

Ácidos fenólicos en paja de trigo. ¿Son estos los compuestos fenólicos más importantes en la inhibición del crecimiento de las plantas?

Fidel René Díaz Serrano*, Luis Felipe Ramírez Santoyo*, Marcos R. Soto Hernández**, Prometeo Sánchez García**, Manuel Sandoval Villa**, Gabriel Alcántar González**, Roberto Quintero Lizaola**

RESUMEN

Se identificaron los principales ácidos fenólicos presentes en paja de trigo por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), coincidiendo en general con los ácidos fenólicos reportados en la literatura científica como los principales compuestos alelopáticos presentes en la paja de trigo. Las concentraciones de estos ácidos fenólicos, cuantificadas en los extractos metanólicos por CLAR, fueron muy bajas (entre 0.17 % y 3.06 %) en relación con la cuantificación de fenólicos solubles totales realizada por colorimetría. Asimismo, los porcentajes de recuperación de los ácidos fenólicos por CLAR, con respecto a las concentraciones de fenólicos solubles totales, determinadas por colorimetría en los extractos metanólicos variaron entre 1.28 % y 15.18 %. Los resultados indican que es posible que los ácidos fenólicos identificados y cuantificados por CLAR en la paja de trigo, pueden no ser los compuestos fenólicos más importantes como agentes alelopáticos en algunos sistemas agrícolas, de acuerdo con las concentraciones cuantificadas.

SUMMARY

They were identified the main phenolic acids in wheat straw by high performance liquid chromatography (HPLC), according with those reported by scientific literature as the main allelopathic compounds from wheat straw. The concentrations of these phenolic acids quantified on methanolic extracts by HPLC were very low (among 0.17 and 3.06 %) in relationship to the concentration of total soluble phenolics quantified by colorimetry. In the same way, the recuperation percentages of phenolic acids by HPLC in relationship to the total concentration of soluble phenolics quantified by colorimetry in the methanolic extracts varied among 1.28 and 15.18 %. The results shown that it is possible that the identified and quantified phenolic acids by HPLC on wheat straw, could not be the most important phenolic compounds that act as allelopathic agents in some agricultural systems according to their concentrations.

Recibido: 20 de junio de 2010
Aceptado: 13 de diciembre de 2010

INTRODUCCIÓN

Existen claras evidencias del efecto negativo sobre el crecimiento y rendimiento del próximo cultivo (alelopatía) cuando la paja de trigo se incorpora o se deja sobre la superficie del suelo agrícola (Elliot *et al.*, 1978; Lodhi *et al.*, 1987; Narwal *et al.*, 1997; Opoku *et al.*, 1997). Se ha señalado que los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico y vainílico presentes en la paja de trigo son los probables causantes de la inhibición del crecimiento de la raíz y el tallo de plantas de la misma especie o de otras especies (Guenzi y McCalla, 1966; Lodhi *et al.*, 1987; Vaughan y Ord, 1990; Levi-Minzi *et al.*, 1994).

Palabras clave:
paja de trigo; alelopatía; ácidos fenólicos.

Keywords:
wheat straw, allelopathy, phenolic acids.

En la gran mayoría de los trabajos de investigación reportados, en donde se trata de demostrar el efecto de inhibición de algunos compuestos fenólicos solubles de la paja de trigo, no se han cuantificado sus concentraciones y no se ha establecido una relación entre éstas y las respuestas de las plantas a éste efecto de inhibición. Se indica que los extractos fríos o calientes de paja de trigo inhiben el crecimiento de algunas especies (Lodhi *et al.*, 1987;

* División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca. Universidad de Guanajuato. Ex-Hacienda. El Copal. C.P. 36,500, Irapuato, Gto., México. Correo electrónico: diazfi@correo.ugto.mx
** Colegio de Postgraduados. C. P. 56230. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

Narwal *et al.*, 1997; Rambakudzibga, 1991; Opoku *et al.*, 1997), o bien se evalúa la fitotoxicidad de los extractos acuosos de la paja de trigo en diferentes diluciones (Al Hamdi *et al.*, 2001) en condiciones de laboratorio, sin embargo no se identifican los compuestos alelopáticos.

Por otro lado, los compuestos fenólicos identificados en la paja de trigo han sido el resultado de la extracción con algún extractante diferente al agua (Waterman y Mole, 1994), hidrólisis, separación e identificación por cromatografía en papel y cuantificación aproximada por medio de un densitómetro (Guenzi y McCalla, 1966). Se indica que se pueden hacer extracciones con mezclas de agua con metanol, etanol o acetona y se aconseja que la extracción se haga con 50 % de agua y 50 % de metanol (Waterman y Mole, 1994), aunque generalmente el solvente o vehículo en donde se encuentran los compuestos alelopáticos en condiciones naturales o en sistemas agrícolas es el agua.

Por otro lado existen varios trabajos de investigación relacionados con el efecto de los "ácidos fenólicos" puros, adquiridos de varios laboratorios comerciales, sobre la inhibición de la germinación y el crecimiento de las plantas (Guenzi y McCalla, 1966; Vaughan y Ord, 1990; Levi-Minzi *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 2001;) y con esto se percibe una tendencia en este campo de la investigación a atribuir el efecto inhibitorio a los compuestos denominados específicamente ácidos fenólicos, de los que se conoce que inicialmente se encuentran combinados con un azúcar formando glucósidos y se ubican en las vacuolas de las células (Harborne, 1984).

Los objetivos del presente trabajo fueron: cuantificar las concentraciones de fenólicos solubles totales en paja de trigo en seis extractos e identificar y cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución los ácidos fenólicos más importantes en los extractos de la paja de trigo y determinar con base en concentraciones si los ácidos fenólicos obtenidos de los extractos de paja de trigo posiblemente pueden ser los compuestos fenólicos más importantes como inhibidores del crecimiento de las raíces y la parte aérea de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de extracción y cuantificación de los fenólicos solubles totales, así como el de identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos en la paja de trigo por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se realizó en el Laboratorio de Nutrición Vegetal, Pro-

grama de Edafología, Instituto de Recursos Naturales (IRENAT) del Colegio de Posgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Edo. de México, durante los meses de julio y agosto de 2004.

Extracción de compuestos fenólicos

Los extractantes utilizados fueron: 1) agua común; 2) agua a 60 °C; 3) agua a pH 5.5; 4) NaOH al 0.5 %; 5) KOH al 0.5 % y 6) urea al 0.5 %. Se pesaron 2 g de paja de trigo (\approx 20 mL) con una granulometría de 50 % de partículas entre 2.00 mm y 1.00 mm, el restante 50 % de partículas entre 1.00 mm y 0.5 mm, se colocaron en cada uno de seis vasos de precipitados de 250 mL y se les adicionaron 40 mL de los extractantes (relación 1: 2, paja: extractante v/v), se dejaron reposar por 1 hr, al término de la cual se siguió la metodología señalada por Guenzi y McCalla (1966), con algunas modificaciones que a continuación se detallan.

Los extractos se filtraron con papel y embudos de vidrio; la paja remanente se exprimió sobre el papel filtro y posteriormente se desechó. Los filtrados se recibieron en vasos de precipitados de 250 mL. A los extractos se les adicionaron NaOH 2 N hasta un pH de 12 y se dejaron reposar por 30 minutos, posteriormente se les agregó HCl 2 N hasta un pH de 2.0. Los extractos acidificados se traspasaron a un embudo de separación y se les adicionaron primeramente 20 mL de acetato de etilo, se mezclaron y se dejaron reposar hasta que se observó la separación entre la fase orgánica y la fase acuosa. La fase orgánica (fase superior menos densa) se separó de la acuosa y se recibió en vasos de precipitados de 100 mL.

La fase acuosa se volvió a transferir al embudo de separación y se agregaron adicionalmente 10 mL de acetato de etilo. Los líquidos se mezclaron y se dejaron reposar nuevamente hasta la separación de las fases en el embudo. La fase orgánica (fase superior) se recogió en el mismo vaso de precipitados de 100 mL en el cual se recogió la fase orgánica de la primera separación. A la fase orgánica se le agregó NaHCO₃ al 5 % hasta alcanzar un pH de 8.5 y después se agregó HCl 2 N hasta alcanzar un pH de 2.0.

El contenido del vaso de precipitados se transfirió a un embudo de separación limpio y se agregaron nuevamente 20 mL de acetato de etilo, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta la separación de las mismas. Se rescató la fase orgánica, y la fase acuosa se retornó al embudo de separación y se le agregaron 10 mL de acetato de etilo, dejando reposar hasta la

separación de las fases. Se rescató la fase orgánica en el vaso de precipitados en donde se recibió la fase orgánica anterior.

A la fase orgánica total se le agregó una pizca de $\text{Na}_2(\text{SO}_4)$ anhidro para extraer el agua remanente y tener exclusivamente la fase orgánica. La fase orgánica con acetato de etilo se transfirió a un rotavapor y se evaporó hasta sequedad. Los sólidos remanentes en el matraz bola del rotavapor se disolvieron en 5 mL de metanol y se transfirieron a vasos de precipitados de 5 mL con la ayuda de pipetas Pasteur.

Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos

Los cinco mL de los extractos metanólicos se filtraron en un filtro de nylon de 2 μm , con la ayuda de un porta filtros y jeringa. El filtrado se recibió en un frasco de vidrio de 10 mL con tapa hermética. Para la separación, identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos marca GBC (Australia), constituido por un automuestreador avanzado modelo LC 1 650, un organizador del sistema modelo LC 1 445, un detector uv/visible modelo LC 1 210, un desgasificador modelo ERC-3415, de ERC INC., con una bomba de cuatro fases modelo LC 1 150, conectado a un equipo de cómputo Compaq Deskpro y un monitor V 50 con un programa de cómputo específico denominado Wincrom, versión 2.0.

Para la separación de los ácidos fenólicos se usó una columna Alltech C8 (fase reversa), 5 μm , 250 mm X 4.6 mm, la cual se mantuvo a 40 °C mediante el horno incluido en el equipo. La fase móvil estuvo constituida por una fase A (ácido acético: acetonitrilo: agua, 5: 30: 65) y una fase B (acetonitrilo: agua, 3: 97) con una velocidad de flujo de 1.5 mL min^{-1} y un programa isocrático de 30 % de A y 70 % de B por un tiempo de corrida de 30 minutos. La detección se hizo a una longitud de onda de 326 nm (uv). El volumen inyectado fue de cinco μL . El acetonitrilo utilizado fue de la marca Burdick and Jackson, No. de catálogo AH015-4 grado HPLC; el agua de la marca Merk (WX 0004-1), también grado HPLC. El ácido acético glacial fue Fermmont CAS-64-19-7.

La identificación de los ácidos fenólicos presentes en los extractos en metanol se hizo por comparación de los tiempos de retención de estos con el de los estándares. Se utilizaron concentraciones de 10 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} , 60 mg L^{-1} , 80 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} y 150 mg L^{-1} de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico (Sigma) y se relacionaron con la altura de los picos en los cromatogramas para establecer las ecuaciones de regresión y con

base en ellas se determinaron las concentraciones de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico en los extractos metanólicos. El volumen de inyección de los estándares también fue de cinco μL .

Cuantificación de fenólicos solubles totales

La extracción de fenólicos solubles totales de la paja de trigo se realizó de acuerdo con lo señalado con anterioridad en el apartado de extracción de compuestos fenólicos.

Las concentraciones de fenólicos solubles totales en los extractos de los seis extractantes se cuantificaron por colorimetría en un espectrofotómetro Espectronic 20+ marca Milton Roy, siguiendo la metodología establecida por Swain y Hillis, 1959.

También se determinaron las concentraciones de fenólicos solubles totales en los extractos metanólicos obtenidos de los extractos iniciales de los diferentes extractantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos por CLAR

En la tabla 1 se presentan los resultados de la cuantificación de los ácidos fenólicos presentes en la paja de trigo variedad Saturno, determinados a partir de los cromatogramas respectivos. Se presenta únicamente el cromatograma obtenido del extracto metanólico y cuyo extractante inicial fue el agua común y corriente como ejemplo (figura 1).

Tabla 1.
Concentraciones de ácidos fenólicos obtenidos de paja de trigo variedad Saturno, cuantificadas por cromatografía líquida de alta resolución.

Extractante	Concentración ácido <i>p</i> -cumárico	Concentración ácido ferúlico	Total ácidos fenólicos	Total ácidos fenólicos
	$\mu\text{g 5 mL}^{-1}$		mg L^{-1}	
Agua común	133.55	89.92	223.47	5.58
Agua 60 °C	109.03	78.13	187.16	4.67
Agua pH 5.5	119.08	84.44	199.52	4.98
NaOH 0.5 %	29.58	16.66	46.24	1.15
KOH 0.5 %	168.15	335.46	503.61	12.59
Urea 0.5 %	120.07	83.15	203.22	5.08

μg = microgramos

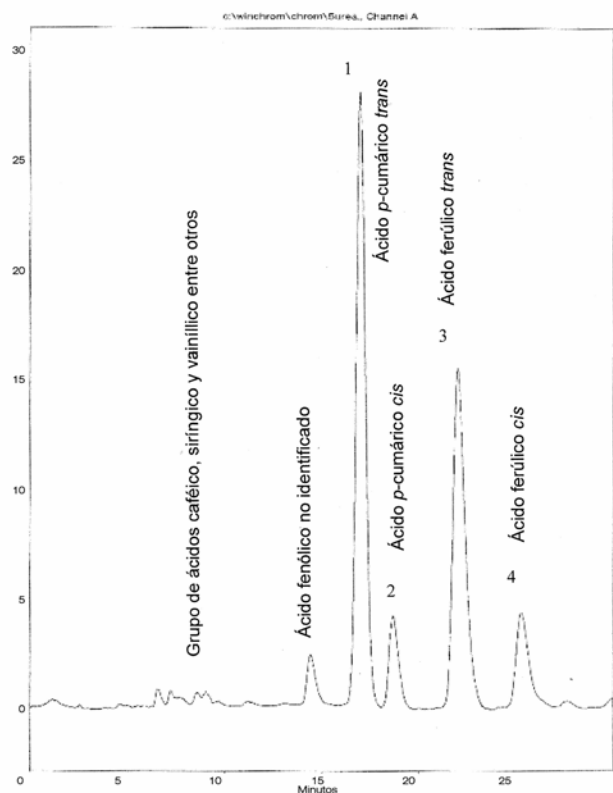


Figura 1. Cromatograma del extracto metanólico del extracto inicial con agua común.

Los principales ácidos fenólicos identificados en todos los extractos metanólicos fueron los mismos: ácido *p*-cumárico *trans*, ácido *p*-cumárico *cis*, ácido ferúlico *trans* y ferúlico *cis*, siendo dominantes las formas *trans*, aunque las concentraciones de ellos en los extractantes fueron ligeramente diferentes. Las concentraciones de las formas *trans* y *cis* de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico se sumaron y sus respectivas concentraciones se presentan en la tabla 1.

En los cromatogramas también se presentaron algunos pequeños picos localizados entre los 5 minutos y 10 minutos de tiempo de retención (figura 1). Estos picos corresponden principalmente a los ácidos caféico, siríngico y vainílico (se corroboraron por pruebas de tiempos de retención por CLAR con los respectivos estándares).

Aunque los ácidos caféico, siríngico y vainílico se detectaron en todos los cromatogramas, las concentraciones encontradas fueron muy bajas en relación con los ácidos fenólicos principales. El primer pico importante en los cromatogramas, no fue posible identificarlo (tiempo de retención aproximado de 14.49 minutos).

La mayor concentración de ácido *p*-cumárico se obtuvo en el extracto con KOH al 0.5 % con 168.15 µg (5 mL), indicando probablemente que el tratamiento con este extractante actuó sobre el ácido *p*-cumárico que forma uniones con los polisacáridos y/o la lignina (Pan *et al.*, 1998; Runcang *et al.*, 1995), haciéndose presentes en el extracto inicial y posteriormente en el extracto metanólico que se inyectó en el aparato de CLAR (tabla 1).

Con excepción del extracto con NaOH al 0.5 %, los restantes extractantes presentaron concentraciones relativamente similares de este ácido.

La concentración de ácido ferúlico también fue mayor en el extracto de KOH al 0.5 %, mientras que las concentraciones de este ácido en los demás extractantes (exceptuando el NaOH 0.5 %) fueron similares entre sí. El extractante con el cual se obtuvieron las mayores concentraciones de estos dos ácidos fenólicos fue el KOH al 0.5 % con 503.61 µg (5 mL), seguido por el agua común. Los demás extractantes (exceptuado nuevamente el NaOH 0.5 %) presentaron concentraciones de los dos ácidos fenólicos muy similares (tabla 1).

Cuantificación de fenólicos solubles totales

Las concentraciones de fenólicos solubles totales (CFST) cuantificadas en los extractos de los seis extractantes se presentan en la tabla 2. Con excepción de la CFST en el extracto de NaOH al 0.5 % todos los demás extractos presentaron aproximadamente las mismas CFST.

Tabla 2.

Concentraciones de fenólicos solubles totales y porcentajes de recuperación de ácidos fenólicos (ácidos *p*-cumárico + ferúlico) cuantificados por CLAR, en relación a la concentración de fenólicos solubles totales cuantificados en los extractos iniciales.

Extractante	CFST ^a 40 mL extracto inicial	Ácidos <i>p</i> -cumárico y ferúlico en 5 mL extracto metanólico	Recuperación de ácidos fenólicos
	-----µg-----		%
Agua común	16 707.00	223.47	1.33
Agua 60 °C	16 872.00	187.16	1.10
Agua pH 5.5	16 806.80	199.52	1.18
NaOH 0.5 %	26 119.60	46.24	0.17
KOH 0.5 %	16 435.00	503.61	3.06
Urea 0.5 %	14 819.20	203.22	1.37

^aCFST = concentración de fenólicos solubles totales determinada por la metodología propuesta por Swain y Hillis (1959).

Los porcentajes de recuperación de los ácidos fenólicos por CLAR en relación con las CFST cuantificadas por colorimetría en los extractos iniciales se muestran en la tabla 3. Los porcentajes de recuperación fueron muy bajos, variando entre 0.17 % en el extracto de NaOH al 0.5 % y 3.06 % en el extracto de KOH al 0.5 %.

Tabla 3.

Concentraciones de fenólicos solubles totales iniciales en seis extractantes, concentraciones de fenólicos solubles totales en los extractos metanólicos y por CLAR y porcentajes de recuperación.

	CFST en 40 mL extracto inicial	CFST extracto metanólico	Recuperación de FST en el extracto metanólico	CAFST en extracto metanólico por CLAR	Recuperación de AFST extracto metanólico por CLAR
	-----µg-----		%	µg	%
Agua común	16,707.00	2,414.80	14.45	223.47	9.25
Agua 60 oC	16,872.00	2,211.28	13.10	187.16	8.46
Agua pH 5.5	16,806.80	1,670.72	9.94	199.52	11.94
NaOH 0.5 %	26,119.60	3,632.90	13.90	46.58	1.28
KOH 0.5 %	16,435.00	3,315.50	20.17	503.61	15.18
Urea 0.5 %	14,819.20	2,088.40	14.09	203.22	9.73

CFST = concentración de fenólicos solubles totales; FST = fenólicos solubles totales; CAFST = concentración de ácidos fenólicos solubles totales; AFST = ácidos fenólicos solubles totales.

Para tratar de dilucidar la gran diferencia en las concentraciones entre los ácidos fenólicos cuantificados por CLAR y las CFST en los extractos iniciales utilizando la metodología propuesta por Swain y Hillis (1959), se cuantificaron por colorimetría las CFST en los extractos metanólicos provenientes de los extractos iniciales (tabla 3).

Los resultados muestran que aunque las CFST determinadas en los extractos metanólicos son mucho mayores que las concentraciones totales de los ácidos fenólicos cuantificados por CLAR, aún así, éstas son bajas en relación con las CFST cuantificadas en los extractos iniciales de paja de trigo.

Los porcentajes de recuperación de fenólicos solubles totales en el extracto metanólico en relación con las CFST de los extractos iniciales variaron entre 9.94 % en el extracto metanólico obtenido del extracto de agua a pH 5.5 % y 20.17 % en el extracto metanólico obtenido del extracto con KOH al 0.5 % (tabla 3).

Los resultados sugieren que si las CFST en los extractos metanólicos son mayores que las CFST cuantificadas por CLAR, un alto porcentaje de los compuestos fenólicos que entran a la columna se quedan adheridos a ella, cuando se utilizan los eluyentes y el programa de elusión señalados.

Lo encontrado en este trabajo coincide con lo indicado por Zahedifar (1996), que señala que la suma de los ácidos fenólicos totales determinados por HPLC fue mucho más baja que los compuestos fenólicos cuantificados por colorimetría. La concentración de fenólicos solubles totales en paja de trigo fue del orden de 23.1 %, mientras que la suma de todos los ácidos fenólicos determinados por CLAR fue de sólo 0.18 %.

Los porcentajes de recuperación de los ácidos fenólicos en este trabajo también coinciden relativamente con lo señalado por Álamo *et al.*, (2001), que mencionan que los porcentajes de recuperación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular (catequina, epicatequina, vainillina, ácidos vainillínico, gálico, caféico, protocatecuico, siríngico, gentísico, sinápico, *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzaldehído, aldehídos protocatecuico y siríngico) por cromatografía líquida de alta resolución son muy bajos en el orden de menos de 5 % y señalan además que éstos resultados se pueden atribuir a la pérdida de parte de los compuestos en las fases de carga y lavado de la muestra.

Los resultados encontrados en éste trabajo sugieren que no todos los compuestos fenólicos cuantificados por colorimetría en los extractos iniciales son "ácidos fenólicos", o mas bien, en los extractos iniciales no solamente hubo glucósidos de los ácidos fenólicos.

Otro aspecto importante es que los extractos metanólicos de los extractos iniciales de paja de trigo, antes y después de pasarse por el filtro de 2 µm mostraron un color amarillo transparente y un olor agradable, propiedades que no se detectaron en ninguno de los ácidos fenólicos que se usaron como estándares y que también se disolvieron en metanol, por lo que se presume que en los extractos metanólicos no solamente hubo ácidos fenólicos iguales a los estándares.

Los bajos porcentajes de recuperación de fenólicos solubles totales en los extractos metanólicos en relación con las CFST de los extractos iniciales se pueden explicar por la pérdida de fenólicos en el proceso de separación y purificación de los fenólicos utilizando únicamente acetato de etilo, solvente orgánico considerado como un solvente útil en la extracción de compuestos con

una moderada polaridad, por lo que es probable que compuestos fenólicos más polares que este solvente se hayan perdido en la fase acuosa.

La recuperación de los ácidos fenólicos cuantificados por CLAR con respecto a las CFST en los extractos metanólicos, exceptuando el de NaOH al 0.5 %, se encontró en el intervalo de 8.46 % en el extracto metanólico del agua a 60 °C y 15.18 % en el extracto metanólico de KOH al 0.5 % (tabla 3).

Los resultados de las concentraciones de ácido ferúlico y *p*-cumárico cuantificadas por CLAR en la mayoría de los extractantes son bajas con respecto a las encontradas por Guenzi y McCalla (1966), quienes reportan que en el extracto de paja de trigo con 80 % de alcohol y posterior hidrólisis con NaOH 2 N, se obtuvieron 238 ppm (mg kg⁻¹) de ácido *p*-cumárico y 18 ppm (mg kg⁻¹) de ácido ferúlico, con un total de 256 ppm (mg kg⁻¹).

Estos mismos autores muestran que otros tratamientos aplicados a la paja de trigo dieron como resultado concentraciones de ácido *p*-cumárico y ferúlico mayores (2,530 ppm de ácido *p*-cumárico y 350 ppm de ácido ferúlico para el tratamiento dado al residuo de la extracción con 80 % de alcohol y en autoclave por 45 minutos; 10 880 ppm de ácido *p*-cumárico y 320 ppm de ácido ferúlico en el tratamiento dado al residuo de la extracción con 80 % de alcohol tratado con NaOH 2 N por cuatro horas).

CONCLUSIONES

Se identificaron a los ácidos *p*-cumárico y ferúlico en sus isómeros *trans* y *cis* por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en los extractos metanólicos provenientes de la extracción inicial con los seis extractantes y se consideran los ácidos fenólicos más importantes presentes en la paja de trigo variedad Saturno.

Las concentraciones de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico cuantificadas por CLAR en todos los extractos metanólicos fueron muy bajas. Los porcentajes de recuperación de éstos fenólicos se presentaron en el intervalo de 0.17 % y 3.06 % con respecto a las concentraciones de fenólicos solubles totales en los extractos iniciales.

Los porcentajes de recuperación de fenólicos solubles totales en los extractos metanólicos, también se consideraron bajos en relación con las concentraciones de fenólicos solubles totales cuantificadas en los seis extractos iniciales. Los porcentajes de recuperación fluctuaron entre 9.94 % en el extracto metanólico del extracto inicial con agua a pH 5.5 y 20.17 % en el extracto metanólico del extracto inicial de KOH al 0.5 %.

El procedimiento para la separación y aislamiento de los compuestos fenólicos de diversa polaridad a partir de los extractos acuosos no es el más adecuado para conservar los fenólicos en el extracto orgánico en los embudos de separación.

Los ácidos fenólicos identificados y cuantificados por CLAR no son los fenólicos solubles más importantes en concentración entre los compuestos fenólicos presentes en la paja de trigo, y por lo tanto, es posible que no representen los compuestos fenólicos más importantes en la inhibición del crecimiento de las raíces y de la parte aérea de las plantas como comúnmente se ha reportado.

Los fenólicos solubles totales en los extractos metanólicos contienen fenólicos de naturaleza química relativamente distinta a la de los ácidos fenólicos con estructura del ácido benzoico o del ácido cinámico. Una alta proporción de fenólicos que ingresan a la columna de separación se quedan adheridos a la fase estacionaria de la columna con los eluyentes y condiciones de elusión específica para los ácidos fenólicos identificados y cuantificados.

Los porcentajes de fenólicos cuantificados por CLAR representan entre el 1.28 % y el 15.18 % de las concentraciones de fenólicos solubles totales cuantificadas en los extractos metanólicos.

REFERENCIAS

- Alamo M, Del., L. Casado., V. Hernández., y C. Gómez-Cordovés. (2001). Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC con extracción en fase sólida. *Jornadas Científicas '01 de Grupos de Investigación Enológica*. Libro de Actas C1. Valencia, España.
- Al-Hamdi, B., Inderjit, M. Olofsdotter., and J. C. Streibig. (2001). Laboratory bioassay for phytotoxicity. An example from wheat straw. *Agronomy Journal*. 93: 43-48.
- Elliot, L. F., T. M. McCalla., and A. Waiss. (1978). Phytotoxicity associated with residue management. pp. 131-146. In: *Crop Residue Management Systems*. American Society of Agronomy. *Special publication* No. 31. Madison, WI. USA.
- Guenzi, W. D., and T. M. McCalla. (1966). Phenolic acids in oats, wheat, sorghum, and corn residues and their phytotoxicity. *Agronomy Journal*. 58: 303-304.
- Harborne, J. B. (1984). Phenolic compounds. pp. 37-99. In: *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques in plant analysis*. 2nd. Ed. Chapman & Hall. London. UK.
- Jung, V., A. Waechter., and P. Jensen. (2001). Effects of some plant and microbial metabolites on germination and emergence of tomato seedlings. *Acta Hort*. 548: 603-609.
- Levi-Minzi R., A. Saviozzi., and R. Riffaldi. (1994). Organic acids as seed germination inhibitors. *J. Environ. Sci. Health*. A29 10: 2203-2217.

- Lodhi, M. A. K., R. Bilal., and K. A. Malik. (1987). Allelopathy in agroecosystems: wheat phytotoxicity and its possible roles in crop rotation. *Journal of Chemical Ecology*. 13: 1881-1891.
- Narwal, S. S., M. K. Sarmah., and D. P. S. Nandal. (1997). Allelopathic effects of wheat residues on growth and yield of fodder crops. *Allelopathy Journal*. 4: 111-120.
- Opoku, G., T. J. Vyn., and R. P. Voroney. (1997). Wheat straw placement effects on total phenolic compounds in soil and corn seedling growth. *Canadian Journal of Plant Science*. 77: 301-305.
- Pan G. X., J. L. Bolton., and G. J. Leary. (1998). Determination of ferulic and p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. *J. Agri. Food Chem*. 46: 5283-5288.
- Rambakudzibga, A. M. (1991). Allelopathic effects of aqueous wheat (*Triticum aestivum* L.) straw extracts on the germination of eight arable weeds commonly found in Zimbabwe. *Zimbabwe Journal of Agricultural Research*. 29: 77-79.
- Runcang, S., J. M. Lawther., and W. B. Banks. (1995). Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Industrial crops and products*. 4: 127-145.
- Swain, T., and W. E. Hillis. (1959). Phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem*. 10: 63-68.
- Vaughan, D., and B. Ord. (1990). Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. *J. Sci. Food Agric*. 52: 289-299.
- Waterman, P. G., and S. Mole. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Methods in ecology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Zahedifar, M. (1996). Novel uses of lignin and hemicellulosic sugars from acid-hydrolyzed lignocellulosic materials. Ph. D. Thesis. University of Aberdeen. Scotland, U. K. Disponible en línea. http://www.macaulay.ac.uk/IFRU/thesis/phd_zahedifar.pdf. (Revisado 7 de septiembre de 2004).