

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y  
DEL MEDIO NATURAL

MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL Y ECOSISTEMAS  
AGROFORESTALES

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES



**Efectos del aceite esencial y extractos  
acuosos de *Eucalyptus gomphocephala* DC.  
sobre la germinación y el crecimiento de  
arvenses.**

**PROYECTO FINAL DE MÁSTER**

**Laura E. González Castillo**

Director: Mercedes Verdeguer Sancho

Valencia, Enero 2011

## Agradecimientos

A Dios por permitirme ser su pámpano lleno de frutos y él mi vid.

A mi amado hijo por motivarme para seguir esforzándome y hacerme entender con su amor de niño que podemos conseguir nuestros objetivos por mucho que nos cuesten, además de continuar creciendo como persona.

A Adolfo Sabaté que por segunda vez en mi historia de estudiante, he contado con su apoyo, comprensión y entusiasmo para seguir adelante con nuestros proyectos, además de su amor, esta vez fue mas duro, por tocarte aprender nuevas cosas como cuidar tu solo a nuestro hijo, gracias por tus sacrificios y la gran pero gran paciencia que tienes conmigo.

A mi madre y a mi padre por enseñarme ser lo que soy hasta ahora aunque me falta mucho por aprender.

A todas las personas que de alguna manera han estado en este cambio de vida que me concedieron vivir, por ayudar a combatir la soledad y las tristezas, por enriquecer mi vida, con sus cualidades, por compartir sus experiencias, por hacerme entender su puntos de vistas y sobre todo por su apoyo. Gracias por darme algunos espacios de felicidad es duro estar en tierras lejanas y sin sus seres queridos.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1. Uso de herbicidas.....	4
2.2. Alelopatía .....	5
2.3. Potencial herbicida de aceites esenciales y extractos acuosos. ....	7
2.4. <i>Eucalyptus</i> como fuente de herbicidas naturales alternativos a los herbicidas sintéticos.....	9
2.5. Arvenses .....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
3.1. Material vegetal .....	15
3.2. Obtención de aceites esenciales .....	15
3.3. Determinación de la composición de los aceites esenciales.....	16
3.3.1. Composición cuantitativa. Cromatografía de gases. ....	16
3.3.2. Composición cualitativa. Cromatografía de gases-espectrometría de masas.	17
3.3.4. Obtención de extractos acuosos.....	17
3.3.5 .Evaluación del potencial de inhibición de la germinación y el crecimiento. ....	18
3.3.6. Análisis estadístico de datos .....	18
4. RESULTADOS .....	20
4.1. Actividad fitotóxica <i>in vitro</i> del extracto acuoso de hojas de <i>E. gomphocephala</i> . .....	20
4.2. Actividad fitotóxica <i>in vitro</i> del aceite esencial del fruto de <i>E. gomphocephala</i> . .....	21
4.3. Composición del aceite esencial de hoja y fruto de <i>E. gomphocephala</i> . ....	24
5. DISCUSIÓN .....	27
6. CONCLUSIONES.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA .....	32

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Numerosos estudios han demostrado que la ausencia de control de las plantas arvenses puede provocar mermas significativas en el rendimiento o en la calidad del producto cosechado. La presencia de arvenses en un cultivo origina una pérdida aproximada del 10% del producto final obtenido en la recolección (Labrada *et al.*, 1996).

Existen diferentes métodos de control de las plantas arvenses, como la escarda manual o mecánica, la rotación de cultivos, el empleo de mulchings y plásticos, etc., pero el más común es el uso de herbicidas químicos sintéticos. Su aplicación excesiva produce problemas toxicológicos en la salud humana, y aumento de la contaminación del medio ambiente, además de favorecer la aparición de resistencias.

Las características más importantes causantes de la aparición de resistencias en arvenses son la frecuencia de genes, el tamaño y la viabilidad del banco de semillas del suelo, y la adaptabilidad al medio (Valverde, 2000).

Actualmente hay 372 biotipos de arvenses resistentes a herbicidas pertenecientes a 201 especies (116 dicotiledóneas y 85 monocotiledóneas) (Heap, 2011) en 60 países. Nueve de ellos (Alemania, Australia, Brasil, Canadá, España, Estados Unidos, Francia, Israel y el Reino Unido) contribuyen al 60% de los casos de resistencia registrados (Valverde *et al.*, 2009). Entre estas especies resistentes se encuentran *Echinochloa colona* (L.) Link, que desarrolla rápidamente resistencia al glifosato (Storrie *et al.*, 2008) y a otros herbicidas con diferentes modos de acción: inhibidores de la acetil-coenzima A carboxilasa, inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) e inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema II, *Portulaca oleracea* L., con resistencia a 2 grupos de herbicidas diferentes (inhibidores del fotosistema II, ureas y amidas), con el mismo modo de acción: inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema II, y *Amaranthus hybridus* L., resistente a herbicidas inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema II (Heap, 2011). Estas tres arvenses están incluidas entre las 18 arvenses más importantes del mundo (Holm *et al.*, 1977).

*A. hybridus* es una arvense altamente competitiva (Trader *et al.*, 2009) que causa pérdidas significativas en el rendimiento de las cosechas de numerosos cultivos (Lugo *et al.*, 1995). Es considerada una de las arvenses más serias y extendidas, junto con otras especies como *P. oleracea*, *Chenopodium album* L., *Cynodon dactylon* (L.) Pers. y *Cyperus rotundus* L. (Daehler, 1998). *P. oleracea* es una arvense problemática en 45 cultivos en 81 países en los trópicos y subtrópicos (Chauhan y Johnson, 2009). *E. colona* es una arvense importante en 5 de los principales cultivos del mundo. En América Central se encuentra en todas las zonas productoras de arroz. En América del Sur está ampliamente distribuida, sobre todo en Colombia, Venezuela y Brasil (Valverde, 2000).

Los productos naturales son una interesante fuente de obtención de nuevos herbicidas, no sólo por la gran diversidad y lo innovador de sus fórmulas, sino también por el potencial específico de su acción biológica y por la reducida probabilidad de producir acumulaciones de residuos perjudiciales en aguas y suelos (Macías, 1995).

Numerosas especies de *Eucalyptus* han mostrado fitotoxicidad frente a ciertas arvenses, lo que les confiere un gran potencial para su manejo y control, entre ellos *E. citriodora* (Kohli *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2005; Setia *et al.*, 2007). El aceite de *Eucalyptus* posee un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo antimicrobiana, fungicida, insecticida o repelente de insectos, herbicida, acaricida y nematocida. Su uso como pesticida natural tiene gran significancia, dadas las implicaciones ambientales y toxicológicas del uso indiscriminado de pesticidas sintéticos (Batish *et al.*, 2008). Las especies de *Eucalyptus* contienen aleloquímicos, capaces de afectar negativamente a varias especies de plantas. La alelopatía se define como cualquier efecto directo o indirecto (estimulador o inhibitorio) de una planta (incluyendo microorganismos) sobre otra, mediante la liberación de compuestos químicos (aleloquímicos) al medio ambiente (Rice, 1984). Los aleloquímicos que inhiben el desarrollo o eliminan plantas cerca de la planta fuente han recibido especial atención debido a su potencial como herbicidas naturales (Stonard y Miller-Wideman, 1995; Benner, 1996; Duke *et al.*, 2000a).

No se tiene conocimiento de la existencia de trabajos anteriores sobre la actividad de *E. gomphocephala*, ni en concreto, sobre su potencial herbicida. La composición de su aceite esencial en España no ha sido determinada. La finalidad de este trabajo es estudiar el potencial fitotóxico de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial y los extractos acuosos de *E. gomphocephala* DC sobre la germinación y el crecimiento de diferentes arvenses para su posible desarrollo como herbicidas naturales.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Obtención y determinación de la composición del aceite esencial de hojas y fruto de *E. gomphocephala* DC.
- Obtención de extractos acuosos de hojas de *E. gomphocephala* DC.
- Realización de ensayos *in vitro* aplicando los aceites esenciales y los extractos acuosos obtenidos sobre semillas de las plantas arvenses *A. hybridus*, *P. oleracea* y *E. colona*, para evaluar su potencial fitotóxico.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Uso de herbicidas**

Maximizar la producción agrícola mundial depende enormemente del control de una gran variedad de plagas, entre ellas las especies arvenses (Vyvyan, 2002), que se pueden definir como aquellas plantas no deseadas que interfieren con la actividad del hombre en zonas agrícolas y no agrícolas. En áreas cultivadas disminuyen el rendimiento de las cosechas, contaminan la zona de cultivo e incrementan el banco de semillas, manteniéndose el problema en las siguientes cosechas. Se han desarrollado numerosas prácticas para su control, pero en los países desarrollados, y en áreas de nivel medio-alto de producción, la tecnología dominante es la aplicación de productos químicos. El uso de otros métodos alternativos para el manejo de las arvenses, como por ejemplo el control biológico, es globalmente, insignificante (Torres, 2001).

En cualquier explotación moderna es muy importante el uso de herbicidas, en el año 2006 se vendieron 6 millones de toneladas de herbicidas a nivel mundial, representando el 38% de los plaguicidas (FAO, 2006). El mercado mundial ofrece alrededor de 250 ingredientes activos que permiten el control de prácticamente todas las arvenses, en cultivos principales y secundarios (Valverde, 2000).

El continuo uso de herbicidas como bromoxinil y glifosato (conocido como Roundup), que son tolerados por los cultivos resistentes a herbicidas, pueden desencadenar problemas de resistencia en las especies arvenses (Valverde, 2006; Altieri, 2009), además el glifosato sufre una pequeña degradación en la planta, acumulándose en los frutos y tubérculos. Los herbicidas también afectan a los microorganismos del suelo, se ha determinado que el número de sustituyentes determina sus efectos tóxicos. La capacidad de captar electrones de los sustituyentes influye significativamente en la actividad biológica de los herbicidas, siendo importantes las interacciones electrostáticas entre las moléculas de herbicida y los microorganismos (Nemes-Kósa y Cserhádi, 1995).

El glifosato parece actuar del mismo modo que los antibióticos, alterando la biología del suelo de una manera que aún se desconoce y por ello causa los siguientes efectos: reduce la capacidad de fijación de nitrógeno, provoca que las plantas sean más vulnerables a enfermedades y reduce el crecimiento de hongos micorrícicos (Altieri, 2009).

Debido a todos los efectos perjudiciales que se han ido constatando en los plaguicidas relacionados con la salud de las personas, los animales y el medio ambiente, la sociedad está tomando conciencia de que se deben emplear técnicas, que además de ser efectivas, sean respetuosas con el medio ambiente y propicias al desarrollo de una agricultura sostenible. El interés por la sostenibilidad aumentó después de que el término “desarrollo sostenible” fuera acuñado en 1987, en el informe “Nuestro Futuro Común”, publicado por las Naciones Unidas y la Comisión Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo (Constance, 2010).

## **2.2. Alelopatía**

El estudio del fenómeno alelopático es complejo, pues existen diversos factores involucrados, especialmente el trabajo con sistemas vivos, así como la necesidad del empleo de diversas técnicas instrumentales, convirtiendo el estudio de la alelopatía en una ciencia multidisciplinaria (Bastidas, 2008). Durante muchos años la investigación en alelopatía fue llevada a cabo por botánicos, y se centró en el estudio de los efectos de los cultivos de cobertura alelopáticos, su intercalado, la aplicación de extractos de plantas sobre el rendimiento de las cosechas y la eliminación de arvenses en condiciones de campo (Molisch, 1937; Putnam y Tang, 1986; Weston, 1996; Kocacaliskan y Terzi, 2001; Vyvyan, 2002). En los últimos años ha habido una creciente atención hacia el estudio de la alelopatía como una estrategia alternativa para el control principalmente de arvenses, pero también de insectos y enfermedades (Einhellig, 1995; Fomsgaard *et al.*, 2001; Vyvyan, 2002).

Los aleloquímicos producidos por las plantas son liberados al medio ambiente por exudación de las raíces, lixiviación de las hojas o descomposición de restos de material vegetal incorporados al suelo. Los aleloquímicos pueden encontrarse en cualquier parte de la planta, y la dinámica de su actividad es una

función del mecanismo en que pueden ser liberados. La mayoría de los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios derivados de las rutas del acetato-mevalonato o del ácido shikímico. Proviene de la ruta metabólica del acetato-mevalonato terpenos, esteroides, ácidos orgánicos solubles en agua, alcoholes de cadena lineal, aldehídos alifáticos, cetonas, ácidos grasos insaturados simples, ácidos grasos de cadena larga, poliacetilenos, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas complejas y floriglucinol, mientras que provienen de la vía metabólica del shikímico fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, el ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, sulfuros, glicósidos, alcaloides, cianhidrinas, algunos de los derivados de quinonas y taninos hidrolizables y condensados. Existen también compuestos (como por ejemplo los flavonoides) en cuya síntesis participan metabolitos de las dos rutas (Bastidas, 2008).

Los aleloquímicos pueden estimular la germinación y el crecimiento o eliminar la competencia de otras especies, exhibiendo a menudo selectividad según la especie frente a la que actúan. Esta actividad inhibitoria ha despertado cierto interés, principalmente debido a su posible aplicación en agricultura como herbicidas selectivos (Weston, 1996; Dayan *et al.*, 2009). Afectan a un gran número de funciones fisiológicas y de reacciones bioquímicas: actividades enzimáticas, división celular, elongación celular, permeabilidad de la membrana, y absorción de iones. Estos compuestos químicos cuando son liberados, por lo general, son una mezcla de muchos compuestos orgánicos que pueden ejercer efectos tóxicos de manera sinérgica (Kalinova, 2010).

Los aleloquímicos son una mezcla compleja, principalmente de terpenoides, en particular monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de compuestos aromáticos, óxidos, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, que determinan el característico aroma y olor de la planta que los produce. Es muy posible que estos compuestos puedan producir más de un efecto sobre los procesos celulares responsables de la reducción del crecimiento de las plantas. Sin embargo, los detalles del mecanismo bioquímico por el cual un compuesto en particular ejerce un efecto tóxico sobre el crecimiento de las plantas no son bien conocidos (Batish *et al.*, 2008).

Los productos naturales son una atractiva fuente de obtención de nuevos herbicidas, no sólo por la gran diversidad y lo novedoso de sus fórmulas, sino también por la potencial especificidad de su acción biológica, y por la reducida probabilidad de producir acumulaciones dañinas y residuos perjudiciales en aguas y suelos (Macías, 1995). Uno de los importantes beneficios de la composición química y de las características estructurales de los productos naturales, como son la ausencia de “antinaturales” estructuras de anillo y la baja cantidad de átomos pesados, es que la mayoría de estos compuestos son rápidamente degradados en el medio ambiente, por lo que tienen un bajo o nulo impacto. Además, las fitotoxinas naturales suelen actuar en puntos distintos a los de los herbicidas convencionales, presentando numerosos y diferentes modos de acción, lo que evita la aparición de resistencias (Dayan *et al.*, 1999; Duke *et al.*, 2000a).

La demanda social de una reducción en el uso de fitosanitarios ha estimulado el interés de los agricultores convencionales por el uso de cultivos con propiedades alelopáticas (Fomsgaard *et al.*, 2001). La introducción de esta nueva tecnología puede reducir las pérdidas causadas en la agricultura, proporcionando protección a los cultivos y generando bioproductos menos dañinos, más fácilmente degradables, lo que implica menor contaminación al medio ambiente (Puente *et al.*, 2003).

### **2.3. Potencial herbicida de aceites esenciales y extractos acuosos.**

Los aceites esenciales han mostrado potencial como herbicidas. Uno de los inconvenientes que presentan normalmente es la necesidad del empleo de surfactantes para su aplicación, y éstos están limitados en la agricultura orgánica. La mayoría de aceites esenciales comercializados para el control natural de arvenses son mezclas, por lo que es difícil recopilar las numerosas formulaciones disponibles. Todos los aceites esenciales comercializados actúan como herbicidas de contacto no selectivos, que pueden controlar las arvenses de forma adecuada pero transitoria. El uso de los aceites esenciales para el control de arvenses parece prometedor en la agricultura orgánica, pero actúan muy rápido y su actividad es limitada porque la mayoría se volatilizan rápidamente (Dayan *et al.*, 2009). Se están desarrollando formulaciones

alternativas, como la microencapsulación, para aumentar la duración de su efecto, reducir su volatilización, simplificar su manejo y ralentizar su degradación en el medio ambiente (Scarfato *et al.*, 2007).

Se probaron aceites esenciales de *Hyssopus officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Majorana hortensis* L., *Melissa officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L. y *Thymus vulgaris* L., mostrando tener actividad inhibidora sobre la germinación de *Raphanus sativus* L. y *Lepidium sativum* L. (Arminante, 2006).

Los aceites esenciales de *Carum carvi* L., *Mentha spicata* L., *Origanum onites* L., *Thymbra spicata* L. y sus dos principales componentes timol y carvacrol mostraron una actividad inhibitoria sobre la germinación de las semillas de arvenses estudiadas *in vitro* (Azirak, 2007).

Aceites esenciales de diversas variedades de orégano (*Origanum* spp.) y albahaca (*Ocimum basilicum* L.) se han ensayado contra *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. y *Chenopodium album* L. con algún éxito (Vasilakoglu *et al.*, 2007). Estos aceites, compuestos principalmente de *p*-cimeno (20-25%),  $\gamma$ -terpineno (15-20%) y timol (10-35%), han sido patentados para el control de musgos (Dayan *et al.*, 2009).

El potencial herbicida del aceite esencial de *Cistus ladanifer* L. fue ensayado *in vitro* frente a *Amaranthus hybridus* L., *Portulaca oleracea* L., *Chenopodium album* L., *Conyza canadensis* (L.) Cronq. y *Parietaria judaica* L. Su actividad fue distinta según la arvense sobre la que actuó: inhibió completamente la germinación de *A. hybridus*, y controló casi totalmente la germinación de *C. canadensis* y *P. judaica* a todas las concentraciones probadas, sin diferencias entre ellas. También demostró actividad herbicida el extracto acuoso de *Artemisia gallica* Willd. *in vitro* frente a *A. hybridus*, *P. oleracea*, *C. album*, *C. canadensis* y *P. judaica*. Nuevamente la especie cuya germinación se vio más afectada fue *C. canadensis*, ya que todas las concentraciones la redujeron drásticamente, sin diferencias significativas entre ellas (Verdeguer, 2011).

En estudios realizados con extracto acuoso de *Artemisa absinthium* L. se determinó el potencial fitotóxico de los lixiviados acuoso, fracciones etanólicas

y diclorometánica, mostrando todos fitotoxicidad sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Echinochloa colona* L., siendo la fracción etanólica la de mayor efecto inhibitorio (Murillo *et al.*, 2003).

#### **2.4. *Eucalyptus* como fuente de herbicidas naturales alternativos a los herbicidas sintéticos**

La familia Myrtaceae comprende 3800 especies distribuidas en 140 géneros a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales del mundo principalmente de Australia, América Central y Sudamérica (Mabberley, 1997). El género *Eucalyptus* L'Hér. pertenece a esta familia incluyendo 900 especies y subespecies. Son árboles de porte alto con hojas perennes, aromáticas, ricas en glándulas de aceite, fuente de importantes aceites esenciales comerciales, que tienen numerosos usos en farmacia, perfumería y en la industria (Brooker y Kleining, 2006). Los *Eucalyptus* son cultivados para obtener su aceite esencial, goma de mascar, pulpa para papel y madera, además de tener gran valor en la medicina y la estética (Batish *et al.*, 2008). Los aceites de *Eucalyptus* se conocen desde hace cientos de años como antibacterianos, antifúngicos y antisépticos naturales y se utilizan como repelentes de insectos y como pesticidas (Barton, 2000).

En condiciones naturales, el aceite esencial de *Eucalyptus* le confiere propiedades alelopáticas al árbol (Kohli, 1990; Liu *et al.*, 2008). Aceites esenciales de diversas especies de *Eucalyptus* han mostrado fitotoxicidad frente a arvenses, lo que les confiere un gran potencial para su manejo y control, entre ellos *E. citriodora* (Kohli *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2005; Setia *et al.*, 2007), *E. tereticornis* (Kohli *et al.*, 1998) y *E. camaldulensis* (Batish *et al.*, 2007; Verdeguer *et al.*, 2009)

La actividad pesticida del aceite esencial de *Eucalyptus* se debe a sus componentes tales como: 1,8-cineol, citronelol, citronela, acetato de citronela, p-cimeno, eucamalol, limoneno, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, *allo*-ocimeno y aromadendreno (Duke *et al.*, 2000a; Batish *et al.*, 2006). Se verificó que el aceite de *E. citriodora* aplicado a una concentración del 0.012% redujo el contenido de clorofila en *Amaranthus viridis* L. en un 72% y prácticamente en un 40% en *Bidens pilosa* L. y *Rumex nepalensis* Spreng. (Setia *et al.*, 2007). El

aceite esencial de *E. camaldulensis*, con espatulenol como componente mayoritario fue muy efectivo en el control *in vitro* de arvenses (Verdeguer, 2011).

La bioactividad del aceite esencial de *Eucalyptus* depende del tipo y la naturaleza de los constituyentes y de su concentración individual (Batish *et al.*, 2008). Se han realizados muchos ensayos de actividad fitotóxica o alelopática con distintas especies de *Eucalyptus*, como *E. globulus*, *E. camaldulensis* o *E. citriodora*, sin embargo el potencial alelopático de *E. gomphocephala* no ha sido estudiado.

## 2.5. Arvenses

### *Portulaca oleracea* L.

El género *Portulaca* incluye más de 100 especies (Poellnitz, 1934; Legrand, 1958) distribuidas en los trópicos y subtrópicos, con centros de diversidad en Sudamérica y África (Voznesenskaya *et al.*, 2010). Se trata de una especie cosmopolita (Danin y Reyes-Betancourt, 2006), encontrándose ampliamente extendida y siendo considerada una de las 8 plantas más comunes del mundo (Yazici *et al.*, 2007). Es una planta anual con tallos ramificados, suculentos y carnosos, de 10 a 50 cm. Las hojas son generalmente dispersas, alternas, oblongas, ovadas y sésiles. Las flores son solitarias o se encuentran 2- 3 agrupadas, frecuentemente terminales. Su fotosíntesis es de tipo C4 (Silva *et al.*, 2007).

Se considera como una de las arvenses más perjudiciales y extendidas en el mundo junto con otras especies como *A. hybridus*, *C. album*, *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Cyperus rotundus* L. y *E. colona* (Daehler, 1998). Afecta a los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), te (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) y hortícolas (Holm *et al.*, 1991). Recientemente, se ha registrado su presencia en arroz de siembra en seco en 17 países y en arroz de siembra en húmedo en 3 países (Rao *et al.*, 2007). Ha sido reportada en cultivos de tomate como la especie mas dominante

junto con otras arvenses como *Amaranthus sp.*, *C. rotundus* y *Sida sp.* (Martínez de Carrillo y Alfonso, 2003).

Se propaga principalmente por semilla, logrando originar una sola planta unas 10.000 semillas, aunque fragmentos de sus tallos pueden producir raíces y desarrollarse (Chauhan y Johnson, 2009). Además es una planta con capacidad de exhibir un ajuste fenotípico tanto en los caracteres morfológicos como en las respuestas fisiológicas bajo diferentes condiciones del medio (Leguizamón, 2007). Actúa como huésped de insectos, nemátodos y algunos hongos patógenos (Galinato *et al.*, 1999), forma densas masas que son difíciles de controlar con herbicidas químicos (Monks, 1993).

Las propiedades alelopáticas de *P. oleracea* han sido poco estudiadas, en comparación con los numerosos trabajos que se han llevado a cabo relativos a los efectos de diferentes aleloquímicos sobre ella (Macías *et al.*, 2007). Compuestos fenólicos, como los ácidos ferúlico, *p*-hidroxibenzoico y cinámico son los responsables de la actividad alelopática de *P. oleracea* y otras especies arvenses (Chun *et al.*, 1988). “Mulchings” de centeno (*Secale cereale* L.) y triticale (*Triticum secalotriticum saratoviense* Meister) mostraron efectos alelopáticos sobre *P. oleracea*, reduciendo su incidencia (Tabaglio *et al.*, 2008). La incorporación de restos de hojas y tallos de orégano al suelo inhibió la germinación de *P. oleracea* (De Mastro *et al.*, 2006). Extractos (De Feo *et al.*, 2002 y 2003) y aceites esenciales de distintas especies han sido ensayados, por su potencial alelopático, para el control de esta arvense (Angelini *et al.*, 2003; Verdeguer *et al.*, 2009 y Verdeguer, 2011)

### **Echinochloa colona (L.) Link**

*Echinochloa* es el género de malezas más importante asociado al arroz debido a su adaptabilidad al ecosistema del cultivo. *E. colona* y *E. crus-gallis* son las especies más importantes; la primera predomina en las regiones tropicales y subtropicales, mientras que la segunda es cosmopolita y problemática en el arroz de zonas templadas y tropicales, donde se considera la principal maleza del cultivo (Kim, 1994).

El género *Echinochloa* consta de unas 50 especies, algunas de las cuales no han sido todavía descritas. Son plantas bien adaptadas a condiciones de humedad, y a menudo desarrollan todo su ciclo en el agua (Michael, 1983).

*E. colona* es una planta erecta o ligeramente postrada, con culmos de hasta 70 cm de longitud. A menudo presenta pelos y raíces en la base de sus nudos. La lámina foliar es glabra o peluda en los nudos, frecuentemente teñida de rojo, sin lígula, con una longitud de 3 a 25 cm y una anchura de 3 a 13 mm, y en ocasiones presenta bandas transversales de color púrpura. La inflorescencia es una panícula. Difiere de otras especies de *Echinochloa* que se comportan como arvenses en sus carióspsides, que son más pequeños y redondeados, y en que no posee aristas. *E. crus-galli* normalmente sí presenta aristas. Estas especies tienen una notoria capacidad de adaptación a las diferentes condiciones de crecimiento asociadas con el cultivo de arroz, mimetizándose con el mismo (Valverde, 2000).

En Australia, la hierba de corral sin aristas (*E. colona*) es una arvense importante de todos los cultivos de verano, pudiendo también establecerse en cultivos de invierno y primavera (Storrie *et al* ,2008).

Extractos acuosos metanólicos de hojas de neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) provocaron fitotoxicidad y poseen una capacidad inhibidora del crecimiento de las arvenses nocivas del cultivo de arroz incluyendo *E. colona*. (Salam y Noguchi, 2010). Residuos de hojas de *E. globulus* y *Manguifera indica* L. pueden ser utilizados para suprimir el crecimiento tanto de *C. dactylon* L. como de *E. colona* (El Rokiek *et al*, 2011). Extractos acuosos metanólicos de las plantas de pepino (*Cucumis sativum* L.) inhibieron el crecimiento de raíces y brotes de berro (*Lepidium sativum* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), raigrás (*Lolium multiflorum* L.), fleo (*Phleum pratense* L.), digitaria (*Digitaria sanguinalis* L. Scop.), *E. crus-gallis* y *E. colona*. Cuanto mayor fue la concentración del extracto, mayor fue la inhibición (Thi *et al*, 2008).

El efecto alelopático de extractos acuosos de *Nerium oleander* L., *Aleuritis fordii* Hemsley, *Ocimum sanctum* L., *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud y *Thevetia*

*peruviana* Schum se ensayó sobre la germinación de semillas y el desarrollo del eje radículo-hipocotilar en cinco especies de arvenses: verdolaga (*P. oleracea*), bledo (*Amaranthus dubius* Mart.), romerillo (*B. pilosa*), metebravo (*E. colona*), Don Juan de Castilla ó pata de gallina (*D. sanguinalis*). Todos los extractos evidenciaron efectos inhibitorios, presentando como metabolitos secundarios triterpenos, fenoles, flavonoides y cardiotónicos (Alfonso *et al.*, 2005).

Se evaluó el potencial alelopático de lavados foliares de *E. colona* sobre el porcentaje de germinación y la longitud radical de *Allium cepa* L., *C. sativus*, *Lactuca sativa* L., *Lycopersicon esculentum* Mill y *O. sativa*, ejerciendo un efecto alelopático de carácter estimulador sobre *L. esculentum* y *A. cepa* en función de la fase de desarrollo en la que se encontraba la planta donadora en el momento en que se obtuvo el lavado (Miquilena *et al.*, 2005).

### **Amaranthus hybridus L.**

Las Amarantáceas son plantas nitrófilas y tienen una fotosíntesis de tipo C4, lo que les confiere ventajas fisiológicas frente a otras especies (Maillet y López-García, 2000). *A. hybridus* es una planta monoica, anual, con una altura de 20-100 cm, erecta, con hojas ovadas y romboidales, flores agrupadas en una inflorescencia terminal no muy densa. Se trata de una especie arvense altamente competitiva.

Las especies de *Amaranthus* se incluyen entre las arvenses más frecuentes y problemáticas en los cultivos (Webster, 2002). Poseen una alta diversidad genética y producen una abundante cantidad de semillas, que distribuyen eficientemente, características que favorecen la aparición de resistencias a herbicidas (Lovell *et al.*, 1996).

Compuestos orgánicos volátiles emitidos por los residuos de las partes aéreas de *A. retroflexus*, *A. hybridus*, *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus spinosus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Amaranthus palmeri* S. Wats fueron estudiados, determinándose que estas sustancias volátiles, generalmente clasificadas como componentes de sabor, aroma y/o mezclas atrayentes de insectos, también son factores importantes en la alelopatía y la

ecología química de los suelos (Connicket *et al.*, 1989). Las hojas de especies de *Amaranthus* contienen diversos compuestos farmacológicamente activos (Maiyo *et al.*, 2010).

Especies de *Amaranthus* son pseudocereales dicotiledóneas que se pueden emplear como cultivos alternativos, con potencial para su explotación comercial (Rawate, 1983; Kauffman y Weber, 1990). *A. hybridus* puede crecer hasta 1.5 m, produciendo una gran cantidad de biomasa en poco tiempo, y completando hasta 6 generaciones en un año. Es un vegetal nutritivo, adecuado para el cultivo en regiones semiáridas en todo el mundo (Blodgett y Swart, 2002).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

Con el propósito de extraer semillas para la realización de ensayos, se recolectaron plantas en fase de fructificación de las especies *Echinochloa colona* L., en marzo de 2009 en la Universidad Central de Venezuela (Estado Aragua, Venezuela), *Portulaca oleracea* L., en agosto de 2009 en Sinarcas (provincia de Valencia, España) y *Amaranthus hybridus* L., en septiembre de 2010 en los alrededores de la Universidad Politécnica de Valencia (provincia de Valencia, España). Las semillas fueron seleccionadas, eliminando las que mostraron un tamaño, color, forma o estado de maduración irregular, y se conservaron en placas Petri de 9 cm de diámetro selladas con Parafilm a temperatura ambiente, con el fin de evitar la aparición de latencias.

Para la obtención de aceites esenciales y la elaboración de extractos acuosos se recolectaron hojas y frutos de *Eucalyptus gomphocephala* DC de los jardines del Río Turia de la ciudad de Valencia (provincia de Valencia, España) en septiembre de 2011. Tanto los aceites esenciales como los extractos acuosos se obtuvieron inmediatamente, a partir de planta fresca.

#### **3.2. Obtención de aceites esenciales**

Se destilaron por separado, hojas y frutos de la especie *E. gomphocephala*, mediante instrumento tipo Clevenger y matraces redondos de 2000 ml. El material vegetal fresco, previamente pesado con una balanza de precisión, se introdujo en los matraces, y se añadieron 1000 ml de agua destilada. Con una manta calefactora se suministró calor al matraz redondo, generándose vapor de agua, que arrastró los componentes volátiles de la droga, condensándose en el refrigerante, y pasando al tubo colector graduado, donde se recogió el aceite esencial. Este procedimiento se mantuvo durante 3h, terminando la destilación cuando no aumentó la cantidad de aceite esencial destilado en un periodo de 30 minutos.

El rendimiento medio expresado en v/w (volumen de aceite obtenido en mililitros, por 100 gramos de planta destilados) de los aceites esenciales

obtenidos fue de 0.04 para el aceite obtenido de hojas de *E. gomphocephala* y 0.21 para el aceite obtenido de sus frutos. Los aceites esenciales obtenidos se conservaron en nevera a 4°C.

### **3.3. Determinación de la composición de los aceites esenciales.**

Para analizar la composición química, se preparó una dilución con hexano al 10% de cada muestra de aceite esencial obtenido. La composición cuantitativa se analizó por cromatografía de gases y la composición cualitativa se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

#### **3.3.1. Composición cuantitativa. Cromatografía de gases.**

La cromatografía de gases fue realizada utilizando un cromatógrafo de gases Clarus 500 GC de Perkin-Elmer Inc. (Wellesley, MA, EEUU), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar HP-5 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película, Phenomenex Inc., Torrance, CA, EEUU.

El programa de temperatura de la columna utilizado fue 60°C durante cinco minutos, con un gradiente de 3°C/min hasta llegar a 180°C, a continuación se empleó un gradiente de 20°C/min hasta llegar a 280°C, manteniendo esta temperatura durante diez minutos. El gas portador, fue helio a un flujo de 1 ml/min. El FID fue mantenido a una temperatura de 250°C y el inyector a 220°C.

Los índices de retención de Kovats, utilizados para identificar los compuestos, fueron calculados usando una mezcla de hidrocarburos C<sub>9</sub>-C<sub>32</sub>, que se cromatografió junto con las muestras. Una vez obtenidos los tiempos de retención, expresados en minutos, de cada uno de los componentes del aceite esencial, se determinó el índice de Kovats a partir de la siguiente fórmula:

$$IK = 100 * (n^{\circ} C HC_{n-1} + [(\log TR X - \log TR HC_{n-1}) / (\log TR HC_{n+1} - \log TR HC_{n-1})])$$

Siendo:

n<sup>o</sup> C HC<sub>n-1</sub>: número de carbonos del hidrocarburo anterior al compuesto

TR X: tiempo de retención del compuesto

TR HC<sub>n-1</sub>: tiempo de retención del hidrocarburo anterior al compuesto

TR HC<sub>n+1</sub>: tiempo de retención del hidrocarburo posterior al compuesto.

### **3.3.2. Composición cualitativa. Cromatografía de gases-espectrometría de masas.**

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se realizó utilizando un aparato Clarus 500 GC-MS de Perkin-Elmer Inc., equipado con el mismo tipo de columna descrito para la cromatografía de gases. La detección se realizó en modo de ionización de impacto electrónico (EI mode, 70 eV), siendo la temperatura de la fuente de ionización 200°C. Los espectros se obtuvieron mediante el modo de escaneo total de iones (rango de masas m/z 45-500 uma). Los cromatogramas y espectros se procesaron con el software Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Junto con las muestras se cromatografió una mezcla de hidrocarburos C<sub>9</sub>-C<sub>32</sub> para calcular posteriormente los índices de retención de Kovats, de la forma descrita en el apartado anterior.

Los compuestos fueron identificados por su espectro de masas (Adams, 2007), confirmando su identidad con los índices de Kovats y comparando sus espectros de masas y sus tiempos de retención con otros de muestras patrón o con datos disponibles en la librería NIST 98 y en la literatura.

### **3.3.4. Obtención de extractos acuosos.**

Los extractos acuosos se obtuvieron siguiendo el método descrito por Pérez *et al.* (2002). Se maceraron 20 g de hojas de *E. gomphocephala* con 200 ml de agua destilada introduciéndose en baño maría a 80°C durante 15 minutos. A continuación se filtró la solución acuosa obtenida, extrayéndose de nuevo el marco con 100 ml de agua destilada en baño maría a 80°C durante otros 15 minutos. Se volvió a filtrar y se reunieron los filtrados obtenidos. Como no se observaron sedimentos en ninguno de los extractos preparados, no fueron centrifugados. El extracto obtenido se consideró la concentración básica (100%), y fue conservado en congelador a -40°C hasta el momento de su aplicación en los ensayos. Para la preparación de las concentraciones de

ensayo, se disolvió con agua destilada el extracto original (100%), obteniéndose las concentraciones del 50, 30 y 10%.

### **3.3.5 .Evaluación del potencial de inhibición de la germinación y el crecimiento.**

Se sembraron 20 semillas de cada especie arvense (*A. hybridus*, *P. oleracea* y *E. colona*), en placas Petri de 9 cm de diámetro. Como sustrato se utilizaron dos discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro y 50 g/m<sup>2</sup> de espesor, y otros dos cubrieron las semillas, siendo impregnados con 4 ml de agua destilada (control) o de la solución correspondiente de los extractos acuosos (10, 30, 50 y 100%) o de los aceites esenciales (0.125, 0.25, 0.5 y 1µl/ml) de *E. gomphocephala*. Las placas se sellaron con Parafilm. Se realizaron 5 repeticiones (100 semillas) por cada concentración de los diferentes extractos, para cada una de las 3 especies arvenses. Las placas fueron selladas con Parafilm y se incubaron en cámara de germinación marca CLIMAS modelo APG-GROW a una temperatura de 30.0±0.1°C durante 16 horas de luz y 25.0±0.1°C durante 8 horas de oscuridad.

Para evaluar la actividad fitotóxica del aceite esencial del fruto y de los extractos acuosos de hojas de *E. gomphocephala*, se realizaron lecturas de las placas, a los 3, 5, 7, 10 y 14 días de incubación. Se registró el número de semillas germinadas y se obtuvieron imágenes digitales de las plántulas crecidas, para medir su longitud (coleoptilo más radícula), procesándolas mediante el programa Image Tool. Cada vez que se leyeron las placas, se cerraron con Parafilm y no se agregó agua, ni soluciones de los extractos acuosos o aceites esenciales durante los ensayos.

### **3.3.6. Análisis estadístico de datos**

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1. Se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos, porcentajes de germinación y longitud de las plántulas. Los porcentajes de germinación fueron transformados mediante la fórmula  $y = \arcsen \sqrt{x}$ , donde  $x$  era el porcentaje de germinación en tanto por uno antes de proceder a realizar

el ANOVA, para satisfacer los requerimientos de homocedasticidad y normalidad de los datos. El ANOVA se realizó utilizando el test de comparación múltiple de Fisher (intervalos LSD, Least Significant Difference) para la separación de medias, con un nivel de confianza del 95%. Previamente se comprobó la homocedasticidad de los datos, mediante el test de Levene.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Actividad fitotóxica *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *E. gomphocephala*.

Con el fin de evaluar su potencial herbicida, el extracto de *E. gomphocephala* fue aplicado a semillas de *A. hybridus*, *P. oleracea* y *E. colona*, no mostrando efectos significativos sobre la germinación de ninguna de ellas (Tabla 1), aunque se observó un incremento de la germinación en las semillas tratadas con las concentraciones de 50 y 100% d *A. hybridus* y en las tratadas con la de 100 % de *E. colona* con respecto a las control.

**Tabla 1. Efecto del extracto acuoso de hojas de *E. gomphocephala* sobre la germinación de semillas de *A. hybridus*, *P. oleracea* y *E. colona*.**

Concentración (%)	Germinación (% ± e.s)		
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Echinocloa colona</i>
Control	75.0 ± 5.2 a	82.0 ± 5.6 a	85.0 ± 5.2 a
10	79.0 ± 5.1 a	75.0 ± 5.5 a	82.0 ± 5.1 a
30	71.0 ± 6.2 a	70.0 ± 7.1 a	88.0 ± 2.5 a
50	82.0 ± 4.6 a	79.0 ± 2.9 a	84.0 ± 4.3 a
100	81.0 ± 2.4 a	73.0 ± 3.4 a	96.0 ± 1.9 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de probabilidad.

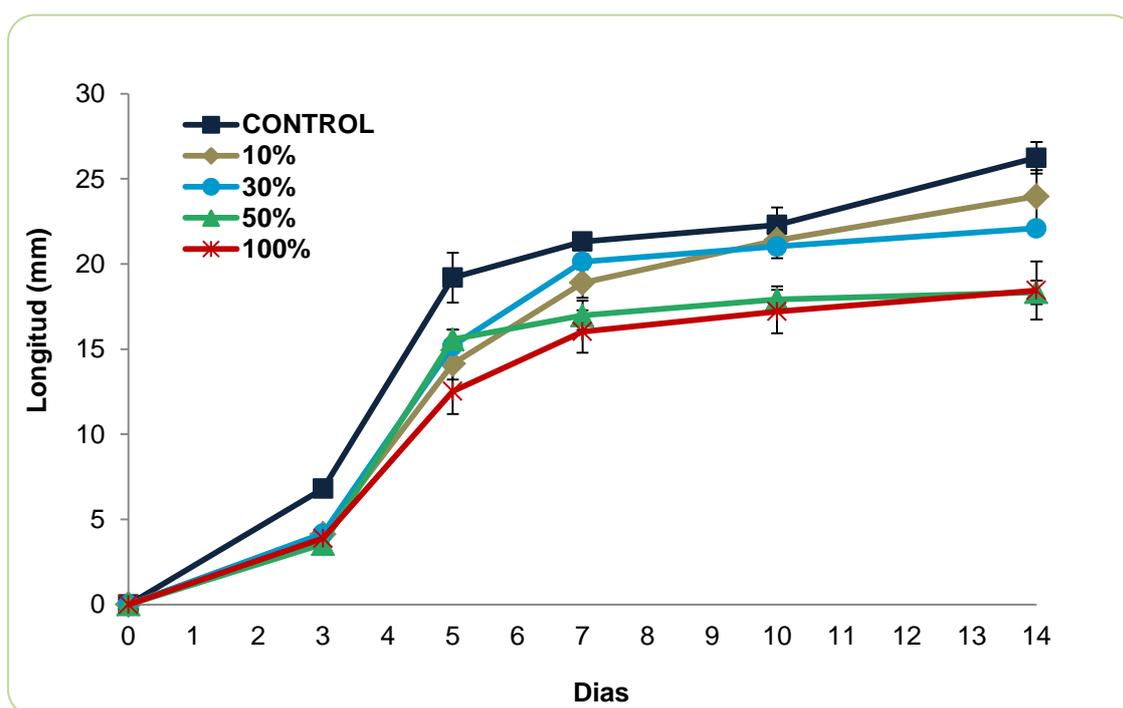
El extracto no mostró ninguna acción fitotóxica sobre el crecimiento de plántulas de *P. oleracea* y *E. colona* (Tabla 2). Sin embargo, se observaron efectos inhibitorios sobre el desarrollo de las plántulas de *A. hybridus* (Figura 1), observándose diferencias significativas en la longitud de las plántulas tratadas con las concentraciones mayores (50 y 100%), que presentaron una longitud un 28.97 y un 30.56% menor que las plántulas control, sin diferencias entre ellas. Las dosis del 10 y 30 % redujeron la longitud de las plántulas tratadas, sin llegar a ser su efecto significativo.

**Tabla 2. Efecto del extracto acuoso de hojas de *E. gomphocephala* sobre la longitud de plántulas de *A. hybridus*, *P. oleracea* y *E. colona*.**

Concentración (%)	Longitud (mm ± e.s)	
	<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Echinochloa colona</i>
Control	11.72 ± 0.45 a	41.97 ± 2.19 a
10	12.17 ± 0.55 a	34.70 ± 2.83 a
30	13.69 ± 0.62 a	37.93 ± 1.20 a
50	10.66 ± 2.67 a	40.96 ± 2.27 a
100	13.47 ± 0.56 a	35.82 ± 5.72 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de probabilidad.

**Figura 1. Efecto del extracto acuoso de hojas de *Eucalyptus gomphocephala* sobre el crecimiento plántulas de *A. hybridus*.**



#### 4.2. Actividad fitotóxica *in vitro* del aceite esencial del fruto de *E. gomphocephala*.

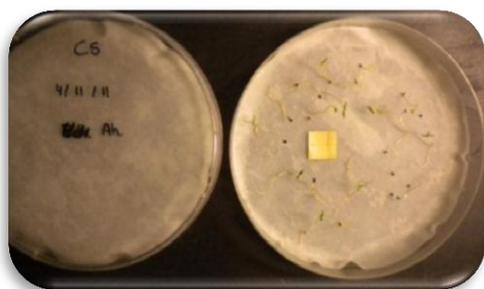
La germinación de *A. hybridus* fue totalmente inhibida por el aceite esencial de fruto de *E. gomphocephala* a todas las concentraciones aplicadas, sin diferencias entre ellas (Tabla 3). También redujo la germinación de *P. oleracea*

un 20.54% con respecto al control a la concentración superior, no siendo activas las otras concentraciones. En *E. colona* la aplicación de este aceite esencial no produjo ningún efecto significativo.

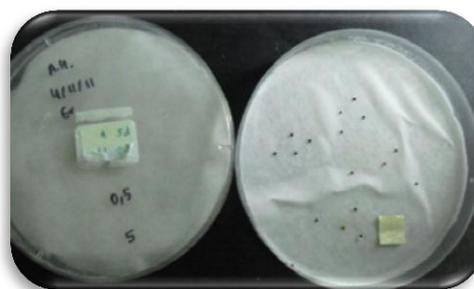
**Tabla 3. Efecto del aceite esencial del fruto de *E. gomphocephala* sobre la germinación de semillas de *A. hybridus*, *P. oleracea* y *E. colona*.**

Concentración ( $\mu\text{l/ml}$ )	Germinación (% $\pm$ e.s)		
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Echinocloa colona</i>
(Control) 0	75.0 $\pm$ 5.2	73.0 $\pm$ 3.0 a	84.0 $\pm$ 2.9 a
0.125	0.0 $\pm$ 0.0	70.0 $\pm$ 3.5 a	90.0 $\pm$ 3.5 a
0.250	0.0 $\pm$ 0.0	66.0 $\pm$ 4.6 a	87.0 $\pm$ 4.1 a
0.5	0.0 $\pm$ 0.0	72.0 $\pm$ 4.1 a	74.0 $\pm$ 6.8 a
1	0.0 $\pm$ 0.0	58.0 $\pm$ 3.0 b	90.0 $\pm$ 6.3 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de probabilidad.



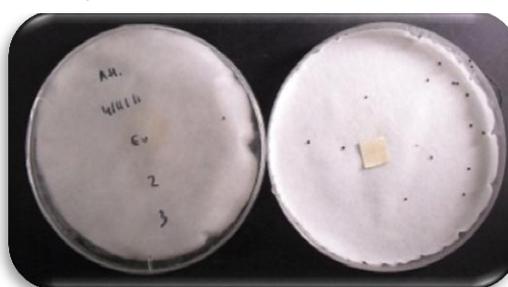
Control *A. hybridus* a los 14 días de incubación.



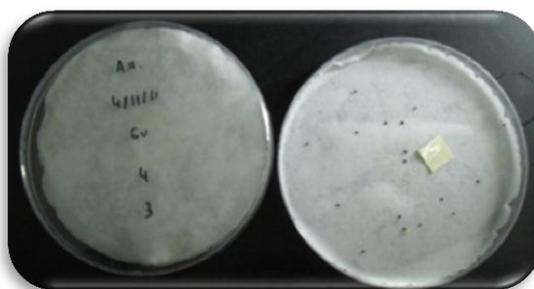
Semillas *A. hybridus* tratadas con aceite esencial 0.0125  $\mu\text{l/ml}$  a los 14 días de incubación.



Semillas *A. hybridus* tratadas con aceite esencial 0.25  $\mu\text{l/ml}$  a los 14 días de incubación.



Semillas *A. hybridus* tratadas con aceite esencial 0.5  $\mu\text{l/ml}$  a los 14 días de incubación.



Semillas *A. hybridus* tratadas con aceite esencial 1  $\mu\text{l/ml}$  a los 14 días de incubación.

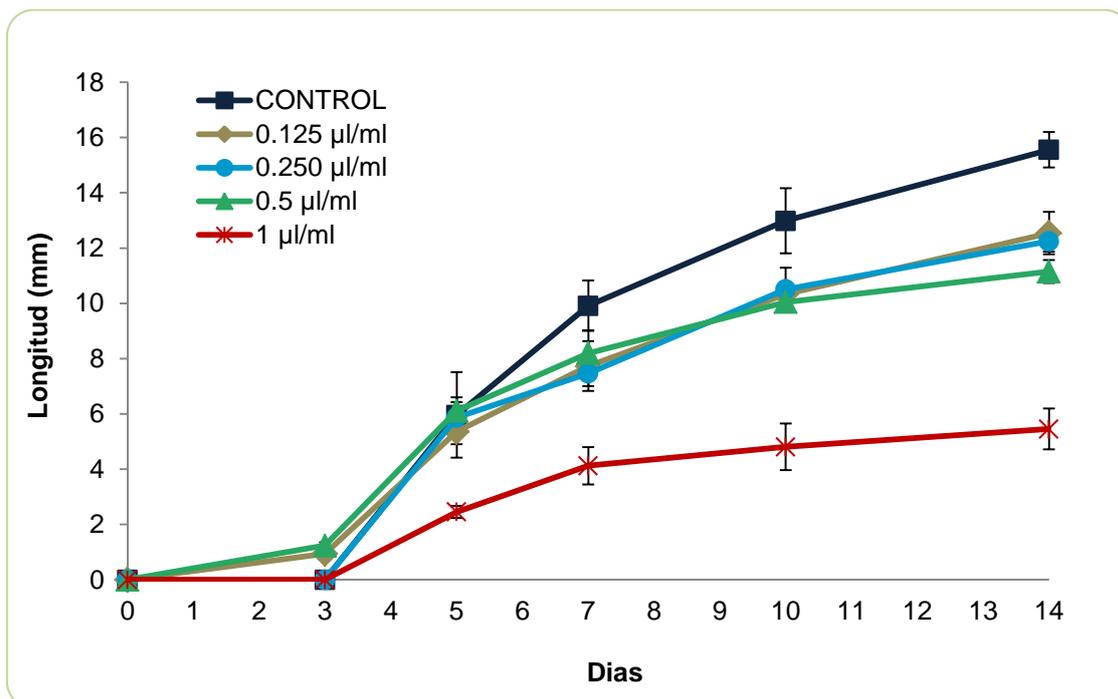
Con respecto a los efectos sobre el desarrollo de las plántulas, al no germinar las semillas de *A. hybridus* tratadas con aceite esencial de fruto de *E. gomphocephala*, en esta especie sólo se evaluó el crecimiento de las plántulas control (Tabla 4). Todas las plántulas de *P. oleracea* tratadas con aceite esencial presentaron una longitud significativamente menor que las plántulas control (Figura 2). No hubo diferencias en el desarrollo entre las plántulas tratadas con las tres concentraciones inferiores (0.125, 0.250 y 0.5  $\mu\text{l/ml}$ ), que presentaron una longitud un 18.77, 21.34 y 28.34% menor que las control, pero sí entre ellas y la concentración mayor, que redujo el crecimiento de las plántulas un 64,97%. Las plántulas de *E. colona* tratadas con las distintas concentraciones del aceite esencial presentaron una longitud menor que las control, sin llegar a ser estas diferencias significativas.

**Tabla 4. Efecto del aceite esencial del fruto de *E. gomphocephala* sobre la longitud de las plántulas de *A. hybridus*, *P. oleracea* y *E. colona*.**

Concentración ( $\mu\text{l/ml}$ )	Longitud (mm $\pm$ e.s)		
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Echinocloa colona</i>
(Control) 0	26.24 $\pm$ 0.26	15.56 $\pm$ 0.64 a	38.18 $\pm$ 1.45 a
0.125	–	12.64 $\pm$ 0.77 b	30.52 $\pm$ 1.68 a
0.250	–	12.24 $\pm$ 0.37 b	30.35 $\pm$ 1.99 a
0.5	–	11.15 $\pm$ 0.42 b	29.92 $\pm$ 2.35 a
1	–	5.45 $\pm$ 0.74 c	28.84 $\pm$ 2.45 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de probabilidad

**Figura 2. Efecto del aceite esencial del fruto de *E. gomphocephala* sobre el crecimiento de plántulas de *P. oleracea*.**



#### **4.3. Composición del aceite esencial de hoja y fruto de *E. gomphocephala*.**

En el aceite esencial obtenido de hojas de *E. gomphocephala* se identificaron un total de 25 compuestos, constituyendo el 94.64% de su composición (Tabla 5). El mayor número de compuestos determinados fueron monoterpenos oxigenados (10), representando un 47.93%, destacando entre ellos el  $\alpha$ -terpineol (27.60%) como compuesto mayoritario del aceite. Los monoterpenos hidrocarbonados constituyeron la siguiente fracción en importancia (5 compuestos identificados, 21.37%). A este grupo perteneció el segundo compuesto mayoritario encontrado, el  $\beta$ -pineno (11.78%), mientras que el tercer compuesto más abundante fue el 1,8-cineol (9.46%).

Fueron identificados 28 compuestos en el aceite esencial de frutos de *E. gomphocephala*, que constituyeron el 96.39% de su composición (Tabla 6). Al igual que en el aceite de hoja, los monoterpenos hidrocarbonados fueron el grupo más importante tanto desde el punto de vista cuantitativo (48.78%) como cualitativo (10 compuestos identificados).

**Tabla 5. Composición del aceite esencial de hojas de *Eucalyptus gomphocephala* DC.**

Compuestos	IK	Área (%)
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		<b>21.37</b>
α-Pineno	939	8.69
Canfeno	955	0.23
β-Pineno	983	11.78
Mirceno	993	0.42
p-Cimeno	1031	0.25
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>47.93</b>
1,8-Cineol	1038	9.46
Fencheno	1090	0.35
α-Fenchol	1127	1.78
<i>trans</i> -Pinocarveol	1150	2.88
Hidrato de canfeno	1163	0.60
Pinocarvona	1171	0.67
Borneol	1181	2.91
Terpinen-4-ol	1187	1.45
α-Terpineol	1205	27.60
Timol	1289	0.23
<b>Sequiterpenos oxigenados</b>		<b>14.60</b>
Mirtenol	1207	1.65
<i>trans</i> -Nerolidol	1568	4.31
Espatulenol	1585	3.36
Globulol	1593	4.93
Ledol	1611	0.35
<b>Aromáticos</b>		<b>8.31</b>
Metil eugenol	1413	8.31
<b>Cetonas</b>		<b>1.29</b>
Baeckeol	1879	1.29
<b>Otros</b>		<b>1.14</b>
Hexanoato de isoamilo	1216	0.57
Pentacosano	2502	0.21
Heptacosano	2701	0.36
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>94.64</b>

Compuestos por grupos fitoquímicos y en orden de elución en columna HP-5. t, trazas < 0.02%. IK, índice de Kovats relativo a C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub> n-alcanos en la columna HP-5

A este grupo perteneció el compuesto mayoritario del aceite esencial, que en el caso del fruto fue el β-pineno (23.15%), mientras que el segundo y tercer compuestos más abundantes fueron los monoterpenos oxigenados 1,8-cineol (21.62%) y α-terpineol (15.93%). No se han llevado a cabo estudios anteriores

sobre la composición de los aceites esenciales de *E. gomphocephala* de España, aunque sí de otros lugares, como Túnez (Elaissi *et al*, 2010) y Egipto (El-Mageed *et al.*, 2011).

**Tabla 6. Composición del aceite esencial de frutos de *Eucalyptus gomphocephala* DC.**

Compuestos	IK	Área (%)
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		<b>48.78</b>
$\alpha$ -Tuyeno	931	0.18
$\alpha$ -Pineno	941	15.00
Canfeno	954	0.57
$\beta$ -Pineno	984	23.15
$\beta$ -Mirceno	991	1.61
$\alpha$ -Felandreno	1011	4.72
p-Cimeno	1032	1.90
<i>trans</i> -Ocimeno	1053	0.10
$\gamma$ -Terpineno	1065	0.48
Terpinoleno	1090	1.07
<b>Monoterpenos Oxigenados</b>		<b>41.04</b>
1,8-Cineol	1038	21.62
Linalol	1100	t
$\beta$ -Fenchol	1127	0.86
<i>trans</i> -pinocarveol	1150	0.24
Borneol	1181	0.96
Terpinen-4-ol	1188	1.38
$\alpha$ -Terpineol	1206	15.93
<i>trans</i> -Piperitol	1218	0.05
<b>Sequiterpenos Oxigenados</b>		<b>2.87</b>
<i>trans</i> -Nerolidol	1568	0.60
Espatulenol	1584	0.40
Globulol	1592	1.67
Viridiflorol	1600	0.20
<b>Aromático</b>		<b>1.72</b>
Metil eugenol	1412	1.72
<b>Cetonas</b>		<b>1.82</b>
Metil éter Isobaeckeol	1766	0.18
Baeckeol	1879	0.96
Jensenona	1993	0.68
<b>Otros</b>		<b>0.16</b>
Hexanoato de isoamilo	1220	0.11
Heptacosano	2701	0.05
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>96.39</b>

Compuestos por grupos fitoquímicos y en orden de elución en columna HP-5. t, trazas < 0.02%. IK, índice de Kovats relativo a C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub> n-alcanos en la columna HP-5.

## 5. DISCUSIÓN

Al comparar la eficacia fitotóxica *in vitro* del extracto acuoso de hojas y el aceite esencial de frutos de *E. gomphocephala* se observa en general, que el aceite esencial fue más eficaz que el extracto acuoso, ya que inhibió totalmente la germinación de *A. hybridus* a todas las concentraciones ensayadas (Tabla 4), y la concentración mayor también controló la germinación de *P. oleracea*, reduciendo su crecimiento todas las concentraciones aplicadas (Figura 2), mientras que el extracto acuoso sólo fue activo frente al crecimiento de *A. hybridus* a las dos concentraciones superiores (Figura 1). Ninguno de los dos fue activo frente a *E. colona*. Esto confirma los resultados obtenidos por otros autores con otras especies de *Eucalyptus*: la actividad mostrada por el aceite esencial de *E. camaldulensis* fue mucho mayor que la de su extracto acuoso, ya que controló totalmente la germinación de 4 de las 5 especies sobre las que se ensayó, mientras que el extracto acuoso solo controló totalmente 2 de ellas (Verdeguer, 2011). Esto puede ser debido a que las especies ensayadas son más sensibles a los compuestos presentes en el aceite esencial que en el extracto acuoso, o a la diferente naturaleza química de los compuestos presentes en uno y otro.

De los resultados obtenidos, podemos afirmar que la acción del aceite esencial de fruto y el extracto acuoso de hoja de *E. gomphocephala* depende de diferentes factores, como la especie frente a la que actúan (Lee *et al.*, 2002), logrando ser en algunos procesos selectivos, impidiendo la germinación de determinadas arvenses, sin mostrar efectos e incluso estimulando la germinación de cultivos u otras especies arvenses (Verdeguer, 2011).

Otros extractos acuosos han mostrado también una actividad selectiva frente a determinadas especies, como el extracto de *Hypericum perforatum* L., que presentó un efecto significativo sobre la germinación de *A. retroflexus*, pero no sobre *P. oleracea* (Azizi *et al.*, 2006).

Comparando la actividad de *E. gomphocephala* con la de otros *Eucalyptus*, como *E. camaldulensis* (Verdeguer, 2011), observamos que el aceite esencial y el extracto acuoso de hojas de *E. camaldulensis* fueron más activos que los de *E. gomphocephala* sobre las mismas especies. También ha sido estudiado el

potencial fitotóxico del aceite esencial de *E. citriodora*, que controló la germinación de *A. viridis* y *E. crus-galli*, pero también causó daños en trigo, maíz, rábano y arroz (Batish *et al.*, 2008). El aceite esencial de *E. globulus* al 0.7% (v/v) ejerció un gran poder inhibitorio sobre la germinación de *A. retroflexus* y *P. oleracea* (Azizi y Fuji, 2006).

El efecto de los extractos acuosos y aceites esenciales es asimismo dependiente de la concentración aplicada, pudiendo en ocasiones las bajas concentraciones no mostrar efecto o incluso llegar a producir efectos estimulatorios, mientras otras superiores ejercen efectos inhibitorios. El extracto acuoso metanólico de hojas de neem a la concentración de 0,001g/ml produjo efectos estimulantes en el crecimiento de los brotes de *Phleum pratense* L. y *E. colona*, mientras que a concentraciones de 0.3 g/ml inhibió el crecimiento de los brotes de *E. colona* (Salam *et al.*, 2010).

El aceite esencial de fruto de *E. gomphocephala* ha evidenciado poseer efecto fitotóxico, inhibiendo la germinación y el crecimiento de dos de las tres arvenses estudiadas, por lo tanto podría ser una alternativa a los herbicidas sintéticos. Al tratarse de una sustancia natural su efecto en el ecosistema es menos perjudicial que los herbicidas convencionales. Además la selectividad exhibida podría facilitar su empleo, aunque se deben realizar otros estudios con otras especies arvenses y cultivos para comprobar su efecto sobre ellos. Sin embargo, aceites esenciales y extractos acuosos de otras especies de *Eucalyptus*, en concreto de *E. camaldulensis* y *E. globulus*, han mostrado un mayor potencial fitotóxico que *E. gomphocephala* sobre dos de las especies estudiadas (*A. hybridus* y *P. oleracea*) (Azizi yFuji, 2006; Verdeguer, 2011).

La mayoría de trabajos que estudian la actividad alelopática de determinadas especies, normalmente se han centrado en ensayar el poder inhibitorio del aceite esencial (Verdeguer, 2011). La complejidad de los mecanismos de acción y de los compuestos presentes en los extractos o aceites determinan la toxicidad sobre una especie determinada, ya que puede que la especie sea sensible o no según su metabolismo, impidiendo la aparición de resistencias futuras (Duke *et al.*, 2000b)

El aceite esencial de frutos de *E. gomphocephala* no solo reduce la germinación sino también el crecimiento. Este efecto puede ser atribuido a la inhibición de la actividad mitótica de las plántulas en crecimiento (Vaughn y Spencer, 1993).

La distinta respuesta de las semillas de las arvenses al aceite esencial de *Eucalyptus* puede ser debido al diferente tamaño de las semillas y a la variabilidad genética (Setia *et al.*, 2007).

Aunque el mecanismo del efecto inhibitorio de los aceites de *Eucalyptus* sigue siendo desconocido, podría deducirse que inhiben la actividad mitótica de las células en crecimiento. Los monoterpenos que constituyen el aceite de *Eucalyptus* (cineol, citronelal, citronelol y limoneno) reducen el contenido de clorofila, y por ello podrían los aceites de *Eucalyptus* interferir con cambios en el contenido de clorofila y la respiración celular (Batish *et al.*, 2007). El mecanismo de bioactividad de los aceites de *Eucalyptus* en las plantas reduce la supervivencia de las células y el contenido en clorofila, ARN y carbohidratos, tanto solubles en agua como en ácidos (Kohli *et al.*, 1988).

Los monoterpenos, que se encuentran formando parte de la composición de numerosos aceites esenciales, son importantes agentes alelopáticos en climas cálidos y secos, donde actúan en la fase de vapor, ya que la alta densidad de vapor de los aceites esenciales penetra en el suelo, afectando adversamente a las plantas que crecen alrededor de la planta que los produce (Kohli y Singh, 1991; Vaughn y Spencer, 1993; Koitabashi *et al.*, 1997). Algunos monoterpenoides son potentes inhibidores de la germinación de las semillas y la elongación radical (Mancini *et al.*, 2009; De Martino *et al.*, 2010).

Sin embargo, los aceites esenciales son una mezcla de sustancias químicas complejas y poseen mayor actividad que sus componentes individuales. Se debe tener en cuenta que la composición química de los aceites de *Eucalyptus* y sus actividades biológicas asociadas varía significativamente entre las distintas especies (Zhang *et al.*, 2010).

Las distintas actividades de los aceites esenciales están relacionadas con las diferencias en su composición química. Algunos autores han afirmado que

aceites ricos en compuestos oxigenados son más activos que los que tienen un alto contenido de compuestos hidrocarbonados (Scrivanti *et al.*, 2003; López *et al.*, 2009). Esto explicaría la mayor actividad del aceite esencial de *E. camaldulensis* con respecto a *E. gomphocephala*, ya que en el primero fueron identificados un 63.08% de compuestos oxigenados (Verdeguer, 2011), mientras que en el último los compuestos oxigenados constituyeron un 43.91% (Tabla 6).

No existen muchos trabajos sobre la composición del aceite esencial de hoja de *E. gomphocephala*, y no hay estudios sobre la composición de aceite esencial de sus frutos. Se determinó la composición del aceite esencial de hojas de *E. gomphocephala* del arboretum de Korbous (Túnez), identificando como componente mayoritario el *trans*-pinocarveol (12.6%), seguido del globulol (7.8%) y 1,8 cineol (6.1%) (Elaissi *et al.*, 2010). El aceite esencial de *E. gomphocephala* de Egipto tenía como componentes principales acetato de dihidrocarveol (50.82%), *p*-cimeno (10.61%) y citral (8.11%), además de otros 11 compuestos en cantidades menores (El-Mageed *et al.*, 2011). En base a los estudios existentes podemos concluir que la composición del aceite de *E. gomphocephala* es variable, dependiendo del origen y las condiciones de crecimiento de la planta.

Al comparar el aceite de hoja y fruto obtenido en este estudio, observamos que los 3 compuestos mayoritarios de ambos aceites,  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol y  $\alpha$ -terpineol coinciden, solo cambian las proporciones en ambos aceites. También se puede destacar que la fracción más importante en el aceite esencial de fruto fueron los monoterpenos hidrocarbonados, mientras que en el aceite esencial de hoja la fracción más notoria fueron los monoterpenos oxigenados. Debido al bajo rendimiento en aceite de las hojas de *E. gomphocephala*, se decidió estudiar el potencial fitotóxico del aceite de frutos.

En el aceite esencial de fruto de *E. gomphocephala* se encontraron otros compuestos químicos, como el baeckeol y el metil éter isobaeckeol, no identificados en los aceites de *E. gomphocephala* de Túnez y Egipto, pero presentes en los aceites esenciales de *E. chartaboma* Nicolle y *E. miniata* Cunn (Ireland *et al.*, 2004) y la jensenona, que tiene efectos antialimentarios sobre

marsupiales, presente en un 70% en *E. jensenii* (Bolande *et al.*, 1992; Stuart *et al.*, 2004).

## 6. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de frutos de *E. gomphocephala* mostró mayor actividad fitotóxica *in vitro* frente a las arvenses ensayadas que el extracto acuoso de sus hojas.

2. *Amaranthus hybridus*, se mostró como la especie más sensible tanto al aceite esencial de fruto como al extracto acuoso de hojas de *E. gomphocephala*. *Portulaca oleracea* presentó sensibilidad solamente al aceite esencial, mientras que *E. colona* fue la especie más resistente, no manifestando ningún efecto.

3. Los tres compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de hoja y fruto de *E. gomphocephala* fueron los mismos, cambiando sus proporciones:  $\alpha$ -terpineol (27.6%),  $\beta$ -pineno (11.78%) y 1,8-cineol (9.46%) se determinaron en el aceite esencial de hoja, mientras que  $\beta$ -pineno (23.15%), 1,8-cineol (21.62%) y  $\alpha$ -terpineol (15.93%) en el de fruto.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, CarolStream, Illinois, USA.

Alfonso, M., Villasana, R., Lorenzo, Y., Álvarez, M.E., Pérez, D., Uranga, H., 2005. Análisis fitoquímico de cinco plantas con actividad alelopática. Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM), Varadero, Matanzas, Cuba, pp. 592-595.

Altieri, M., 2009. Biotecnología agrícola en el mundo en desarrollo. Ciencias 92, 100-113.

Angelini, L.G., Carpanese, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Macchia, M., Flamini, G., 2003. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6158-6164.

Arminante, F., De Falco, E., De Feo, V., De Martino, L., Mancini, E., Quaranta, E., 2006. Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean Labiatae. Acta Horticulturae 723, 347-352.

Azirak, S., Karaman, S., 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. Acta Agriculturae Scandinavica Section B 58, 88-92.

Azizi, M., Fuji, Y., 2006. Allelopathic effect of some medicinal plant substances on seed germination of *Amaranthus retroflexus* and *Portulaca oleraceae*. Acta Horticulturae 699, 61-68.

Barton, A.F.M., 2000. The oil mallee project, a multifaceted industrial ecology case study. Journal of Industrial Ecology 3, 161-176.

Bastidas, O., 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. Química viva 7, 2-34.

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

Batish, D.R., Singh, H.P., Setia, N., Kaur, S., Kohli, R.K., 2006. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oils from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. Zeitschrift für Naturforschung C 61, 465-471.

Batish, D.R., Singh, H.P., Setia, N., Kohli, R.K., Kaur, S., Yadav, S.S., 2007. Alternative control of littleseed canary grass using eucalypt oil. Agronomy for Sustainable Development 27, 171-177.

Benner, J.P., 1996. Crop protection agents from higher plants. An overview, en: Copping, L.G. (Ed.), Crop protection agents from nature: natural products and analogues. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, pp. 217-229.

Boland, D.J., Brophy, J.J., Fookes, C.J.R., 1992. Jensenone, a ketone from *Eucalyptus jensenii*. Phytochemistry 31, 2178-2179.

- Blodgett, J.T., Swart, W.J., 2002. Infection, colonization, and disease of *Amaranthus hybridus* leaves by the *Alternaria tenuissima* group. *Plant Disease* 86, 1199-1205.
- Brooker, H., Kleinig, A., 2006. Field guide to *Eucalyptus* vol.1. South-eastern Australia, third ed. Bloomings, Melbourne.
- Chauhan, B.S., Johnson, D.E., 2009. Seed germination ecology of *Portulaca oleracea* L.: an important weed of rice and upland crops. *Annals of Applied Biology* 155, 61-69.
- Chun, J.C., Han, K.W., Jang, B.C., Shin, H.S., 1988. Determination of phenolic compounds responsible for allelopathy in upland weeds. *Korean Journal of Weed Science* 8, 258-264.
- Connick, W.J., Bradow, J.M., Legendre, M., 1989. Identification and bioactivity of volatile allelochemicals from amaranth residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 792-796.
- Constance, D.H., 2010. Sustainable agriculture in the United States: a critical examination of a contested process. *Sustainability* 2, 48-72.
- Daehler, C.C., 1998. The taxonomic distribution of invasive Angiosperm plants: ecological insights and comparison to agricultural weeds. *Biological Conservation* 84, 167-180.
- Danin, A., Reyes-Betancort, J.A., 2006. The status of *Portulaca oleracea* L. in Tenerife, The Canary Islands. *Lagascalia* 26, 71-81.
- Dayan, F., Romagni, J., Tellez, M., Romano, A., Duke, S., 1999. Managing weeds with natural products-harnessing the power of natural products in weed management. *Pesticide Outlook* 10, 185-188.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 4022-4034.
- De Feo, V., De Martino, L., Quaranta, E., Pizza, C., 2003. Isolation of phytotoxic compounds from Tree-of-Heaven (*Ailanthus altissima* Swingle). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1177-1180.
- De Feo, V., De Simone, F., Senatore, F., 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 61, 573-578.
- De Martino, L., Mancini, E., de Almeida, L.F.R., De Feo, V., 2010. The antigerminative activity of twenty-seven monoterpenes. *Molecules* 15, 6630-6637.
- De Mastro, G., Fracchiolla, M., Verdini, L., Montemurro, P., 2006. Oregano and its potential use as bioherbicide. *Acta Horticulturae* 723, 335-345.
- Duke, S.O., Dayan, F.E., Romagni, J.G., Rimando, A.M., 2000a. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed research* 40, 99-111.

Duke, S.O., Romagni, J.G., Dayan, F.E., 2000b. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection* 19, 583-589.

Einhellig, F.A., 1995. Allelopathy: Current status and future goals, en: Inderjit, Dakshini, K.M.M., Einhellig, F.A. (Eds.), *Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications*. American Chemical Society Symposium Series 582, Washington, D.C., pp. 1-25.

El Mageed, A., Osman, A., Tawfik, A., Mohammed, A., 2011. Chemical composition of the essential oils of four *Eucalyptus* species (Myrtaceae) from Egypt. *Research Journal of Phytochemistry* 5, 115-122.

Elaissi, A., Medini, H., Khouja, M., Simmonds, M., Lynene, L., Farhat, F., Chemili, R., Skhiri, H., 2010. Variation in volatile leaf oils of eleven *Eucalyptus* species harvested from Korbous arboreta (Tunisia). *Chemistry & Biodiversity* 7, 1841-1854.

El-Rokiek, K.G., Messiha, N.K., El-Masry, R.R., Saad El-Din, S.A., 2011. Evaluating the leaf residues of *Eucalyptus globulus* and *Mangifera indica* on growth of *Cynodon dactylon* and *Echinochloa colonum*. *Journal of Applied Sciences Research* 7, 1793-1799.

Fomsgaard, I.S., Mathiassen, S., Kudsk, P., Hansen, L.M., 2001. ¿Es el aprovechamiento de las propiedades alelopáticas para el control de malas hierbas en cereales una estrategia adecuada desde el punto de vista medioambiental?. Congreso 2001 de la Sociedad Española de Malherbología, Leon, Spain, 20-22 Nov. 2001.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006. FAOSTAT-Agriculture. <http://www.fao.org>.

Galinato, M.I., Moody, K., Piggin, C.M., 1999. Upland rice weeds of South and Southeast Asia. International Rice Research Institute, Makati City, Philippines.

Heap, I., 2011 The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. 26 Diciembre 2011. <http://www.weedscience.com>

Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J., Herberger, J., 1977. World weeds: natural histories and distribution. John Wiley and Sons, Inc., Toronto, Ontario, pp. 226-235.

Holm, L.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V., Herberger, J.P., 1991. The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. The University Press of Hawaii, Malabar, Florida, USA.

Ireland, B.F., Goldsack, R.J., Brophy, J.J., Fookes, C.J.R., Clarkson, J. R., 2004. The leaf essential oils of *Eucalyptus miniata* and its allies. *Journal of Essential Oil Research* 16, 89-94.

Kalinova, J., 2010. Allelopathy and Organic Farming. *Sustainable agriculture* 3, 379-418.

- Kauffman, C.S., Weber, L.E., 1990. Grain amaranth, en: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advances in New Crops. Proceedings of the first national symposium 'New crops: research, development, economics'*, Indianapolis, Indiana, USA, 23-26 October 1988. Timber Press, Portland, Orlando, pp. 127-139.
- Kim, K., 1994. Ecophysiology of *Echinochloa* species and their management, en: Sastroutomo, S. S., Auld, B. A. (Eds.), *Appropriate weed control in Southeast Asia. Proceedings of an FAO-CAB International Workshop*, Kuala Lumpur, Malaysia, 17-18 May 1994, CAB International, Wallingford, UK, pp.18-26.
- Kocacaliskan, I., Terzi, I., 2001. Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76, 436-440.
- Kohli, R.K., 1990. Allelopathic properties of *Eucalyptus*. MAB-DoEn project report. Government of India.
- Kohli, R.K., Batish, D.R., Singh, H.P., 1998. Eucalypt oil for the control of parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.). *Crop Protection* 17, 119-122.
- Kohli, R.K., Singh, D., 1991. Allelopathic impact of volatile components from *Eucalyptus* on crop plants. *Biologia Plantarum (Praha)* 33, 475-483.
- Koitaishi, R., Suzuki, T., Kawazu, T., Sakai, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., 1997. 1,8-Cineole inhibits roots growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research* 110, 1-6.
- Labrada, R., Caseley, C., Parker, C., 1996. *Estudios FAO de Producción y Protección Vegetal* 120.
- Lee, S.Y., Shim, K.C., Kil, J.H., 2002. Phytotoxic effect of aqueous extracts and essential oils from southern marigold (*Tagetes minuta*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30, 161-169.
- Legrand, D., 1958. Desmembración del género *Portulaca* II. *Comunicaciones Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo* 3, 1-17.
- Leguizamón, E., 2007. *Ecología y dinámica poblacional de malezas: bases para su manejo racional*. Departamento de producción vegetal y malezas, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Zavalla, Santa Fe, pp 2-11.
- Liu, X., Chen, Q., Wang, Z., Xie, L., Xu, Z., 2008. Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. *Frontiers of Forestry in China* 3, 232-236.
- López, M.L., Bonzani, N.E., Zygadlo, J.A., 2009. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 882-890.
- Lovell, S.T., Wax, L.M., Horak, M.J., Peterson, D.E., 1996. Imidazolinone and sulfonyleurea resistance in a biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*). *Weed Science* 44, 789-794.

- Lugo, M.L., González, A., Talbert, R.E., 1995. Smooth pigweed (*Amaranthus hybridus* L.) interference with snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) quality. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 79, 173-179.
- Mabberley, D.J., 1990. *The plant-book*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Macías, F.A., 1995. Allelopathy in the search for natural herbicide models. *ACS Symposium Series* 582, 310-329.
- Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Galindo, J.C.G., 2007. Allelopathy-a natural alternative for weed control. *Pest Management Science* 63, 327-348.
- Macini, E., Arnald, N., De Martino, L., De Feo, V., Formizano, C., Rigano, D., Senatore, F., 2009. Chemical composition and phytotoxic effects of essential oils of *Salvia hierosolymitana* Boiss. and *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon 14, 4725-4736.
- Maillet, J., Lopez-García, C., 2000. What criteria are relevant for predicting the invasive capacity of a new agricultural weed? The case of invasive American species in France. *Weed Research* 40, 11-26.
- Maiyo, Z.C., Ngure, R.M., Matasyoh, J.C., Chepkorir, R., 2010. Phytochemical constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of three *Amaranthus* plant species. *African Journal of Biotechnology* 9, 3178-3182.
- Martínez de Carrillo, M., Alfonso, P., 2003. Especies de malezas más importantes en siembras hortícolas del valle de Quibor, Estado Lara, Venezuela. *Bioagro* 15, 91-96.
- Michael, P. W., 1983. Taxonomy and distribution of *Echinochloa* species with special reference to their occurrence as weeds of rice, en *Weed Control in Rice*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp. 291-306.
- Miquilena, L., Lazo, J.V., 2005. Evaluación del potencial alelopático de lavados foliares de *Echinochloa colona* (L) Link sobre especies cultivadas ubicadas en agroecosistemas de los Estados Falcón y Aragua, Venezuela. *Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)*, Varadero, Matanzas, Cuba, pp. 625-630.
- Molisch, H., 1937. *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie*. Fischer, Jena, Germany.
- Monks, D., 1993. *Veg-I-News* 12, 23-26. Cooperative Extension Service. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Murillo, E., De Los reyes, L., 2003. Potencial alelopático de los lixiviados acuosos y extractos orgánicos de *Artemisia absinthium* (asterácea). *Vitae* 10, 51-58.
- Nemes-Kósa, S., Cserhádi, T., 1995. Quantitative structure-activity relationship study on the inhibitory effect of some herbicides on the growth of soil micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 79, 483-491.

Pérez, J.G., Torres, S., Puente, M., Aguilar, R., 2002. Efecto alelopático del extracto acuoso de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) sobre ocho cultivos económicos. Documento online.

<http://www.ucf.edu.cu/URBES/CD/ALELOPATIA%20DEL%20TABACO.htm>

Poellnitz, K.V., 1934. Versuch eine Monographie der Gattung *Portulaca* L. Feddes Repertorium 37, 240-320.

Puente, M., Allaert, K., Herrera, L., Suarez, N., Torres, S., Pérez, C., Rodríguez, M., 2003. Determinación de la actividad alelopática de extractos vegetales sobre algunos hongos fitopatógenos del suelo. Centro Agrícola 30, 64-68.

Putnam, A.R., Tang, C.S., 1986. Allelopathy: State of the Science, en: Putnam, A.R., Tang, C.S. (Eds.), The Science of Allelopathy. John Wiley and Sons, New York, pp. 1-22.

Rao, A.N., Johnson, D.E., Sivaprasad, B., Ladha, J.K., Mortimer, A.M., 2007. Weed management in direct-seeded rice. Advances in Agronomy 93, 153-255.

Rawate, P.D., 1983. Amaranth (pigweed): A crop to help solve the world protein shortage, en: Lockeretz, A.W. (Eds.), Environmentally Sound Agriculture. Selected Papers from the Fourth International Conference of the International Federation of Organic Agriculture Movements. Praeger, New York, pp. 287-298.

Rice, E.L., 1984. Allelopathy, second ed. Academic Press, Orlando, Florida.

Salam, A., Noguchi, H., 2010. Evaluation of allelopathic potential of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) against seed germination and seedling growth of different test plant species. Journal of Sustainable Agriculture 2, 20-25.

Scarfato, P., Avallone, E., Lannelli, P., De Feo, V., Acierno, D., 2007. Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity. Journal of Applied Polymer Science 105, 3568-3577.

Scrivanti, R.L., Zunino, M.P., Zygadlo, J.A., 2003. *Tagetes minuta* and *Schinus molle* essential oils as allelopathic agents. Biochemical Systematics and Ecology 31, 563-572.

Setia, N., Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K., 2007. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. Journal of Environmental Biology 28, 63-66.

Silva, M., Magriço, S., Dias, A.S., Dias, L.S., 2007. Allelopathic Plants. 20. *Portulaca oleracea* L. Allelopathy Journal 19, 275-286.

Singh, H.P., Batish, D.R., Setia, N., Kohli, R.K., 2005. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. Annals of Applied Biology 146, 89-94.

Stonard, R.J., Miller-Wideman, M.A., 1995. Herbicides and plant growth regulators, en: Godfrey, C.R.A. (Eds.), Agrochemicals from natural products. Marcel Dekker, New York, pp. 285-310.

Storrie, A., Boutsalis, P., Penberthy, D., Moylan, P., 2008. Glyphosate resistance in awnless barnyard grass (*Echinochloa colona* (L.) Link) and its implications for Australian farming systems, en: Van Klinken, R.D., Osten, V.A., Panetta, F.D., Scanlon, J.C. (Eds.), Proceedings of the 16th Australian Weeds Conference, Queensland Weeds Society, Brisbane, pp. 74-76.

Stuart MC, Sue.B., Noel D., William, F and Konrad M., 2004. Jensenone: Biological reactivity of a marsupial antifeedant from *Eucalyptus*. Journal Chemical Ecology, 30:19-36.

Tabaglio, V., Gavazzi, C., Schulz, M., Marocco, A., 2008. Alternative weed control using the allelopathic effect of natural benzoxazinoids from rye mulch. Agronomy for Sustainable Development 28, 397-401.

Thi, H., Toshiaki, T., Kiyotake, S., Vachin, D., Noguchi, K., 2008. Allelopathy and the allelopathic activity of a phenylpropanol from cucumber plants. Plant Growth Regulation 56, 1-5.

Torres, L., 2001. El uso de herbicidas y las medidas agro-ambientales. Agricultura, 665-667.

Trader, B.W., Wilson, H.P., Hagood, E.S., Hines, T.E., 2009. Halosulfuron resistance in smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) populations. Weed Technology 23, 460-464.

Valverde, B., Heap, I., 2009. Estado actual de la resistencia de herbicidas en el mundo. Investigaciones y desarrollo en agricultura tropical, Costa Rica, pp 32.

Valverde, B.E., Riches, C.R., Caseley, J.C., 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. Cámara de Insumos Agropecuarios, San José.

Vasilakoglou, I., Dhima, K., Wogiatzi, E., Eleftherohorinos, I., Lithourgidis, A., 2007. Herbicidal potential of essential oils of oregano or marjoram (*Origanum* spp.) and basil (*Ocimum basilicum* L.) on *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. and *Chenopodium album* L. weeds. Allelopathy Journal 20, 297-306.

Vaughn, S.F., Spencer, G.F., 1993. Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. Weed Science 41, 114-119.

Verdeguer, M., 2011. Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Verdeguer, M., Blázquez, M.A., Boira, H., 2009. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. Biochemical Systematics and Ecology 37, 362-369.

Voznesenskaya, E.V., Koteyeva, N.K., Edwards, G.E., Ocampo, G., 2010. Revealing diversity in structural and biochemical forms of C4 photosynthesis and a C3-C4 intermediate in genus *Portulaca* L. (Portulacaceae). Journal of Experimental Botany 61, 3647-3662.

Vyvyan, J.R., 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58, 1631-1646.

Webster, T.M., 2002. Weed survey-southern states, vegetable, fruit, and nut crops subsection. *Proceedings Southern Weed Science Society* 55, 245-247.

Weston, L.A., 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal* 88, 860-866.

Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A.H., Demiral, T., 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 61, 49-57.

Zhang, J., An, M., Wu, H., Stanton, R., Lemerle, D., 2010. Chemistry and bioactivity of *Eucalyptus* essential oils. *Allelopathy Journal* 25