), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.034>
- González, R., Calderón, L., & Cabeza, R. (2008). Cuantificación de Sustancias Marcadoras de Envejecimiento en *Quercus humboldtii* por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. *Temas Agrarios*, 13(2), 56–63. <https://doi.org/10.21897/rta.v13i2.670>
- Hamdi, A., Majouli, K., Vander Heyden, Y., Flamini, G., & Marzouk, Z. (2017). Phytotoxic activities of essential oils and hydrosols of *Haplophyllum tuberculatum*. *Industrial Crops and Products*, 97, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.053>
- Huang, L. B., Guan, X., Aritsara, A. N. A., Zhu, J. J., Jansen, S., & Cao, K. F. (2023). Lipid concentration and composition in xylem sap of woody angiosperms from a tropical savanna and a seasonal rainforest. *Plant Diversity*, *In press*. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2023.07.001>
- Jiang, C., Zhou, S., Liu, L., Toshmatov, Z., Huang, L., Shi, K., Zhang, C., & Shao, H. (2021). Evaluation of the phytotoxic effect of the essential oil from *Artemisia absinthium*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112856. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112856>
- Kaab, S. B., Rebey, I. B., Hanafi, M., Hammi, K. M., Smaoui, A., Fauconnier, M. L., De Clerck, C., Jijakli, M. H., & Ksouri, R. (2020). Screening of Tunisian plant extracts for herbicidal activity and formulation of a bioherbicide based on *Cynara cardunculus*. *South African Journal of Botany*, 128, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.018>
- Kass, L., Gomez, A. L., & Altamirano, G. A. (2020). Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 508(September 2019), 110789. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110789>
- Kaur, A., Kaur, S., Singh, H. P., & Batish, D. R. (2022). Alterations in phytotoxicity and allelochemistry in response to intraspecific variation in *Parthenium hysterophorus*. *Ecological Complexity*, 50(March), 100999. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2022.100999>
- Khursheed, A., Rather, M. A., Jain, V., Wani, A. R., Rasool, S., Nazir, R., Malik, N. A., & Majid, S. A. (2022). Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microbial Pathogenesis*, 173(October). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105854>

- López-Hidalgo, C., Trigueros, M., Menéndez, M., & Jorrin-Novo, J. V. (2021). Phytochemical composition and variability in *Quercus ilex* acorn morphotypes as determined by NIRS and MS-based approaches. *Food Chemistry*, 338(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127803>
- Mallik, A.U. (2008). Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities. In: Zeng, R.S., Mallik, A.U., Luo, S.M. (eds) *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77337-7_2
- Manoharan, K. P., Benny, T. K. H., & Yang, D. (2005). Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta*. *Phytochemistry*, 66(19), 2304–2308. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.008>
- Martínez-Gil, A. M., del Alamo-Sanza, M., Gutiérrez-Gamboa, G., Moreno-Simunovic, Y., & Nevares, I. (2018). Volatile composition and sensory characteristics of Carménère wines macerating with Colombian (*Quercus humboldtii*) oak chips compared to wines macerated with American (*Q. alba*) and European (*Q. petraea*) oak chips. *Food Chemistry*, 266(May), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.123>
- Misra, R. K., Alston, A. M., & Dexter, A. R. (1989). Masa total y contenido de nutrientes en raíces finas de ecosistemas forestales (*Pinus patula* Schldt y Cham, *Cupressus lusitanica* Mill y *Quercus humboldtii* Bonpl). *Soil Till*, 103–116.
- Mominul Islam, A. K. M., Hasan, M., Musha, M. M. H., Uddin, M. K., Juraimi, A. S., & Anwar, M. P. (2018). Exploring 55 tropical medicinal plant species available in Bangladesh for their possible allelopathic potentiality. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(1), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.05.005>
- Morales, D. (2021). Oak trees (*Quercus* spp.) as a source of extracts with biological activities: A narrative review. *Trends in Food Science and Technology*, 109(November 2020), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.029>
- Radhakrishnan, R., Alqarawi, A. A., & Abd Allah, E. F. (2018). Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158(November 2017), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>
- Raj, A., Dubey, A., Malla, M. A., & Kumar, A. (2023). Pesticide pestilence: Global scenario and recent advances in detection and degradation methods. *Journal of Environmental Management*, 338(April). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117680>
- Reichert Júnior, F. W., Scariot, M. A., Forte, C. T., Pandolfi, L., Dil, J. M., Weirich, S., Carezia, C., Mulinari, J., Mazutti, M. A., Fongaro, G., Galon, L., Treichel, H., & Mossi, A. J. (2019). New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. *Heliyon*, 5(5), 0–6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01676>
- Ren, X. M., Kuo, Y., & Blumberg, B. (2020). Agrochemicals and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 515, 110926. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110926>
- Riaño, C., Ortiz-Ruiz, M., Pinto-Sánchez, N. R., & Gómez-Ramírez, E. (2020). Effect of glyphosate (Roundup Active®) on liver of tadpoles of the colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 250.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126287>
- Rodrigues, P. M., Dutra Gomes, J. V., Jamal, C. M., Cunha Neto, Á., Santos, M. L., Fagg, C. W., Fonseca-Bazzo, Y. M., Magalhães, P. de O., de Sales, P. M., & Silveira, D. (2017). Triterpenes from *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. Leaves (Sapotaceae). *Food and Chemical Toxicology*, *109*, 1063–1068. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.026>
- Salazar, G. C. M., Silva, G. D. F., Duarte, L. P., Vieira Filho, S. A., & Lula, I. S. (2000). Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ¹H and ¹³C chemical shift assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *38*(11), 977–980. [https://doi.org/10.1002/1097-458X\(200011\)38:11<977::AID-MRC757>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-458X(200011)38:11<977::AID-MRC757>3.0.CO;2-9)
- Sari, S., Barut, B., Özel, A., Kuruüzüm-Uz, A., & Şöhretoğlu, D. (2019). Tyrosinase and α-glucosidase inhibitory potential of compounds isolated from *Quercus coccifera* bark: In vitro and in silico perspectives. *Bioorganic Chemistry*, *86*(October 2018), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.015>
- Scavo, A., Pandino, G., Restuccia, A., & Mauromicale, G. (2020). Leaf extracts of cultivated cardoon as potential bioherbicide. *Scientia Horticulturae*, *261*(November 2018), 109024. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109024>
- Touati, R., Santos, S. A. O., Rocha, S. M., Belhamel, K., & Silvestre, A. J. D. (2015). The potential of cork from *Quercus suber* L. grown in Algeria as a source of bioactive lipophilic and phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, *76*, 936–945. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.074>
- Valbuena, D., Cely-Santos, M., & Obregón, D. (2021). Agrochemical pesticide production, trade, and hazard: Narrowing the information gap in Colombia. *Journal of Environmental Management*, *286*(March). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112141>
- Vieira, P. G., de Melo, M. M. R., Şen, A., Simões, M. M. Q., Portugal, I., Pereira, H., & Silva, C. M. (2020). *Quercus cerris* extracts obtained by distinct separation methods and solvents: Total and friedelin extraction yields, and chemical similarity analysis by multidimensional scaling. *Separation and Purification Technology*, *232*(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115924>
- Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2021). Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *248*(April), 109103. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109103>
- Yang, Y., Zhang, Y., & Huang, X. (2021). Comparison of δ²H values of leaf wax n-alkanes and n-alkanoic acids in subtropical angiosperms. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *577*(June). <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2021.110537>
- Zhang, X., Xu, B., Günther, F., & Gleixner, G. (2021). Seasonal variation of leaf wax n-alkane δ²H values: Differences between *Quercus aquifolioides* (an evergreen tree) and *Stipa bungeana* (a perennial grass) from the southeastern Tibetan Plateau. *Global and Planetary Change*, *207*(August).

<https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2021.103674>

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

El presente estudio permitió reconocer la problemática nacional e internacional que se ha venido afrontado la humanidad de cara a su desvinculación del petróleo y sus derivados. Los agroquímicos de síntesis, que en un pasado han significado la consolidación del ser humano sobre la faz de la tierra hoy lo pone en una situación difícil de asumir debido a la disyuntiva entre producción de alimentos a un costo medio ambiental insalvable. Bajo estos términos, la aproximación al descubrimiento del potencial alelopático de especies endémicas permite comprender la dinámica de los productos naturales como motivación para la conservación activa de bosques y zonas ambientales afectada directa o indirectamente por las actividades humanas. Por lo anteriormente dicho se puede concluir que la especie *Quercus humboldtii* posee un potencial alelopático prometedor para el control de especies vegetales no deseadas en cultivos puros.

Así mismo, esta investigación permitió utilizar los resultados producto de caracterizaciones biológicas (interacciones extracto crudo con un modelo de semillas de lechuga) para así realizar una serie de separaciones químicas guiadas con el objetivo de establecer los posibles agentes fitotóxicos presentes en la especie seleccionada. Con lo anteriormente dicho se puede concluir que el roble andino colombiano *Quercus humboldtii* posee un potencial alelopático prometedor posiblemente debido a la presencia de agentes triterpenicos y esteroidales como la Friedelina, el Stigmasterol, el Lupeol y ácidos grasos que podrían afectar de manera selectiva la germinación de semillas y la elongación de radícula e hipocótilo en plantas. Esto propicia una generación de conocimiento que no se tenía sobre el roble andino previo a este trabajo y abre una puerta hacia el uso de sus extractos con fines bioherbicidas.

3.2 Recomendaciones

Esta investigación propicia una generación de conocimiento que no se tenía sobre el roble andino de manera previa y abre una puerta hacia el uso de sus extractos con fines bioherbicidas dada la potencialidad de las moléculas encontradas y las posibles interacciones que pueda llegar a realizar con especies vegetales.

No obstante, este trabajo también puede ser el punto de partida para la investigación más a profundidad de la potencialidad fitoquímica de la especie en virtud de la alta gama de compuestos presentes. Dejando así la posibilidad del desarrollo de un producto natural comercial, que permita la conservación activa de la especie y pueda beneficiar a las comunidades cercanas a la misma, así como prodigar una desvinculación segura e innovadora de los derivados del petróleo.

Bibliografía

- Abd-ElGawad, A., El Gendy, A. E. N., El-Amier, Y., Gaara, A., Omer, E., Al-Rowaily, S., Assaeed, A., Al-Rashed, 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. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.018>
- Adeyemi, A., Ekunseitan, D., Abiola, S., Dipeolu, A., Egbeyale, T., & Sogunle, M. (2018). Phytochemical Analysis and GC-MS Determination of *Lagenaria brevipflora* R. Fruit. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(07). <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i07.11178>
- Almeida-Bezerra, J. W., da Silva, V. B., da Silva, M. A. P., Rodrigues, F. C., de Brito, E. S., Ribeiro, P. R. V., Meiado, M. V., & Oliveira, A. F. M. de. (2022). Leaf decomposition of *Mesosphaerum suaveolens* affects the growth of Cactaceae species in the Brazilian Seasonally Dry Tropical Forest. *Journal of Arid Environments*, 198(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104681>
- Avelar Amado, P., Fonsêca Castro, A. H., Samúdio Santos Zanuncio, V., Stein, V. C., Brentan da Silva, D., & Alves Rodrigues dos Santos Lima, L. (2020). Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192(July 2019), 110310. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110310>
- Avella, A., & Cardenas, L. (2010). Conservación y uso sostenible de los bosques de roble en el corredor de conservación Guantiva-LaRusia-Iguaque departamentos de Santander y Boyacá, Colombia. *Colombia Forestal*, 13(1), 5–26.
- Avila, B. S., Mendoza, D. P., Ramírez, A., & Peñuela, G. A. (2022). Occurrence and distribution of persistent organic pollutants (POPs) in the atmosphere of the Andean city of Medellín, Colombia. *Chemosphere*, 307(52). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135648>
- Balah, M. A. (2020). Weed control ability of Egyptian Natural Products against annual, perennial and parasitic weeds. *Acta Ecologica Sinica*, 40(6), 492–499. <https://doi.org/10.1016/J.CHNAES.2020.10.005>
- Benner, P., Mena, H., & Schneider, R. (2016). Modeling Glyphosate aerial spray drift at the Ecuador-Colombia border. *Applied Mathematical Modelling*, 40(1), 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2015.04.057>
- Berhanu, Y., Dalle, G., Sintayehu, D. W., Kelboro, G., & Nigussie, A. (2023). Land use/land cover dynamics driven changes in woody species diversity and ecosystem

- services value in tropical rainforest frontier: A 20-year history. *Heliyon*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13711>
- Bezner Kerr, R., Madsen, S., Stüber, M., Liebert, J., Enloe, S., Borghino, N., Parros, P., Mutyambai, D. M., Prudhon, M., & Wezel, A. (2021). Can agroecology improve food security and nutrition? A review. *Global Food Security*, 29(March). <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2021.100540>
- Böcker, T., Möhring, N., & Finger, R. (2019). Herbicide free agriculture? A bio-economic modelling application to Swiss wheat production. *Agricultural Systems*, 173(August 2018), 378–392. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.03.001>
- Bouafiane, M., Khelil, A., Cimmino, A., & Kemassi, A. (2021). Prediction and evaluation of allelopathic plants species in Algerian Saharan ecosystem. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 53(October). <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2021.125647>
- Boudebouz, A., Boudalia, S., Boussadia, M. I., Gueroui, Y., Habila, S., Bousbia, A., & Symeon, G. K. (2022). Pesticide residues levels in raw cow's milk and health risk assessment across the globe: A systematic review. *Environmental Advances*, 9(April). <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100266>
- Brief, F. A. (2022). Agricultural production statistics 2000–2021. *Agricultural Production Statistics 2000–2021*. <https://doi.org/10.4060/cc3751en>
- Calle, A., & Holl, K. D. (2019). Riparian forest recovery following a decade of cattle exclusion in the Colombian Andes. *Forest Ecology and Management*, 452(August). <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117563>
- Camacho, A., & Mejía, D. (2017). The health consequences of aerial spraying illicit crops: The case of Colombia. *Journal of Health Economics*, 54, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2017.04.005>
- Castola, V., Bighelli, A., Rezzi, S., Melloni, G., Gladiali, S., Desjobert, J. M., & Casanova, J. (2002). Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.). *Industrial Crops and Products*, 15(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00091-7)
- Chaïb, S., Pistevos, J. C. A., Bertrand, C., & Bonnard, I. (2021). Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicide compounds and biocontrol research. *Algal Research*, 54(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102213>
- Chandler, R. F. (1979). Review Friedelin a N D Associated Triterpenoids *. *Phytochemistry*, 18, 711–724.
- Chen, J., Su, Y., Lin, F., Iqbal, M., Mehmood, K., Zhang, H., & Shi, D. (2021). Effect of paraquat on cytotoxicity involved in oxidative stress and inflammatory reaction: A review of mechanisms and ecological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112711. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112711>
- Choudhary, C. S., Behera, B., Raza, M. B., Mrunalini, K., Bhoi, T. K., Lal, M. K., Nongmaithem, D., Pradhan, S., Song, B., & Das, T. K. (2023). Mechanisms of

- allelopathic interactions for sustainable weed management. *Rhizosphere*, 25(January). <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100667>
- Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C., & Guillemin, J. P. (2016). Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection*, 87, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016>
- da Silva, U. P., Furlani, G. M., Demuner, A. J., da Silva, O. L. M., & Varejão, E. V. V. (2019). Allelopathic activity and chemical constituents of extracts from roots of *Euphorbia heterophylla* L. *Natural Product Research*, 33(18), 2681–2684. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1460829>
- Díaz-Rojas, L., Galán-Bernal, N., Forero, D. P., Linares, E. L., Marín-Loaiza, J. C., & Osorio, C. (2019). Characterization of odour-active volatiles and sensory analyses of roasted oak (*Quercus humboldtii* bonpl.) acorns, a coffee substitute. *Vitae*, 26(1), 44–50. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v26n1a05>
- Dinday, S., & Ghosh, S. (2023). Recent advances in triterpenoid pathway elucidation and engineering. *Biotechnology Advances*, 68(July). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108214>
- E. Conde, M. C. García-Vallejo, E. C. (1999). Waxes composition of reproduction cork from *Quercus suber* and its variability throughout the industrial processing. *Wood Science and Technology*, 33.
- Elham, A., Arken, M., Kalimanjan, G., Arkin, A., & Iminjan, M. (2021). A review of the phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological evaluation of *Quercus Infectoria* galls. *Journal of Ethnopharmacology*, 273(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113592>
- Elkordy, A. A., Haj-Ahmad, R. R., Awaad, A. S., & Zaki, R. M. (2021). An overview on natural product drug formulations from conventional medicines to nanomedicines: Past, present and future. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63(March). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102459>
- FAO. (2022). Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators - Global, regional and country trends, 1990–2020. *FAOSTAT Analytical Briefs*, No. 46, 13. <https://doi.org/10.4060/cc0918en%0Ahttp://www.fao.org/documents/card/en/c/cc0918en>
- Fernandes, S. Y., de Araújo, D., Pontes, M. S., Santos, J. S., Cardoso, C. A. L., Simionatto, E., Martines, M. A. U., Antunes, D. R., Grillo, R., Arruda, G. J., & Santiago, E. F. (2023). Pre-emergent bioherbicide potential of *Schinus terebinthifolia* Raddi essential oil nanoemulsion for *Urochloa brizantha*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47(January). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102598>
- Freitas, L. B. O., Boaventura, M. A. D., Santos, W. L., Stehmann, J. R., Junior, D. D., Lopes, M. T. P., Magalhães, T. F. F., Da Silva, D. L., & De Resende, M. A. (2015). Allelopathic, cytotoxic and antifungal activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra*

- (Malpighiaceae). *Phytochemistry Letters*, 12, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.02.006>
- Gandhi, K., Khan, S., Patrikar, M., Markad, A., Kumar, N., Choudhari, A., Sagar, P., & Indurkar, S. (2021). Exposure risk and environmental impacts of glyphosate: Highlights on the toxicity of herbicide co-formulants. *Environmental Challenges*, 4(March), 100149. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100149>
- García-Villalba, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Rocha-Guzmán, N. E. (2017). Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63(June), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.034>
- González, R., Calderón, L., & Cabeza, R. (2008). Cuantificación de sustancias marcadoras de envejecimiento en *Quercus humboldtii* por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. *Temas Agrarios*, 13(2), 56–63. <https://doi.org/10.21897/rta.v13i2.670>
- Hamdi, A., Majouli, K., Vander Heyden, Y., Flamini, G., & Marzouk, Z. (2017). Phytotoxic activities of essential oils and hydrosols of *Haplophyllum tuberculatum*. *Industrial Crops and Products*, 97, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.053>
- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 17(10), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.008>
- Hrabanski, M., & Le Coq, J. F. (2022). Climatisation of agricultural issues in the international agenda through three competing epistemic communities: Climate-smart agriculture, agroecology, and nature-based solutions. *Environmental Science and Policy*, 127(October 2021), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2021.10.022>
- Hu, S., Li, S. wen, Yan, Q., Hu, X. peng, Li, L. yun, Zhou, H., Pan, L. xin, Li, J., Shen, C. pu, & Xu, T. (2019). Natural products, extracts and formulations comprehensive therapy for the improvement of motor function in alcoholic liver disease. *Pharmacological Research*, 150(November). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104501>
- Huang, L. B., Guan, X., Aritsara, A. N. A., Zhu, J. J., Jansen, S., & Cao, K. F. (2023). Lipid concentration and composition in xylem sap of woody angiosperms from a tropical savanna and a seasonal rainforest. *Plant Diversity*, *In press*. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2023.07.001>
- Ingaramo, P., Alarcón, R., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2020). Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518(July). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110934>
- Jaber, S. A. (2023). In vitro alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activity and in vivo antidiabetic activity of *Quercus coccifera* (Oak tree) leaves extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(7), 0–5. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103688>
- Jiang, C., Zhou, S., Liu, L., Toshmatov, Z., Huang, L., Shi, K., Zhang, C., & Shao, H. (2021). Evaluation of the phytotoxic effect of the essential oil from *Artemisia absinthium*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112856.

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112856>
- Kaab, S. B., Rebey, I. B., Hanafi, M., Hammi, K. M., Smaoui, A., Fauconnier, M. L., De Clerck, C., Jijakli, M. H., & Ksouri, R. (2020). Screening of Tunisian plant extracts for herbicidal activity and formulation of a bioherbicide based on *Cynara cardunculus*. *South African Journal of Botany*, 128, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.018>
- Kass, L., Gomez, A. L., & Altamirano, G. A. (2020). Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 508(September 2019), 110789. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110789>
- Kaur, A., Kaur, S., Singh, H. P., & Batish, D. R. (2022). Alterations in phytotoxicity and allelochemistry in response to intraspecific variation in *Parthenium hysterophorus*. *Ecological Complexity*, 50(March), 100999. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2022.100999>
- Khursheed, A., Rather, M. A., Jain, V., Wani, A. R., Rasool, S., Nazir, R., Malik, N. A., & Majid, S. A. (2022a). Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microbial Pathogenesis*, 173(PA), 105854. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105854>
- López-Hidalgo, C., Trigueros, M., Menéndez, M., & Jorrin-Novo, J. V. (2021). Phytochemical composition and variability in *Quercus ilex* acorn morphotypes as determined by NIRS and MS-based approaches. *Food Chemistry*, 338(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127803>
- Madani, N. A., & Carpenter, D. O. (2022). Effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides like Roundup™ on the mammalian nervous system: A review. *Environmental Research*, 214(July). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113933>
- Mallik, A.U. (2008). Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities. In: Zeng, R.S., Mallik, A.U., Luo, S.M. (eds) *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77337-7_2
- Manoharan, K. P., Benny, T. K. H., & Yang, D. (2005). Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta*. *Phytochemistry*, 66(19), 2304–2308. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.008>
- Martínez-Gil, A. M., del Alamo-Sanza, M., Gutiérrez-Gamboa, G., Moreno-Simunovic, Y., & Nevares, I. (2018). Volatile composition and sensory characteristics of Carménère wines macerating with Colombian (*Quercus humboldtii*) oak chips compared to wines macerated with American (*Q. alba*) and European (*Q. petraea*) oak chips. *Food Chemistry*, 266(May), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.123>
- Misra, R. K., Alston, A. M., & Dexter, A. R. (1989). Masa total y contenido de nutrientes en raíces finas de ecosistemas forestales (*Pinus patula* Schtdl y Cham, *Cupressus lusitanica* Mill y *Quercus humboldtii* Bonpl). *Soil Till*, 103–116.

- Mominul Islam, A. K. M., Hasan, M., Musha, M. M. H., Uddin, M. K., Juraimi, A. S., & Anwar, M. P. (2018). Exploring 55 tropical medicinal plant species available in Bangladesh for their possible allelopathic potentiality. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(1), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.05.005>
- Morales, D. (2021). Oak trees (*Quercus* spp.) as a source of extracts with biological activities: A narrative review. *Trends in Food Science and Technology*, 109(November 2020), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.029>
- Murillo-Sandoval, P. J., Gjerdseth, E., Correa-Ayram, C., Wrathall, D., Van Den Hoek, J., Dávalos, L. M., & Kennedy, R. (2021). No peace for the forest: Rapid, widespread land changes in the Andes-Amazon region following the Colombian civil war. *Global Environmental Change*, 69(May). <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102283>
- Potosi Gutierrez, A., Villalba Malaver, J. C., & Arboleda Pino, L. Y. (2017). Productos forestales no maderables asociados a bosques de roble *Quercus humboldtii* Bonpl en La Vega, Cauca. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 22. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\)22-29](https://doi.org/10.18684/bsaa(15)22-29)
- Radhakrishnan, R., Alqarawi, A. A., & Abd Allah, E. F. (2018). Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158(November 2017), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>
- Raj, A., Dubey, A., Malla, M. A., & Kumar, A. (2023). Pesticide pestilence: Global scenario and recent advances in detection and degradation methods. *Journal of Environmental Management*, 338(April). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117680>
- Reichert Júnior, F. W., Scariot, M. A., Forte, C. T., Pandolfi, L., Dil, J. M., Weirich, S., Carezia, C., Mulinari, J., Mazutti, M. A., Fongaro, G., Galon, L., Treichel, H., & Mossi, A. J. (2019). New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. *Heliyon*, 5(5), 0–6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01676>
- Ren, X. M., Kuo, Y., & Blumberg, B. (2020). Agrochemicals and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 515, 110926. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110926>
- Riaño, C., Ortiz-Ruiz, M., Pinto-Sánchez, N. R., & Gómez-Ramírez, E. (2020). Effect of glyphosate (Roundup Active®) on liver of tadpoles of the colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126287>
- Rodrigues, P. M., Dutra Gomes, J. V., Jamal, C. M., Cunha Neto, Á., Santos, M. L., Fagg, C. W., Fonseca-Bazzo, Y. M., Magalhães, P. de O., de Sales, P. M., & Silveira, D. (2017). Triterpenes from *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. Leaves (Sapotaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1063–1068. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.026>
- Ruiz-Agudelo, C. A., Gutiérrez-Bonilla, F. de P., Cortes-Gómez, A. M., & Suarez, A. (2022). A first approximation to the Colombian Amazon basin remnant natural capital. Policy and development implications. *Trees, Forests and People*, 10(May). <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2022.100334>

- Salazar, G. C. M., Silva, G. D. F., Duarte, L. P., Vieira Filho, S. A., & Lula, I. S. (2000). Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ¹H and ¹³C chemical shift assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38(11), 977–980. [https://doi.org/10.1002/1097-458X\(200011\)38:11<977::AID-MRC757>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-458X(200011)38:11<977::AID-MRC757>3.0.CO;2-9)
- Santos, M. B., Sillero, L., Gatto, D. A., & Labidi, J. (2022). Bioactive molecules in wood extractives: Methods of extraction and separation, a review. *Industrial Crops and Products*, 186(April). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115231>
- Sari, S., Barut, B., Özel, A., Kuruüzüm-Uz, A., & Şöhretoğlu, D. (2019). Tyrosinase and α-glucosidase inhibitory potential of compounds isolated from *Quercus coccifera* bark: In vitro and in silico perspectives. *Bioorganic Chemistry*, 86(October 2018), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.015>
- Scavo, A., Pandino, G., Restuccia, A., & Mauromicale, G. (2020). Leaf extracts of cultivated cardoon as potential bioherbicide. *Scientia Horticulturae*, 261(November 2018), 109024. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109024>
- Sedio, B. E.; Spasojevic, M. J.; Myers, J. A.; Wright, S. J.; Person, M. D.; Chandrasekaran, H.; Dwenger, J. H.; Prechi, M. L.; López, C. A.; Allen, D. N.; et al. Chemical Similarity of Co-Occurring Trees Decreases With Precipitation and Temperature in North American Forests. *Front. Ecol. Evol.* 2021, 9 (May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.679638>.
- Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. *Imta*, 55–67.
- Socaciu, M. I., Anamaria Semeniuc, C., Andruța Mureșan, E., Pușcaș, A., Tanislav, A., Ranga, F., Dulf, F., Páll, E., Maria Truță, A., Pașca, C., Severus Dezmirean, D., & Mureșan, V. (2023). Characterization of some Fagaceae kernels nutritional composition for potential use as novel food ingredients. *Food Chemistry*, 406(November 2022), 0–2. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135053>
- Tian, H., Zhai, W., Sun, K., Zhu, Y., Zhou, H., & Wan, P. (2022). Chemical composition and potential bioactivities of essential oil from *Quercus mongolica* bark. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(9). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104076>
- Touati, R., Santos, S. A. O., Rocha, S. M., Belhamel, K., & Silvestre, A. J. D. (2015). The potential of cork from *Quercus suber* L. grown in Algeria as a source of bioactive lipophilic and phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 76, 936–945. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.074>
- Valbuena, D., Cely-Santos, M., & Obregón, D. (2021). Agrochemical pesticide production, trade, and hazard: Narrowing the information gap in Colombia. *Journal of Environmental Management*, 286(March). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112141>
- Van den Berg, L., Behagel, J. H., Verschoor, G., Petersen, P., & Gomes da Silva, M. (2022). Between institutional reform and building popular movements: The political articulation of agroecology in Brazil. *Journal of Rural Studies*, 89(March 2021), 140–

148. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2021.11.016>

Vanegas-Cubillos, M., Sylvester, J., Villarino, E., Pérez-Marulanda, L., Ganzenmüller, R., Löhr, K., Bonatti, M., & Castro-Nunez, A. (2022). Forest cover changes and public policy: A literature review for post-conflict Colombia. *Land Use Policy*, 114(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2022.105981>

Vieira, P. G., de Melo, M. M. R., Şen, A., Simões, M. M. Q., Portugal, I., Pereira, H., & Silva, C. M. (2020). *Quercus cerris* extracts obtained by distinct separation methods and solvents: Total and friedelin extraction yields, and chemical similarity analysis by multidimensional scaling. *Separation and Purification Technology*, 232(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115924>

von der Goltz, J., Dar, A., Fishman, R., Mueller, N. D., Barnwal, P., & McCord, G. C. (2020). Health Impacts of the Green Revolution: Evidence from 600,000 births across the Developing World. *Journal of Health Economics*, 74, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2020.102373>

Wijewardene, L., Wu, N., Hörmann, G., Messyaszy, B., Riis, T., Hölzel, C., Ulrich, U., & Fohrer, N. (2021). Effects of the herbicides metazachlor and flufenacet on phytoplankton communities – A microcosm assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113036>

Xue, H. T., Stanley-Baker, M., Kong, A. W. K., Li, H. L., & Goh, W. W. Bin. (2022). Data considerations for predictive modeling applied to the discovery of bioactive natural products. *Drug Discovery Today*, 27(8), 2235–2243. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.009>

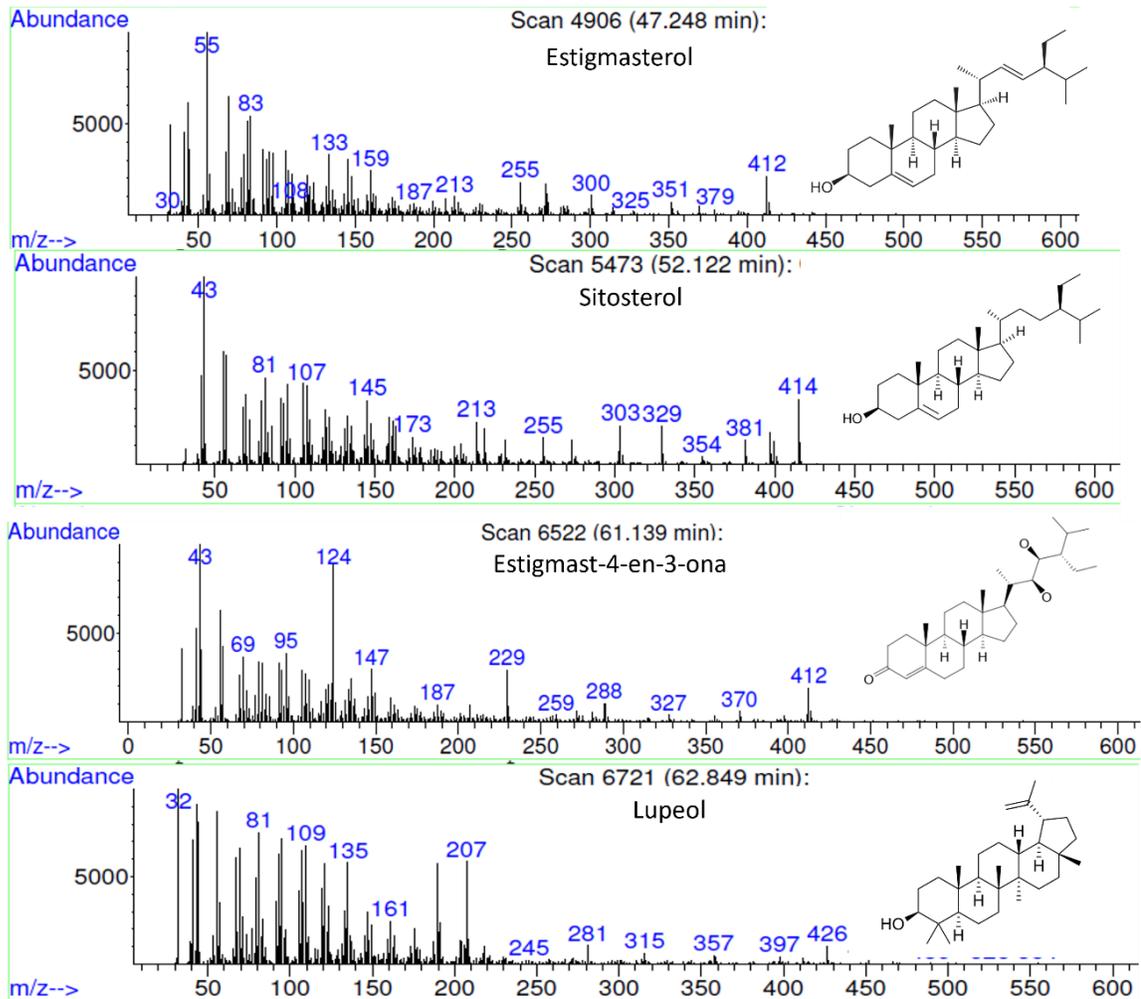
Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2021). Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 248(April), 109103. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109103>

Yang, Y., Zhang, Y., & Huang, X. (2021). Comparison of $\delta^{2}\text{H}$ values of leaf wax n-alkanes and n-alkanoic acids in subtropical angiosperms. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 577(June). <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2021.110537>

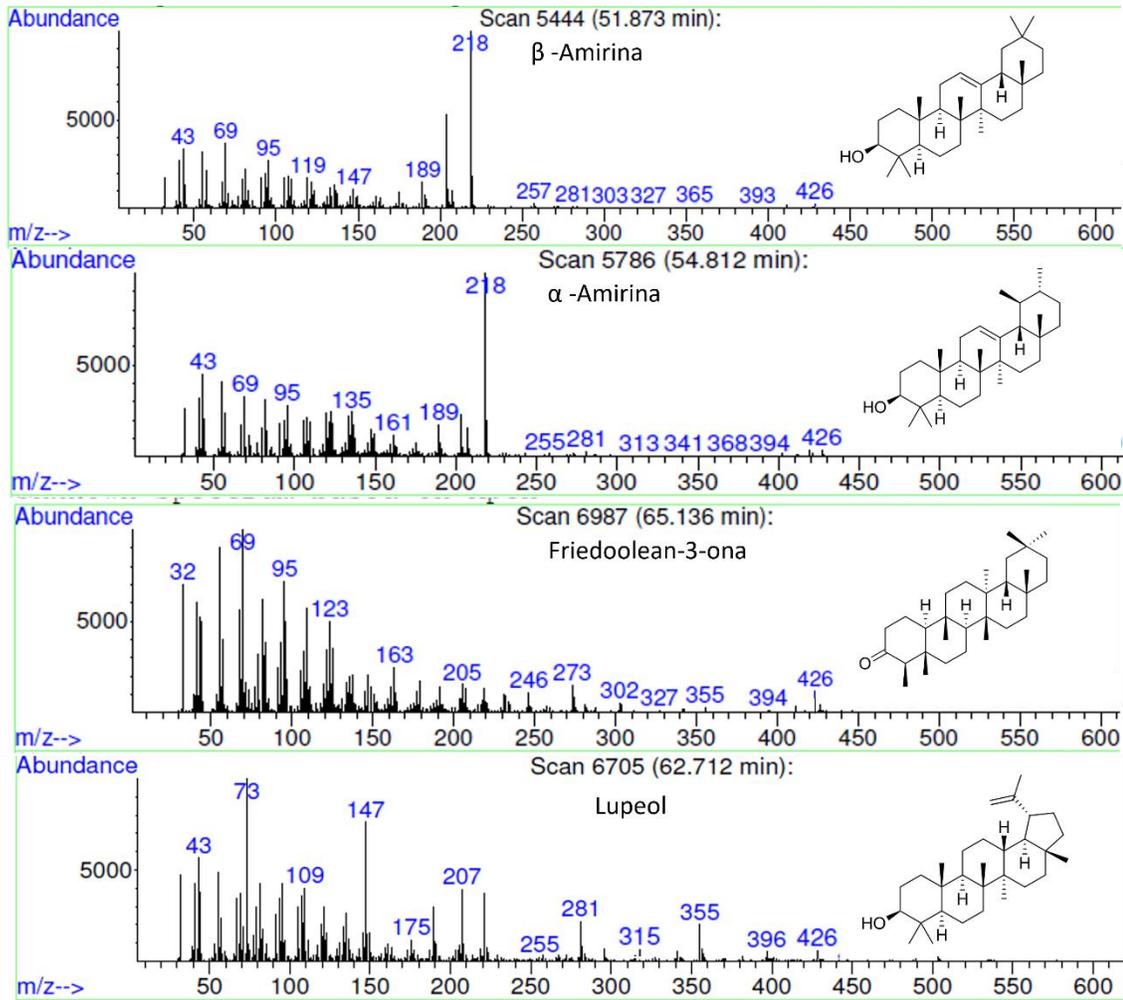
Zhang, X., Xu, B., Günther, F., & Gleixner, G. (2021). Seasonal variation of leaf wax n-alkane $\delta^{2}\text{H}$ values: Differences between *Quercus aquifolioides* (an evergreen tree) and *Stipa bungeana* (a perennial grass) from the southeastern Tibetan Plateau. *Global and Planetary Change*, 207(August). <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2021.103674>

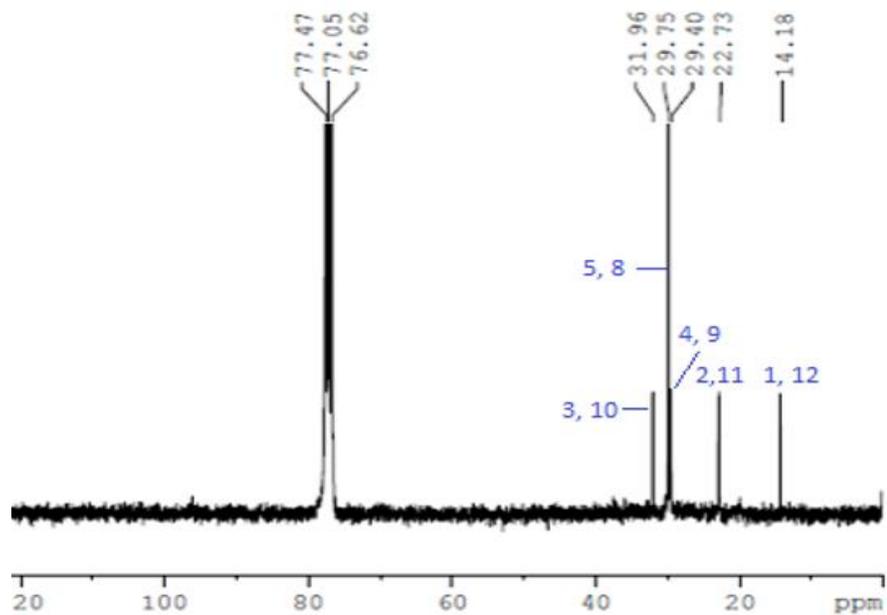
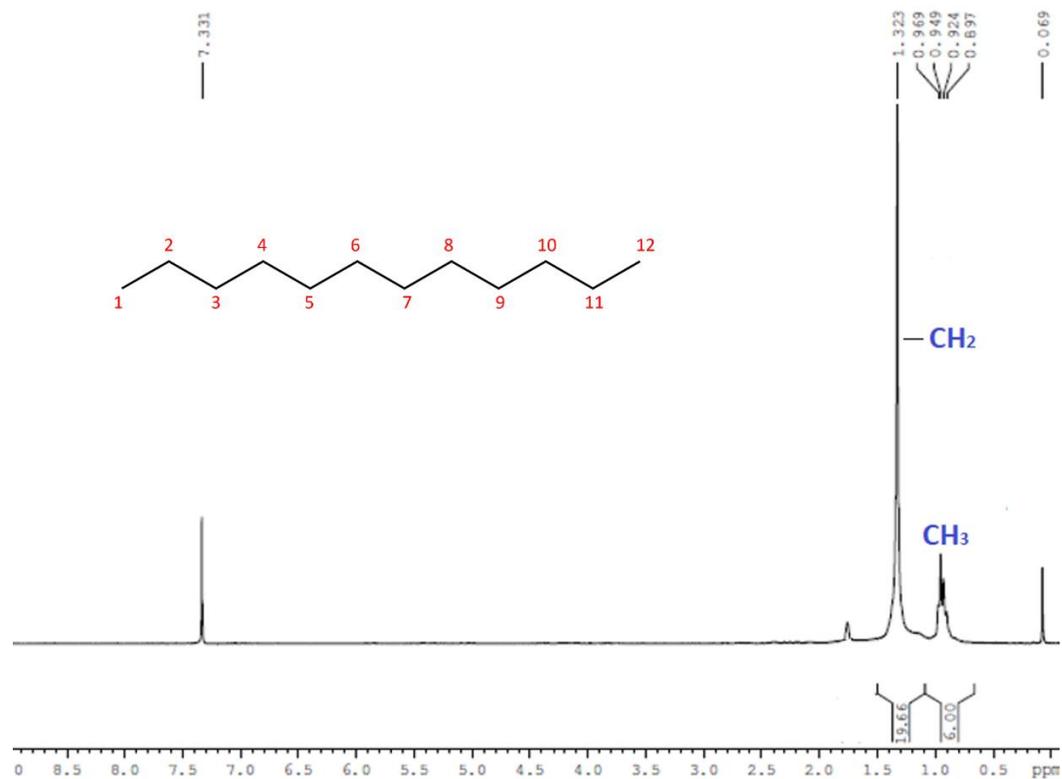
Anexos

Anexo 1. Espectros de masas de esteroides y triterpenos asignados en F2-P

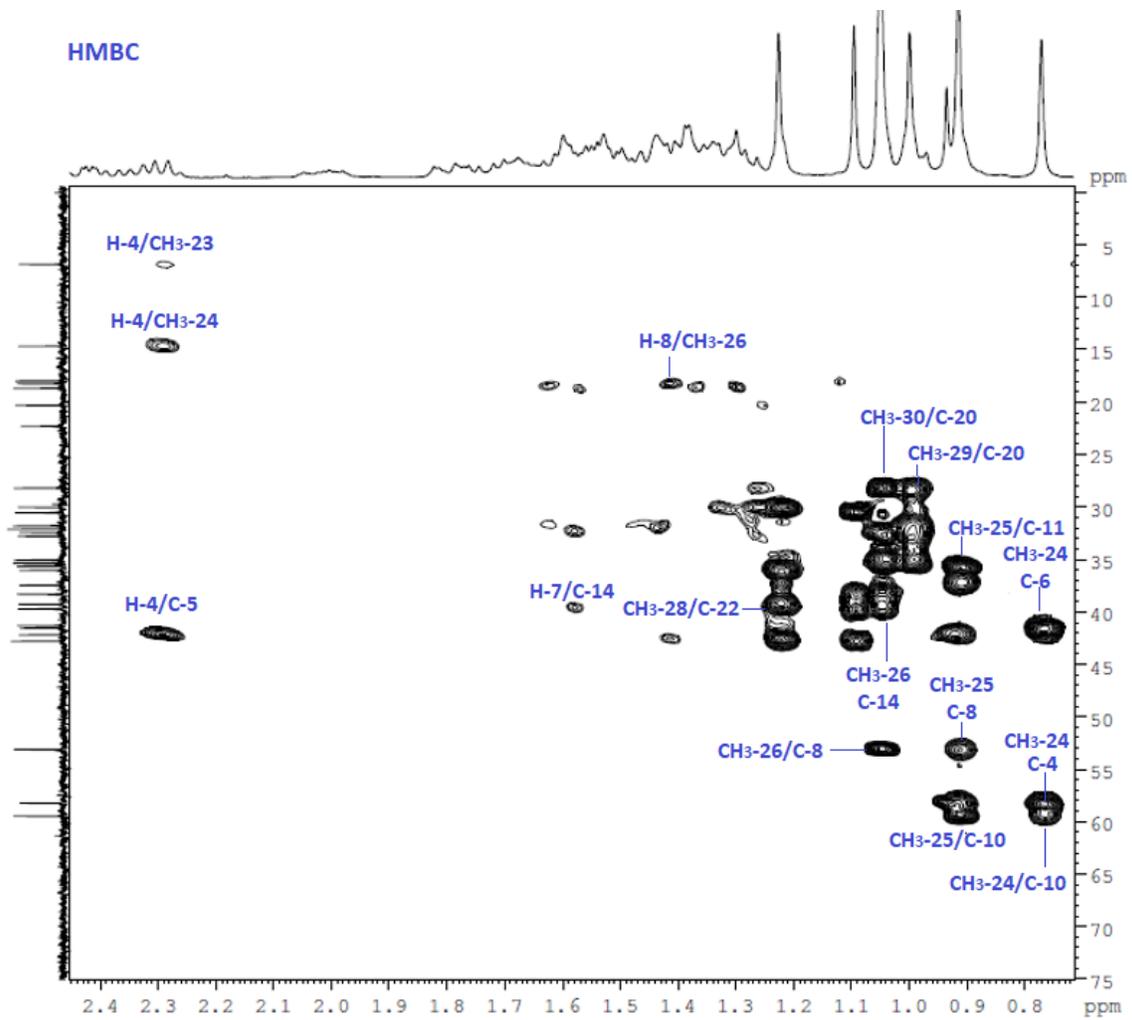


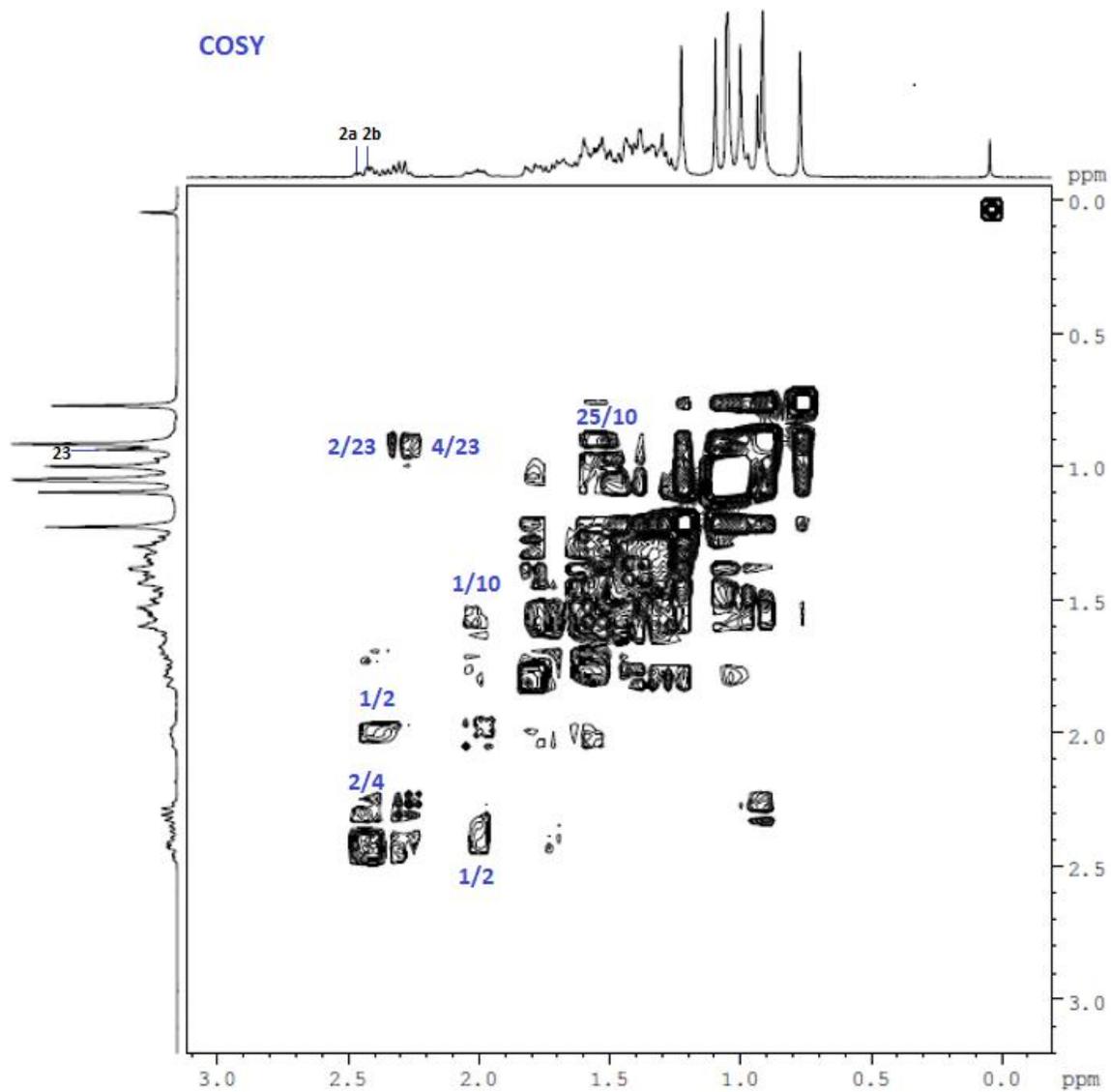
Anexo 3. Espectros de masas esteroides y triterpenos asignados en F2-9



Anexo 4. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN de C1 (Dodecano)

Anexo 5. Espectros de RMN bidimensionales de C2 (Friedelina)





Anexo 6. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN de C3 (β -Sitosterol)