



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS
CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA
EN EL TRÓPICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS

**COMPOSICIÓN PROTEICA, MINERAL Y EN METABOLITOS
SECUNDARIOS DURANTE EL DESARROLLO FENOLÓGICO DE CHIPILÍN
(*Crotalaria longirostrata*) Y SU EFECTO ANTIFÚNGICO**

ANA YELI MENDEZ LOPEZ

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO
2022

La presente tesis, titulada “**COMPOSICIÓN PROTEICA, MINERAL Y EN METABOLITOS SECUNDARIOS DURANTE EL DESARROLLO FENOLÓGICO DE CHIPILÍN (*Crotalaria longirostrata*) Y SU EFECTO ANTIFÚNGICO**”, realizado por la alumna **ANA YELI MENDEZ LOPEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS CIENCIAS
EN
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: _____


DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA

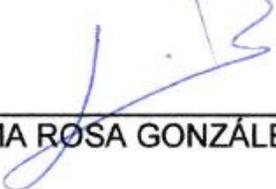
ASESORA: _____


DRA. EDITH HERNÁNDEZ NATAREN.

ASESOR: _____


DR. CARLOS FREDY ORTIZ GARCÍA

ASESORA: _____


DRA. ALMA ROSA GONZÁLEZ ESQUINCA

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO, MAYO DEL 2022

COMPOSICIÓN PROTEICA, MINERAL Y EN METABOLITOS SECUNDARIOS
DURANTE EL DESARROLLO FENOLÓGICO DE CHIPILÍN (*Crotalaria longirostrata*) Y
SU EFECTO ANTIFÚNGICO
Ana Yeli Méndez López, MC.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

El Chipilín (*Crotalaria longirostrata*), consumido como verdura agregado a diversos platillos y guisos tradicionales en Tabasco, carece de información sobre su calidad nutricional durante su desarrollo fenológico. Información esencial, porque además algunas especies de este género, contienen alcaloides pirrolizidínicos los cuales son tóxicos para el consumo humano y animal. Los objetivos de esta investigación fueron evaluar la importancia del desarrollo fenológico del Chipilín sobre el contenido de proteína, minerales y metabolitos secundarios, y la actividad *in vitro* de estos últimos sobre *Moniliophthora roreri*. Los resultados mostraron que el Chipilín presenta un ciclo fenológico largo (ocho meses para primera floración), que requiere de la elongación y engrosamiento del tallo principal para iniciar ramificaciones secundarias y floración. Del número de ramificaciones depende la fructificación y producción de semillas, ya que produce inflorescencias terminales. Durante todo el ciclo fenológico, el tallo presenta la mayor acumulación de biomasa, seguido de las hojas y raíces. Los estados de desarrollo fenológico del 1 al 4 son los que presentan mayor contenido proteico. Los compuestos fenólicos totales y flavonoides no presentan variación en los estados fenológicos del 1 al 8. El estado fenológico principal 0 germinación en los estados fenológicos 09 formación de hojas cotiledonares presentó elevados contenidos de proteína, P, y particularmente de Fe, Mn, Zn y Cu. El análisis GC-MS mostró la ausencia de monocrotalina en hojas y semillas de Chipilín. Sin embargo, en semillas y en el estado 0 germinación se detectó la presencia de otros alcaloides pirrolizidínicos que implican toxicidad como la heliotridina y la senecifilina. En hojas solo se hallaron ácidos fenólicos y alcaloides indolizidínicos como la aspidoalbina y obscurinervidina 6,7-dihidro. Los extractos foliares de Chipilín mostraron variación en su efectividad contra el crecimiento micelial y esporulación de *M. roreri*, dependiendo del estado fenológico de la planta. El extracto que presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (30.28 %) de este hongo fue obtenido de muestras foliares colectadas durante la floración de la planta. En cuanto a la esporulación, se alcanzó un porcentaje de reducción de la producción de esporas de 65 % con el tratamiento correspondiente al estado fenológico 3 (elongación de la planta). Estos resultados constituyen una valiosa aportación en cuanto a la relación contenido nutrimental y estado fenológico de la planta, así como para continuar los estudios en esta especie sobre el potencial de los metabolitos secundarios presentes y sus efectos contra hongos fitopatógenos que atacan al cultivo del cacao y otros cultivos establecidos en el trópico húmedo mexicano.

PROTEIN, MINERAL AND SECONDARY METABOLITE COMPOSITION DURING THE
PHENOLOGICAL DEVELOPMENT OF CHIPILÍN (*Crotalaria longirostrata*) AND ITS
ANTIFUNGAL EFFECT

Ana Yeli Méndez López, MC.
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Chipilín (*Crotalaria longirostrata*), consumed as a vegetable added to various traditional dishes and stews in Tabasco, lacks information on its nutritional quality during its phenological development. Essential information, because some species of this genus also contain pyrrolizidine alkaloids which are toxic for human and animal consumption. The objectives of this research were to evaluate the importance of the phenological development of Chipilín on the content of protein, minerals and secondary metabolites, and the *in vitro* activity of the latter on *Moniliophthora roreri*. The results showed that the Chipilín has a long phenological cycle (eight months for the first flowering), which requires the elongation and thickening of the main stem to initiate secondary branches and flowering. Fruiting and seed production depend on the number of branches, since it produces terminal inflorescences. Throughout the phenological cycle, the stem presents the highest accumulation of biomass, followed by the leaves and roots. The stages of phenological development from 1 to 4 are those with the highest protein content. Total phenolic compounds and flavonoids do not show variation from phenological stage 1 to 8. The main phenological stage 0 germination in stage 09 formation of cotyledonary leaves presented high contents of protein, P, and particularly of Fe, Mn, Zn and Cu. GC-MS analysis showed the absence of monocrotaline in Chipilín leaves and seeds. However, in seeds and in stage 0 germination the presence of other pyrrolizidine alkaloids that imply toxicity such as heliotridine and senecifiline was detected. In leaves, only phenolic acids and indolizilidin alkaloids such as aspidoalbine and obscurinervidine 6,7-dihydro were detected. Leaf extracts of Chipilín showed variation in their effectiveness against mycelial growth and sporulation of *M. roreri*, depending on the phenological stage of the plant. The extract that presented the highest percentage of mycelial growth inhibition (30.28 %) of this fungus was using foliar samples collected during plant flowering. Regarding sporulation, a reduction percentage of spore production of 65% was reached with the treatment corresponding to phenological stage 3: elongation of the plant. These results constitute a valuable contribution on the relationship between nutritional content and phenological state of the plant, as well as to continue studies in this species on the potential of the secondary metabolites present and their effects against phytopathogenic fungi that attack cocoa and other crops established in the Mexican humid tropics.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y las fuerzas para permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, porque con él todo es posible.

A mis padres Andres y Elsi por ser siempre mi apoyo incondicional y estar siempre a mi lado en cada uno de mis proyectos.

A mi hijo Jonathan por estar ahí siempre para mi y aun a su corta edad comprender en los días que no podía estar del todo contigo, Te amo por siempre mi corazón chiquito.

A mi esposo, por estar siempre apoyándome y motivándome para seguir adelante.

A mis hermanos Ivan, Yaneth y Andrea por su apoyo constante.

Con todo el cariño del mundo, dedicado a mis abuelos Lenin y Candelaria, quienes partieron de este mundo durante épocas difíciles para todos, besos hasta el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (**CONACYT**) por la beca otorgada para poder realizar este postgrado.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por aceptarme en el programa de maestría en ciencias.

A la doctora **Luz del Carmen Lagunes Espinoza** por su importante labor en la dirección de este trabajo de investigación, por recibirme y brindarme su apoyo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, agradezco su comprensión y todos los consejos brindados durante esta etapa, infinitamente ¡Gracias!

A la doctora **Edith Hernández Nataren** por su valiosa colaboración durante los análisis en GC-MS y para la identificación de los alcaloides.

Al doctor **Carlos Fredy Ortíz García** por la aportación de la cepa de *M. roreri* y sus aportaciones durante la evaluación de la actividad antifúngica.

A la doctora **Alma Rosa González Esquinca** por sus aportaciones durante la evaluación del desarrollo fenológico de Chipilín y por apoyarme durante el trabajo de TLC realizado durante la estancia en el laboratorio de Fisiología y Química vegetal de la UNICAH, Chiapas.

Agradezco a la QFB. Ricarda Ventura Valenzuela por su apoyo para mostrarme el correcto manejo de los equipos espectrofotómetro de Absorción Atómica, espectrómetro FOSS NIRSystems, cromatógrafo de GC-MS.

A mi compañero Dario, por ilustrarme con sus experiencias y ayudándome a resolver mis dudas cada vez que lo necesité.

CONTENIDO

CONTENIDO	vii
Índice de cuadros	x
Índice de figuras.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
General.....	3
Particulares.....	3
CAPÍTULO I. DESARROLLO FENOLÓGICO Y CALIDAD NUTRITIVA DE CHIPILÍN (<i>C. longirostrata</i>)	4
1.1 Resumen.....	4
1.2 Abstract.....	5
1.3 Introducción	5
1.4 Materiales y métodos	8
1.4.1 Establecimiento de experimento	8
1.4.2 Caracterización del desarrollo fenológico	8
1.4.3 Composición mineral y proteica de biomasa foliar.....	10
1.4.4 Polifenoles y flavonoides	11
1.5 Resultados	13
1.5.1 Etapas fenológicas	13
1.5.2 Acumulación y distribución de biomasa por estado fenológico	19
1.5.3 Proteína y minerales en hojas y semilla	20
1.5.4 Contenido de polifenoles y flavonoides totales.....	23
1.6 Discusión.....	24
Proteína y minerales	26
Polifenoles y flavonoides	27
1.7 Conclusión	28
CAPÍTULO II. VARIACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS DURANTE EL DESARROLLO FENOLÓGICO DE CHIPILÍN (<i>Crotalaria longirostrata</i>).....	29
2.1 Resumen.....	29
2.2 Abstract.....	30
2.3 Introducción	30
2.4 Materiales y métodos	33
2.4.1 Establecimiento de experimento	33

2.4.2	<i>Caracterización del desarrollo fenológico</i>	33
2.4.3	<i>Extracción de compuestos fenólicos</i>	34
2.4.4	<i>Identificación de compuestos fenólicos por cromatografía de capa fina</i>	34
2.4.5	<i>Identificación de presencia de alcaloides en extractos con el reactivo de Dragendorff</i>	35
2.4.6	<i>Extracción de alcaloides pirrolizidínicos</i>	35
2.4.7	<i>Identificación de alcaloides en GC-MS</i>	36
2.5	Resultados	37
2.5.1	<i>Identificación de compuestos fenólicos por cromatografía de capa fina (TLC)</i>	37
2.5.2	<i>Identificación de presencia de alcaloides en extractos con el reactivo de Dragendorff</i>	39
2.5.3	<i>Identificación de alcaloides en GC-MS</i>	40
2.6	Discusión	43
2.7	Conclusión	46
CAPITULO III. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS FOLIARES DE <i>Crotalaria longirostrata</i>		47
3.1	Resumen	47
3.2	Abstract	47
3.3	Introducción	48
3.4	Materiales y Métodos	49
3.4.1	<i>Obtención de la cepa Moniliophthora roreri</i>	49
3.4.2	<i>Obtención de extractos de compuestos fenólicos</i>	50
3.4.3	<i>Preparación del medio V8</i>	50
3.4.4	<i>Efectividad de los extractos sobre el hongo Moniliophthora roreri</i>	50
3.4.5	<i>Efectividad sobre la esporulación</i>	52
3.4.6	<i>Diseño experimental y análisis de los datos</i>	52
3.5	Resultados	53
3.5.1	<i>Efectividad de los extractos sobre el crecimiento micelial de Moniliophthora roreri</i>	53
3.5.2	<i>Efectividad sobre la esporulación</i>	55
3.6	Discusión	56
3.7	Conclusión	58
DISCUSIÓN GENERAL		59
CONCLUSIONES GENERALES		62
LITERATURA CITADA		63
ANEXOS		71
Anexo 1. Cromatogramas de Ácido ftálico di(octyl ester) en estados fenológicos principales 0 al 8 obtenidos por GC-MS en muestra de hojas de <i>C. longirostrata</i>		71

Anexo 2. Cromatograma de Ftalato de metilo-2-hetilhexilo presente en estados fenológicos 4, 5 y 8.....	71
Anexo 3. Cromatograma de Ácido heptadecanoico-16-metil ester presente en estados fenológicos del 0 al 8.	72
Anexo 4. Cromatograma de Metilfluroglucinol presente en semillas.	72
Anexo 5. Cromatograma de 193e-5-8-indolizina presente en semillas	73
Anexo 6. Concentración de proteína durante el desarrollo fenológico de Chipilín.....	73

Índice de cuadros

Cuadro 1. Estados de crecimiento principales (un dígito) para describir el desarrollo fenológico de Chipilín de acuerdo a la escala BBCH.	9
Cuadro 2. Estados de crecimiento principales (un dígito) y secundarios (dos dígitos para describir los estados de 0 germinación, 1 desarrollo de hojas y 2 formación de brotes secundarios de Chipilín, de acuerdo a la escala BBCH.	9
Cuadro 3. Estados de crecimiento principales (un dígito) y secundarios (dos dígitos para describir los estados 3, 4 y 5, de acuerdo a la escala BBCH.	11
Cuadro 4. Estados de crecimiento principales (un dígito) y secundarios (dos dígitos para describir los estados 6, 7 y 8, de acuerdo a la escala BBCH.	12
Cuadro 5. Características del tallo principal de Chipilín, y de ramificaciones secundarias durante el segundo ciclo de floración.	16
Cuadro 6. Duración de cada estado fenológico principal de Chipilín, clasificados de acuerdo a la escala BBCH.	17
Cuadro 7. Concentración de proteína en semillas y hojas durante el desarrollo fenológico de Chipilín.	21
Cuadro 8. Concentración de minerales en semilla y hojas durante el desarrollo fenológico de Chipilín.	21
Cuadro 9. Concentración de polifenoles y flavonoides en hojas durante el desarrollo fenológico de Chipilín.	23
Cuadro 10. Valores de R _f de cada compuesto encontrado por TLC en muestras de hojas y semillas de Chipilín (<i>Crotalaria longirostrata</i>).....	38
Cuadro 11. Índices de retención (R _f) de compuestos identificados por TLC de extractos de compuestos fenólicos de hojas y semillas de Chipilín (<i>Crotalaria longirostrata</i>).	38
Cuadro 12. Alcaloides pirrolizidínicos identificados por GC-MS en hojas durante el desarrollo fenológico de <i>C. longirostrata</i>	40
Cuadro 13. Alcaloides tipo indol detectados por GC-MS en hojas durante el desarrollo fenológico de <i>C. longirostrata</i>	41
Cuadro 14. Compuestos no pirrolizidínicos encontrados en extractos de hojas <i>Crotalaria longirostrata</i> , durante el desarrollo fenológico.....	42
Cuadro 15. Contenido de polifenoles totales en hojas y semillas de <i>C. longirostrata</i> y volumen de extracto utilizado para una concentración de 4000 mg L ⁻¹	51
Cuadro 16. Eficiencia de inhibición (%) sobre el crecimiento micelial y esporulación de <i>M. royeri</i>	54

Índice de figuras

Figura 1. Estado fenológico 0 germinación y sus estados secundarios en Chipilín de acuerdo con la escala BBCH.	13
Figura 2. Estados fenológicos principales de Chipilín de acuerdo a la escala BBCH. 0 germinación, 00 semilla seca, 07 emergencia del hipocotilo con cotiledones, 01 desarrollo de hojas, 19 nueve o más hojas trifolioladas abiertas, 02 desarrollo de brotes secundarios, 29 nueve o más brotes secundarios visibles, 03 elongación del tallo, 39 nueve o más nudos visibles, 04 desarrollo de partes vegetativas cosechables, 43 30 % de acumulación de biomasa, 45 50 % de acumulación de biomasa, 46 90 % de acumulación de biomasa, 05 emergencia de inflorescencias, 59 inflorescencia con pétalos visibles pero aún cerrados, 06 floración, 65 floración total, 07 desarrollo de vainas, 79 casi todas la vainas alcanzan su tamaño final, 08 maduración de vainas, 89 casi todas las vainas están maduras, semillas con su color final, secas y duras.	14
Figura 3. Cronología de estados fenológicos secundarios (dos dígitos) finales de cada estado fenológico principal de Chipilín de acuerdo a la escala BBCH.	17
Figura 4. Evolución de ciclos fenológicos de Chipilín, mostrando el primer y segundo ciclo de floración.	18
Figura 5. Acumulación total de biomasa (a), desarrollo del área foliar (b) y relación hoja-tallo (c) de estados fenológicos principales de Chipilín.	20
Figura 6. Representación gráfica del contenido de minerales en semilla y en hojas de Chipilín en los estados fenológicos principales del 0 al 8. E=estado fenológico principal.	22
Figura 7. <i>Crotalaria longirostrata</i> , en la fase móvil cloroformo/metanol en relación 7:3, en donde se pueden observar 6 compuestos diferentes C1, C2, C3, C4, C5, y C6. Estados fenológicos (e0: germinación, E1: desarrollo de hojas, E2: desarrollo del tallo, E3: elongación, E4: 10% acumulación de biomasa, E4: 30% de acumulación de biomasa, E4: 50% de acumulación de biomasa, E4 90% de acumulación de biomasa).	37
Figura 8. Revelado de extractos de compuestos fenólicos, en cámara ultravioleta visible a 365 nm, obtenidos a partir de hojas de diferentes estados fenológicos de Chipilín.	39
Figura 9. Presencia del alcaloide monocrotalina, revelado con reactivo de dragendorff sin aplicar calor (a), y formación de precipitado naranja con turbiedad indicando la presencia de alcaloides en los extractos de compuestos fenólicos obtenidos de semilla durante el desarrollo fenológico de Chipilín (b).	40
Figura 10. Cromatogramas correspondientes al estado 0: germinación, mostrando la presencia de senecifilina (1a) y de heliotridina (2b) en muestras de Chipilín.	41
Figura 11. Cromatograma correspondiente al estado 5: emergencia de inflorescencia, con presencia de alcaloides indolizidínicos obscurinervidina 6,7-dihidro (1) y aspidoalbina (2).	42
Figura 12. Crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> sobre el extracto de <i>C. longirostrata</i> en concentración de 4000 mg L ⁻¹ de nueve estados fenológicos evaluados.	54
Figura 13. Efectividad in vitro de los extractos obtenidos de los nueve estados fenológicos evaluados de <i>Crotalaria longirostrata</i> sobre <i>M. roreri</i> . Barras con letra diferente son significativamente diferentes (Duncan p ≤ 0.05).....	55

Figura 14. Efectividad en la producción de esporas de *M. roreri* con la concentración de 4000 mg L⁻¹ del extracto de *C. longirostrata*. Medias con letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$)..... 56

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Crotalaria* pertenece a la familia Fabaceae (antes Leguminosae), tribu Crotalarieae, distribuida en unas 300 especies alrededor del mundo. Dentro de este género se encuentra la especie *C. longirostrata* Hook. & Arn., conocida en Tabasco, México como Chipilín, considerado un quelite (Castro-Lara *et al.*, 2011). En México, los quelites se han definido como plantas que crecen de manera silvestre, de las cuales se consumen las hojas, tallos y flores; el nombre de quelite se deriva del término náhuatl *quilitl*, interpretado como hierba comestible. Los quelites son importantes en la seguridad alimentaria al complementar las necesidades básicas de proteína, macronutrientes y microelementos de la población mexicana ya que contienen proteínas, aminoácidos, minerales (Ca, Mg, Zn), vitaminas (E, C) y fibra (Santiago-Saenz *et al.*, 2019).

El Chipilín es apreciado por sus hojas y brotes, cocidos y consumidos como verduras o mezclados con frijoles, carne molida o huevos revueltos, además de ser el ingrediente principal en diversos platillos como tamales, sopas, guisos y tortillas (Morton, 1994); recientemente las hojas de chipilín han sido usadas para elaboración de harinas para pan vegano (Ek-Chulin *et al.*, 2018); así mismo, es empleado como pienso proteico para la alimentación de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (Guerra-Centeno *et al.*, 2016). En la literatura existen reportes para este quelite que indican la presencia de alcaloides pirrolizidinicos tanto en semillas como en las raíces de la planta, mismos que pueden resultar tóxicos (Williams y Molineux, 1987; Morton, 1994). Por otra parte, las hojas son ricas en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina, y ácido ascórbico (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015) y no se han encontrado reportes sobre la presencia de alcaloides en estas. Es importante destacar que los datos de calidad nutricional del follaje mostrados en la literatura no indican el estado fenológico de la planta de Chipilín en el momento de su corte o cosecha.

En Tabasco, aunque el Chipilín se encuentra en todo el estado, su abundancia es mayor en el municipio de Jalapa, en Aquiles Serdán 4ª sección, en Progreso y en el Chipilinar 2ª sección; y en el municipio de Tacotalpa en comunidades como Buenos Aires, La Cuesta, y Cerro Blanco 5ª sección (Centurión *et al.*, 2000). El Chipilín no es considerada una especie de importancia económica y su aprovechamiento es doméstico,

por lo que es establecida en los huertos familiares sin programas de manejo concretos (Ponce-Díaz y Zuart-Macías, 2013).

La fitoquímica del género *Crotalaria* ha permitido identificar un buen número de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran varios tipos de alcaloides, aminas, flavonoides, coumarinas, lectinas, entre otros (Peñaloza y Peláez, 2008). Las especies de *Crotalaria* son consideradas la principal fuente de alcaloides pirrolizidínicos hepatóxicos, cardiotoxicos y genotóxicos para mamíferos (Peñaloza y Peláez, 2008; Fletcher *et al.*, 2009), lo que no ha limitado su uso en medicina popular (Peñaloza y Peláez, 2008). Presenta propiedades somníferas, ya que cuando se consume en cantidades apreciables induce el sueño profundo y relajante (Morton, 1994). El Chipilín también presenta una alta actividad antioxidante (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015). Esta presencia de metabolitos secundarios en el género *Crotalaria*, podría ser una alternativa natural importante para ampliar su uso en el control de hongos y otros tipos de patógenos. A este respecto, los extractos de Chipilín han mostrado actividad antimicrobiana contra las bacterias *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus epidermidis*, y los hongos *Fusarium oxysporum f. e. Agave comiteca*, *Fusarium oxysporum f. e. A. tequilana*, y *Fusarium solani f. e. A. comiteca* (Miranda-Granados *et al.*, 2018). También contra *Fusarium sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus*, hongos fitopatógenos del maíz (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017).

Aun cuando el Chipilín es una planta muy consumida en los hogares del estado de Tabasco y en el sureste del país, además de ser utilizada por sus propiedades medicinales, no se encuentra información registrada de estudios realizados sobre los compuestos químicos presentes en los diferentes estados de desarrollo de la planta o condiciones de manejo. Los estudios realizados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del COLPOS-Campus Tabasco en la línea de investigación sobre fisiología y bioquímica de especies nativas, han mostrado que durante el crecimiento vegetativo del Chipilín en condiciones de invernadero, la mayor concentración proteica se observa entre 90-120 días después de siembra (Cornelio, 2016), y que con cortes sucesivos aplicados al follaje se incrementa la producción de biomasa, sin efecto en el contenido de proteína ni en polifenoles totales (Pardo, 2019). Sin embargo, se desconoce si existe variación en la calidad nutricional del follaje, incluyedo la presencia de alcaloides pirrolizidínicos durante

el desarrollo fenológico de Chipilín. Por otra parte, no se ha probado el efecto antifúngico de extractos obtenidos de esta planta contra distintos patógenos de enfermedades que afectan a las plantaciones de cacao como *Moniliophthora roreri*, considerando los reportes que mencionan que el Chipilín posee características de inhibición para ciertos hongos patógenos (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017; Miranda-Granados *et al.*, 2018).

La hipótesis planteada en esta investigación fue que el contenido proteico, en minerales y metabolitos secundarios varía con el desarrollo fenológico del Chipilín, que la mayor concentración de proteína se detecta en hojas, las que no presentan presencia de alcaloides pirrolizidínicos. Asimismo, el extracto de polifenoles totales a partir de hojas de Chipilín presenta actividad biológica ante *M. roreri*.

Por lo anterior se planteó el presente trabajo con los objetivos siguientes:

General

Determinar la importancia del desarrollo fenológico de Chipilín (*Crotalaria longirostrata*) sobre el contenido de proteína, minerales y metabolitos secundarios; y la actividad *in vitro* de los últimos sobre *Moniliophthora roreri*.

Particulares

- a) Clasificar las etapas fenológicas del Chipilín.
- b) Evaluar el rendimiento foliar en cada etapa fenológica.
- c) Describir los cambios en el contenido de proteína, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, compuestos fenólicos y flavonoides totales en hojas a diferentes etapas fenológicas.
- d) Caracterizar la variación órgano-específica de los alcaloides pirrolizidínicos.
- e) Evaluar la actividad de compuestos fenólicos totales de Chipilín sobre *Moniliophthora roreri in vitro*.

CAPÍTULO I. DESARROLLO FENOLÓGICO Y CALIDAD NUTRITIVA DE CHIPILÍN (*C. longirostrata*)

1.1 Resumen

El Chipilín (*C. longirostrata*), quelite tradicional de México, aún cuando es consumido como verdura agregado a diversos platillos y guisos tradicionales, carece de información sobre su calidad nutricional durante su desarrollo fenológico, incluyendo la variación en metabolitos secundarios. Dicha información es esencial para decidir el momento apropiado de cosecha de la biomasa foliar. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la fenología del Chipilín usando la escala BBCH, y evaluar el contenido de proteína, minerales, polifenoles y flavonoides totales en la biomasa foliar durante el desarrollo fenológico. Los resultados permitieron identificar 9 estados fenológicos principales en Chipilín, desde germinación hasta maduración de vainas usando la escala BBCH. El ciclo fenológico es largo (ocho meses para primera floración), y requiere de la elongación y engrosamiento del tallo principal para iniciar ramificaciones secundarias y floración. Una vez que el tallo principal ha engrosado, se rompe la dominancia del meristemo apical del tallo principal e inicia la ramificación, donde se desarrollan al mismo tiempo partes vegetativas, flores y frutos. Del número de ramificaciones depende la fructificación y producción de semillas, ya que produce inflorescencias terminales. Posteriormente se suceden ciclos sucesivos de floración y fructificación. Durante todo el ciclo fenológico, el tallo presentó la mayor acumulación de biomasa, seguido de las hojas y raíces. El incremento en área foliar se observó desde el estado principal 3 hasta el 6 (inicio de floración). A partir del estado principal 6 también disminuyó la biomasa foliar. Los estados principales del 1 al 4 son los que presentaron mayor contenido proteico en hojas (27.0 – 28.8%). En el estado principal 0 y en semillas el contenido de proteína fue alto (40.7% y 43.9%, respectivamente). Los compuestos fenólicos totales y flavonoides totales no presentaron variación significativa entre los estados fenológicos del 1 al 8 (27.5-41.8 mg g⁻¹ MS y 20.8-35.3 mg g⁻¹ MS, respectivamente). El estado fenológico principal 0 germinación en el estado secundario 09 formación de hojas cotiledonares presentó elevados contenidos de P, y particularmente de Fe, Mn, Zn y Cu

Palabras clave: *Crotalaria*, estado fenológico, proteína, polifenoles, composición mineral

1.2 Abstract

Chipilín (*Crotalaria longirostrata*) is a traditional quelite from Mexico that is consumed in various dishes and traditional stews; however, information on the nutritional quality of this plant during its phenological development, including variation in secondary metabolites, is lacking. This information is essential to determine the appropriate time for harvesting the foliar biomass of this plant. The objectives of this research were to characterize the phenology of Chipilín using the BBCH scale and to evaluate the contents of proteins, minerals, polyphenols and total flavonoids in the foliar biomass of this plant during phenological development. The results allowed the identification of 9 primary phenological stages of Chipilín, from germination to pod maturation, using the BBCH scale. The phenological cycle is long (eight months to first flowering) and requires elongation and thickening of the main stem to initiate secondary branching and flowering. Once the main stem has thickened, the dominance of the apical meristem of the main stem is broken, and branching begins, with vegetative parts, flowers and fruits developing at the same time. The number of branches depends on fruiting and seed production since terminal inflorescences are produced. Subsequently, there are successive cycles of flowering and fruiting. Throughout the phenological cycle, the stem presented the highest accumulation of biomass, followed by the leaves and roots. An increase in leaf area was observed from primary stage 3 to primary stage 6 (the beginning of flowering). Beginning in primary stage 6, leaf biomass also decreased. Primary stages 1 to 4 had the highest contents of leaf proteins (27.0-28.8%). The protein content was high during primary stage 0 and in seeds (40.7% and 43.9%, respectively). The total phenolic compounds and total flavonoids did not vary significantly from phenological stages 1 to 8 (27.5-41.8 mg g⁻¹ DM and 20.8-35.3 mg g⁻¹ DM, respectively). Primary phenological stage 0 (germination) and secondary stage 09 (formation of cotyledonous leaves) presented high contents of P and particularly high contents of Fe, Mn, Zn and Cu.

Keywords: *Crotalaria*, phenological stage, protein, polyphenols, mineral composition

1.3 Introducción

El género *Crotalaria* pertenece a la familia Leguminosae (Fabaceae), tribu Crotalarieae, está presente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, especialmente en el hemisferio sur, y cuenta con 702 especies distribuidas mayormente

en el este y sureste de Africa; en Norteamérica se encuentran 34 especies de éste género distribuidas en México y el sur de los Estados Unidos (Le Roux *et al.*, 2013). Entre los usos reportados para estas especies están su aplicación como abono y cubierta verde para mejorar el contenido de nitrógeno del suelo, particularmente, de suelos ácidos (Gómez-Sosa, 2000).

A este género pertenece *C. longirostrata* Hook. & Arn., quelite tradicional desde tiempos ancestrales, que tiene como centro de domesticación a Mesoamérica y se encuentra distribuida en el sur-sureste de México, donde se conoce popularmente como Chipilín o Chipile (Acevedo *et al.*, 2009). Este quelite es apreciado por sus hojas y brotes, los cuales son consumidos como verduras o mezclados con frijoles, carne molida o huevos revueltos, además por ser el ingrediente principal en diversos platillos como tamales, sopas, guisos y tortillas (Morton, 1994; Castro-Lara *et al.*, 2011). Recientemente, el Chipilín esta siendo empleado en la elaboración de harinas, a partir de las hojas, para pan vegano (Ek-Chulin *et al.*, 2018) y como fuente proteica para la alimentación de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (Guerra-Centeno *et al.*, 2016). El follaje de Chipilín es rico en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico y metabolitos secundarios (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015; Miranda-Granados *et al.*, 2018), y su contenido proteico oscila entre 26 y 38 % dependiendo del sitio de colecta (Martínez, 2012).

Dado que el follaje es la principal fuente de alimento, el rendimiento foliar se ha evaluado en respuesta a la fertilización N, P, K (Ramón-López *et al.*, 2020), a la inoculación con *Rhizobium leguminosarum biovar* (Camarillo-Castillo y Mangan, 2020) y por su capacidad de rebrote (Pardo-Aguilar *et al.*, 2020). Estos estudios mostraron que el Chipilín necesita estar a pleno sol para mantener su producción de biomasa; bajo estas condiciones, la planta responde a la fertilización con NPK (Ramón-López *et al.*, 2020) y cuando la planta de Chipilín es sometida a cortes sucesivos del follaje cada 30 días, se observa un incremento en el número de nuevos tallos, biomasa y área foliar, aunque se reduce el diámetro de los tallos; además, la aplicación de nitrógeno disminuye la producción de nódulos (Pardo-Aguilar *et al.*, 2020). La inoculación con *Rhizobium leguminosarum biovar*, la cual ha demostrado incrementar el peso fresco del cultivo de

Chipilín hasta 158 kg·ha⁻¹; y es una forma de producción de Chipilín más sustentable sin efectos negativos al ambiente (Camarillo-Castillo y Mangan, 2020).

Respecto al desarrollo fenológico y su relación con la composición nutricional del follaje, los estudios son escasos. La fenología es el estudio de los eventos del ciclo de vida vegetal, en función del clima circundante. El uso de una guía de eventos fenológicos puede ser una herramienta fundamental para que los investigadores y productores tomen mejores decisiones en cuanto a técnicas de cultivo, uso de fitofármacos y aplicación de fertilizantes (Cavalcante *et al.*, 2020). Para evaluar el desarrollo fenológico en plantas se ha utilizado la escala “Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie” (BBCH) propuesta por Hess *et al.* (1997). Esta escala es un sistema con códigos decimales uniformes para estados fenológicos de especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Enríquez-Hidalgo *et al.*, 2020). La descripción de los estados fenológicos utilizando la escala BBCH, se ha realizado en una gran diversidad de especies, entre las que están frutales como manzana de azúcar (*Annona squamosa* L.), anona amarilla (*A. lutescens*), anona roja (*A. reticulata*), papaya (*A. macrophyllata*) y chincuya (*A. purpurea*) (González-Esquinca *et al.*, 2016), zapote (*Manilkara zapota*); hortalizas como pepino dulce (*Solanum muricatum*) y tomate de árbol o tomatillo (*Solanum betaceum* Cav.); y leguminosas como la soya (Munger *et al.*, 1997) y el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Cavalcante *et al.*, 2020). En especies del género *Crotalaria* no se han registrado las etapas fenológicas. Por lo anterior, los objetivos del presente estudio fue describir las etapas fenológicas de Chipilín de acuerdo a la escala BBCH y evaluar la concentración de minerales, compuestos fenólicos y flavonoides en la biomasa foliar durante el desarrollo fenológico de la planta. Se espera que los datos del presente estudio sean la base para conocer la calidad nutritiva del follaje de esta planta en función de su desarrollo, de manera tal que los investigadores y productores puedan contar con datos para uniformizar la calidad de este producto gastronómico del sureste de México.

1.4 Materiales y métodos

1.4.1 Establecimiento de experimento

El experimento se estableció a cielo abierto en Cárdenas, Tabasco, México, durante aproximadamente un año (del 07 de septiembre 2020 al 30 de septiembre 2021). El tipo de clima de la región es cálido-húmedo con lluvias abundantes en verano. En el año 2021, la temperatura media anual fue de 27.5 °C, con una temperatura máxima promedio de 32.5 °C que se presentó en el mes de mayo, y una temperatura mínima promedio de 22.5 °C durante el mes de enero (SMN, 2021).

Para la siembra, las semillas fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 %, lavadas con agua destilada y sumergidas en agua a 80 °C por 1 min para liberarlas de la latencia (Garduza-Acosta *et al.*, 2020).

La siembra se realizó en macetas de 5 kg, conteniendo una mezcla de suelo y vermiculita (3:1), que presentó una textura franca, pH de 6.85, MO de 7.56 %, P 267 mg kg⁻¹, K 0.738 cmol kg⁻¹, Fe 19 mg kg⁻¹, Zn 377 mg kg⁻¹, Mn 22.3 mg kg⁻¹, Cu 1.07 mg kg⁻¹. Por cada estado fenológico principal se establecieron 10 repeticiones, considerando una maceta como una repetición, haciendo un total de 90 macetas. En cada maceta se depositaron 3 semillas, con excepción de los estados 0 y 1 donde se depositaron 10 semillas por maceta. Cuando inició el primer ciclo de floración las plantas fueron directamente establecidas en el suelo, quitando la bolsa sin perturbar el desarrollo radicular.

1.4.2 Caracterización del desarrollo fenológico

Para definir los estados fenológicos se empleó la escala BBCH (Hess *et al.*, 1997) comprendidos desde la germinación hasta la maduración de las vainas. Los estados definidos en este caso, se resumen en el Cuadro 1-

El estado 9 que corresponde a la senescencia de la planta, no fue considerado, ya que la planta de Chipilín tiene un crecimiento continuo que puede durar al menos dos años. Además, los 9 estados principales fueron subdivididos en estados secundarios, que fueron representados con un doble dígito correspondiendo el primero al estado principal y el segundo al estado secundario. Estos estados secundarios corresponden a

intervalos de desarrollo cortos dentro de un estado fenológico principal (Cuadros 2, 3 y 4).

Cuadro 1. Estados de crecimiento principales (un dígito) para describir el desarrollo fenológico de Chipilín de acuerdo a la escala BBCH.

Estado	Descripción
0	Germinación
1	Desarrollo de hojas trifolioladas
2	Formación de brotes secundarios
3	Elongación del tallo principal
4	Desarrollo de partes vegetativas cosechables (hojas) antes de la emergencia de inflorescencias
5	Emergencia de inflorescencias
6	Floración
7	Desarrollo de vainas
8	Maduración de vainas

Cuadro 2. Estados de crecimiento principales (un dígito) y secundarios (dos dígitos para describir los estados de 0 germinación, 1 desarrollo de hojas y 2 formación de brotes secundarios de Chipilín, de acuerdo a la escala BBCH.

Código de un dígito	Código de dos dígitos	Descripción
Estado 0: germinación	00	Semilla seca
	01	Imbibición de semilla
	05	Emergencia de radícula (2 mm)
	06	Elongación de radícula
	07	Emergencia del hipocotilo con cotiledones
Estado 1: Desarrollo de hojas	10	Cotiledones completamente abiertos
	11	Apertura de primera hoja verdadera
	12	Apertura de primera hoja trifoliolada
	14	Apertura de tercera hoja trifoliolada
	16	Apertura de quinta hoja trifoliolada
	17	Apertura de la séptima hoja trifoliolada
Estado 2: Formación de brotes secundarios	19	Nueve o más hojas trifolioladas abiertas
	20	No se observan tallos secundarios visibles
	21	Primer brote secundario alcanza 0.5 cm
	22	Dos brotes secundarios alcanzan 0.5 cm
	24	Cuatro brotes secundarios alcanzan 0.5 cm
	26	Seis brotes secundarios alcanzan 0.5 cm
	28	Ocho brotes secundarios alcanzan 0.5 cm
29	Nueve o más brotes secundarios visibles	

Para el estado 0 germinación, las semillas fueron pretratadas para liberarlas de la latencia, y enseguida se realizaron ensayos *in vitro* para visualizar todos los estados secundarios; y en charolas de germinación para comparar el tiempo de emergencia de cotiledones de la superficie del suelo con el del ensayo *in vitro*.

Por cada estado fenológico secundario final, se realizaron muestreos de planta separando hojas, tallos y raíces. Las diferentes partes fueron secadas a 65 °C y pesadas para obtener el peso seco.

1.4.3 Composición mineral y proteica de biomasa foliar

Para la extracción de los minerales, se pesaron 0.5 g de biomasa foliar seca en tubos de vidrio, se agregaron 4 mL de ácido nítrico y 2 mL de ácido perclórico, y la mezcla se dejó reposar toda la noche.

Enseguida, las muestras se colocaron en un digestor marca Tecnal® iniciando con una temperatura baja (50-70 °C) durante 30 min, y aumentando la temperatura lentamente hasta 360 °C. El proceso finalizó hasta que se observaron humos blancos y la solución fue cristalina, entonces, las muestras se dejaron enfriar, se trasvasaron y se aforaron a 10 mL de agua destilada.

La cuantificación de K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn y Zn se hizo en el espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo AANALYST 700. El P se determinó por espectrometría de UV-VIS a una absorbancia de 470 nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Multiskan Go, utilizando reactivo vanadomolibdico.

Para el nitrógeno total, se obtuvieron los espectros de las muestras con un espectrómetro FOSS NIRSystems modelo 6500 de la marca Tekator, y el contenido total se obtuvo mediante las ecuaciones quimiométricas, a partir de este contenido se estimó el porcentaje de proteína.

Cuadro 3. Estados de crecimiento principales (un dígito) y secundarios (dos dígitos para describir los estados 3, 4 y 5, de acuerdo a la escala BBCH.

Código de un dígito	Código de dos dígitos	Descripción
Estado 3:	30	Primer nudo visible
Elongación del tallo principal	31	Dos nudos visibles
	...	Continua con el mismo esquema
	39	Nueve o más nudos visibles
Estado 4:	40	Inicio de la acumulación de biomasa
Desarrollo de partes vegetativas cosechables (hojas) antes de la emergencia de las inflorescencias	41	Se alcanzó el 10 % de biomasa
	43	Se alcanzó el 30 % de biomasa
	45	Se alcanzó el 50 % de biomasa
	46	Se alcanzó el 90 % de biomasa
Estado 5:	50	Inflorescencia visible
Emergencia de inflorescencia	51	Botones florales en la inflorescencia visibles
	53	Pétalos visibles en los botones florales de la inflorescencia visibles
	59	Inflorescencia con pétalos visibles pero aún cerrados

1.4.4 Polifenoles y flavonoides

Para la cuantificación de polifenoles y flavonoides las muestras foliares secas y molidas se desengrasaron, por cada estado fenológico, utilizando hexano al 95 %, en relación 1:10 (p/v). La mezcla se agitó durante 2 h a 280 rpm a 4 °C, al término se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, se decantó y el precipitado se dejó secar. Para la extracción, 250 mg de muestra se pesaron por duplicado, se agregó 1 mL de metanol al 80 % (CH₃OH) y se agitó 1 min en vortex, se colocó en baño María a 50 °C por 15 min y se centrifugó. El proceso se repitió con adición de 0.5 mL de metanol. Los sobrenadantes se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz. El contenido de polifenoles se determinó por el método descrito por Stratil *et al.* (2006).

Cuadro 4. Estados de crecimiento principales (un dígito) y secundarios (dos dígitos para describir los estados 6, 7 y 8, de acuerdo a la escala BBCH.

Código de un dígito	Código de dos dígitos	Descripción
Estado 6: Floración	60	Inicio de antesis, primera flor abierta
	61	Primera inflorescencia con flores abiertas
	63	Tercera inflorescencia con flores abiertas
	65	Floración total
	67	La mayoría de pétalos de la primera inflorescencia están secos
	69	Fin de floración y vainas visibles
Estado 7: Desarrollo de vainas. Medición de longitud de vainas con un vernier dos veces por semana	70	Primera vaina visible pero con pétalos senescentes y pegados aún
	71	10 % de vainas alcanzan su tamaño final
	73	30 % de vainas alcanzan su tamaño final
	75	50 % de vainas alcanzan su tamaño final
	77	70 % de vainas alcanzan su tamaño final
	79	Casi todas la vainas alcanzan su tamaño final
Estado 8: Maduración de vainas	80	Inicio de la maduración: semillas están verdes e inician desarrollo en las primeras vainas
	81	10 % de vainas maduran, color final de semillas, secas y duras
	83	30 % de vainas maduran, color final de semillas, secas y duras
	85	50 % de vainas maduran, color final de semillas, secas y duras
	87	70 % de vainas maduran, color final de semillas, secas y duras
	89	Casi todas las vainas están maduras, semillas con su color final, secas y duras.

Los flavonoides totales se extrajeron de acuerdo con el método de Alvarez-Parrilla *et al.* (2011) para ello, 0.5 g de muestra se colocó por triplicado, en tubos de nalgene de 50 mL y se mezclaron con 3.125 mL de metanol al 80 % (CH₃OH). La mezcla se agitó a 250 rpm por 30 min en oscuridad, usando un agitador orbital marca Solbal E-15. Al término, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min y se decantó para recuperar el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces bajo las mismas condiciones, ambos sobrenadantes se combinaron y se guardaron en oscuridad a 5 °C hasta su uso. La cuantificación se realizó según Menichini *et al.* (2009). 200 µL del extracto se colocaron en tubos de eppendorf de 2 mL, añadiendo 800 µL de agua destilada para hacer un volumen de 1000 µL.

Enseguida, 60 μl de nitrato de sodio al 5 % se adicionaron (tiempo cero). Después de 5 min, se añadieron 120 μL de AlCl_3 al 10 % (p/v) y a los 6 min para detener la reacción, se añadieron 400 μl de NaOH 1M, seguido de 420 μL de agua destilada para un volumen final de 2000 μL . Inmediatamente después se leyó la absorbancia a 510 nm. Una solución estándar de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina al 95% se usó para preparar concentraciones de 100 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el contenido se expreso en mg g^{-1} .

1.5 Resultados

1.5.1 Etapas fenológicas

De acuerdo a la escala BBCH, en el estado 0 se presenta la germinación de la semilla, proceso que tuvo una duración de siete días, terminando con la aparición de los cotiledones completamente abiertos. El estado 0 inicia con la semilla seca (estado 00) de color marrón claro, brillante, lisa y pequeña en forma de corazón (Figura 1). La imbibición de la semilla (estado 01) culmina cuando esta está completamente hinchada, observado a los cuatro días después de siembra (dds) y cuyo peso se había incrementado en mas de un 200 %. Inmediatamente, la radícula empieza a romper la testa (estado 05), la radícula se elonga (estado 06), y el hipocotilo con los cotiledones emerge (estado 07). Este proceso se realizó *in vitro* para poder observar todos los estados secundarios. En semillas de Chipilín pretratadas, la emergencia de los cotiledones de la superficie del suelo también se completó a los siete dds, cuando el proceso se realizó en charolas de germinación (Figura 2).



Figura 1. Estado fenológico 0 germinación y sus estados secundarios en Chipilín de acuerdo con la escala BBCH.

El estado 1 (Figura 2), se caracterizó por la aparición de las hojas trifolioladas, la duración fue de 30 días y finalizó cuando la planta de Chipilín presentó nueve hojas trifolioladas completamente abiertas (Cuadro 2).

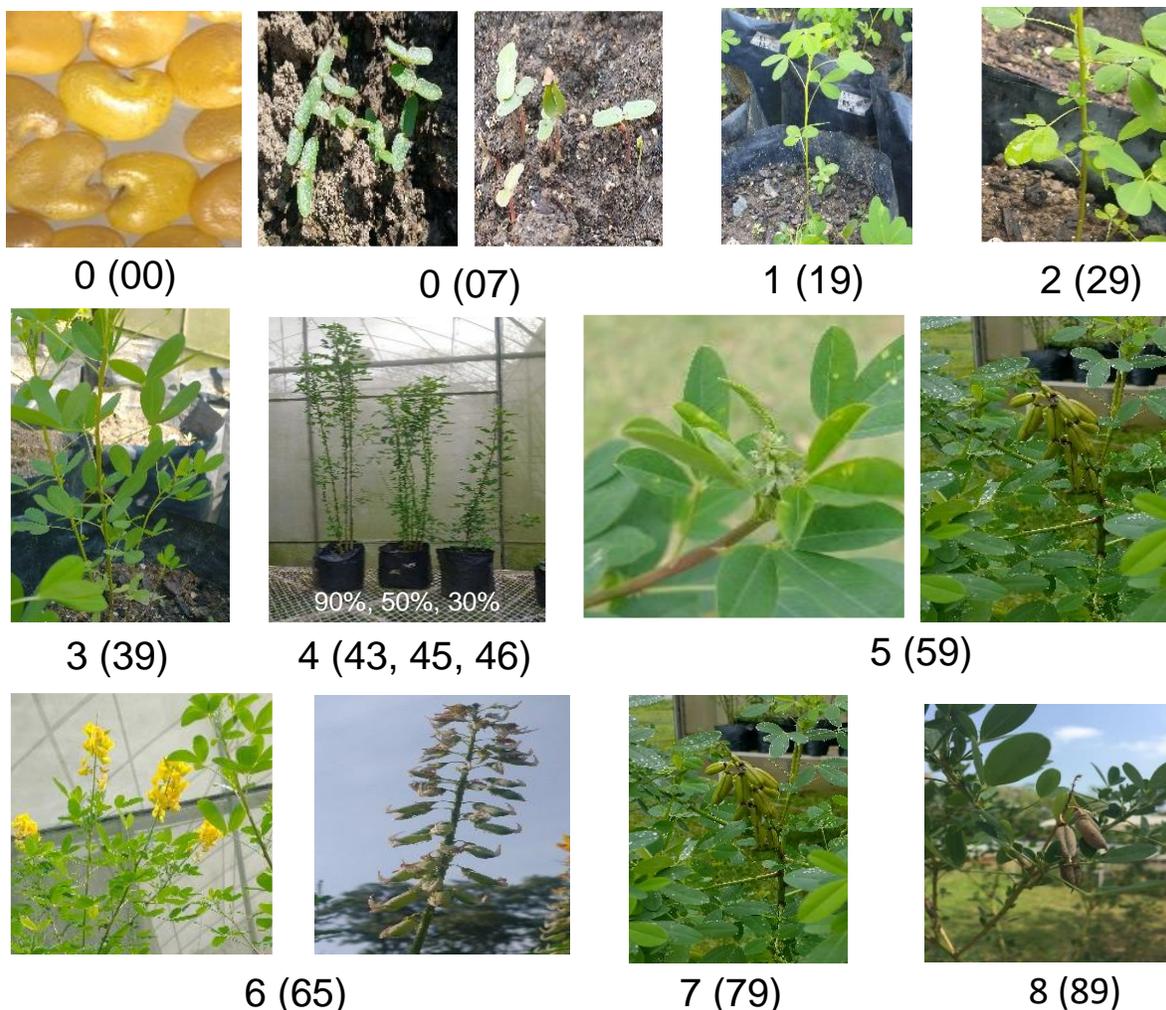


Figura 2. Estados fenológicos principales de Chipilín de acuerdo a la escala BBCH. 0 germinación, 00 semilla seca, 07 emergencia del hipocotilo con cotiledones, 01 desarrollo de hojas, 19 nueve o más hojas trifolioladas abiertas, 02 desarrollo de brotes secundarios, 29 nueve o más brotes secundarios visibles, 03 elongación del tallo, 39 nueve o más nudos visibles, 04 desarrollo de partes vegetativas cosechables, 43 30 % de acumulación de biomasa, 45 50 % de acumulación de biomasa, 46 90 % de acumulación de biomasa, 05 emergencia de inflorescencias, 59 inflorescencia con pétalos visibles pero aún cerrados, 06 floración, 65 floración total, 07 desarrollo de vainas, 79 casi todas la vainas alcanzan su tamaño final, 08 maduración de vainas, 89 casi todas las vainas están maduras, semillas con su color final, secas y duras.

El estado 2 se desarrolló de la siguiente manera, tomando como puntos de referencia la formación de brotes secundarios con tamaño superior a 0.5 cm; el conteo de estos brotes se realizó a partir de la presencia de meristemas axilares en el tallo. Estos brotes no desarrollan completamente en tallos mayores de 5 cm debido a la fuerte inhibición

que ejerce el meristemo apical. Este estado finaliza con la aparición de 9 brotes secundarios y tuvo una duración de 31 días (Figura 2).

El estado 3 (Cuadro 3) correspondiente a la elongación de tallos, se evalúa de acuerdo a la escala BBCH con la presencia de 9 nudos visibles.

La planta de Chipilín presenta un crecimiento lento y no se observa claramente la formación de nudos, por lo que la elongación del tallo fue definida en función de los puntos de crecimiento de meristemas axilares, presentes de forma alternada sobre el tallo (Figura 2). Este estado se desarrolla paralelamente a los estados 1 y 2, y tuvo una duración de 33 días. Al inicio de las ramificaciones, el tallo principal presentó una altura promedio de 96.07 ± 8.20 cm y un diámetro promedio de 3.63 ± 0.63 cm.

El estado 4 (Cuadro 3), desarrollo de partes vegetativas cosechables (biomasa foliar) antes de la emergencia de las inflorescencias, tuvo una duración de 120 días para alcanzar el 90 % y 73 días para el 50 %, considerando que la máxima biomasa foliar se alcanza con la floración y después disminuye durante el desarrollo de vainas y maduración en el primer ciclo de crecimiento de la planta de Chipilín (Figura 5a). Posteriormente, una vez que el tallo principal ha engrosado, se rompe la dominancia del meristemo apical del tallo principal e inicia la ramificación, donde se desarrollan al mismo tiempo partes vegetativas, floración y fructificación.

La arquitectura de la planta presenta al menos dos variaciones: 1 tallo principal, y varios tallos que emergen de la base del tallo. Las características del tallos principal, y de producción se muestran en el Cuadro 5.

El estado número 5 (Cuadro 3) corresponde a la emergencia de la primera inflorescencia. Esta inflorescencia debe ser la primera visible y está ubicada en el meristemo apical de la planta de Chipilín. Este estado presentó una duración desde la siembra de 132 días para observar la primera inflorescencia visible (Figura 2). Posteriormente, la aparición de botones florales aún cerrados en esta primera inflorescencia se presentó 18 días después (Figura 2).

Cuadro 5. Características del tallo principal de Chipilín, y de ramificaciones secundarias durante el segundo ciclo de floración.

Características del tallo principal y ramificaciones secundarias	Promedio ± de	
Altura de tallos a primera bifurcación (cm)	96.07 ± 8.20	
Diámetro de tallo principal (cm)	3.63 ± 0.63	
No. de ramificaciones	6.22 ± 1.60	
No. de inflorescencias	4.26 ± 2.59	
No. de vainas/planta	117.61 ± 89.72	
Peso de vainas/planta (g)	12.50 ± 10.33	
Peso de semillas/planta (g)	1.18 ± 0.69	
Peso de 100 semillas, g	0.84±0.02	

de = desviación estándar

El estado 6 (Cuadro 4) marca el período de floración, el cual inicia con botones completamente abiertos y termina con la formación de vainas con pétalos senescentes aún pegados (Figura 2). Este estado duró 13 días.

El desarrollo de las vainas ocurre en el estado fenológico 7 (Cuadro 4) con una duración de 16 días, en este tiempo, las vainas crecen y alcanzan el 70 % de su crecimiento (Figura 2). El último estado fenológico que se describe es el estado 8 (Cuadro 4). Durante este estado ocurre la maduración de las semillas en las plantas de Chipilín, lo cual se alterna con el desarrollo y floración de otras inflorescencias en la planta y el crecimiento lento de las partes vegetativas. Este estado presentó una duración de 56 días y finalizó cuando las vainas estuvieron maduras y las semillas presentaron su color final marrón claro, estuvieron secas y duras (Figura 2).

Dado el carácter semiperenne de la planta de Chipilín, inicia la ramificación de tallos secundarios y nuevamente el ciclo de floración hasta maduración de vainas y cosecha de semillas.

La duración del primer ciclo (desde siembra hasta la maduración de vainas) fue de 227 días, y la cronología de presencia de cada estado fenológico identificado en Chipilín, se muestra en la Figura 3 y Cuadro 6.

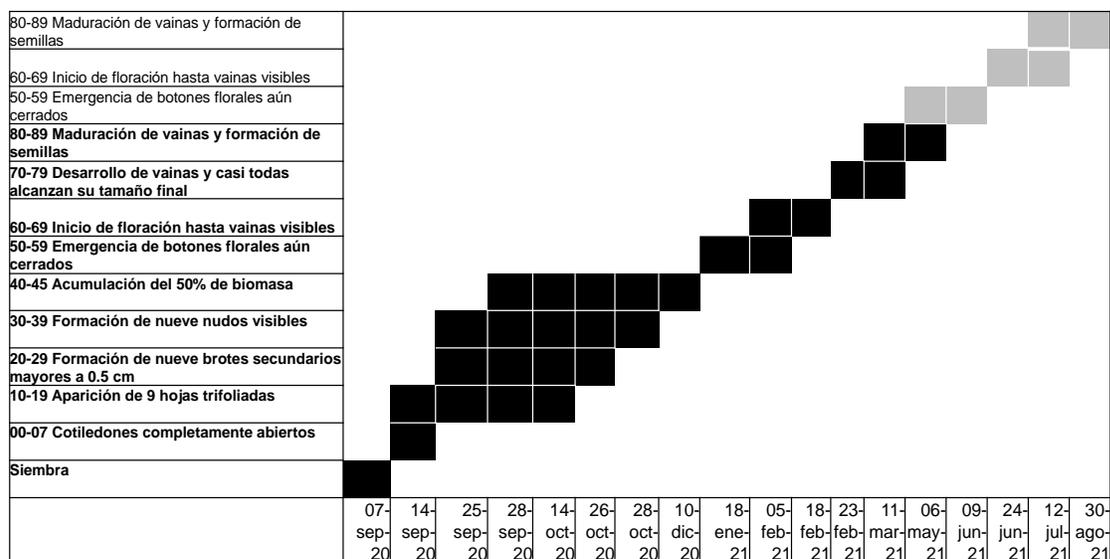


Figura 3. Cronología de estados fenológicos secundarios (dos dígitos) finales de cada estado fenológico principal de Chipilín de acuerdo a la escala BBCH.

Cuadro 6. Duración de cada estado fenológico principal de Chipilín, clasificados de acuerdo a la escala BBCH.

Estado fenológico principal	Mes	Duración del estado en días
0 Germinación	Septiembre	7
1 Desarrollo de hojas trifolioladas	Septiembre	30
2 Formación de brotes secundarios	Septiembre	31
3 Elongación del tallo principal	Septiembre-octubre	33
4 50% de acumulación de biomasa	Febrero	73
5 Emergencia de inflorescencias	Enero-febrero	18
6 Floración	Febrero	13
7 Desarrollo de vainas	Febrero-marzo	16
8 Maduración de vainas	Marzo-mayo	56

} Estados que se traslapan. Días totales 44

La evolución del desarrollo fenológico de Chipilín se observa en la Figura 4. Este primer ciclo de cultivo tuvo una duración de ocho meses, a partir de aquí, solo se presentan otros ciclos de floración a maduración de vainas.

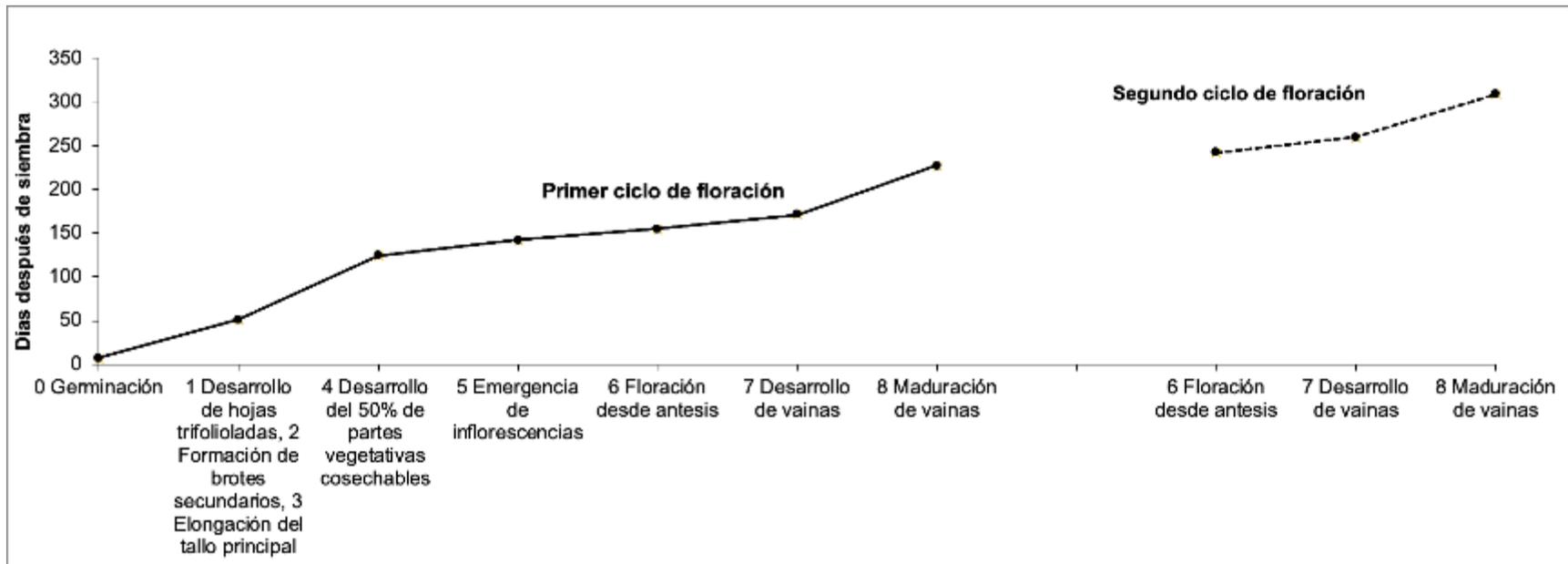


Figura 4. Evolución de ciclos fenológicos de Chipilín, mostrando el primer y segundo ciclo de floración.

1.5.2 Acumulación y distribución de biomasa por estado fenológico

La acumulación de biomasa es lenta en hojas, tallos y raíces durante los estados 1, 2, y 3 (Figura 5a). A partir del estado 4, se observa una aceleración en la acumulación de biomasa total, aportada principalmente por el crecimiento del tallo principal. La biomasa total promedio de una planta pasa de 9.88 g de materia seca (MS) (estado 4), a 59.05 g MS (estado 8).

Las hojas, en el estado 4 representan el 27.2 % (2.69 g MS) de la biomasa total de la planta a este estado. La biomasa foliar alcanza un máximo (8.89 g MS) en el estado 7, aunque solo representa el 22.7 % de la biomasa total de este estado. A partir de este estado, se observa una reducción de la biomasa foliar, y en el estado 8 esta solo representa el 10.9 % (6.45 g MS) de la biomasa total de la planta.

En la Figura 5b se puede observar que el área foliar disminuye a partir de la floración (estado 6), aún cuando en el peso de las hojas la reducción se observa hasta el estado 7. Las raíces presentaron evolución en la acumulación de materia seca muy similar a las hojas durante todo el ciclo, alcanzando al final en el estado 8, 8.16 g MS (13.8 % de la biomasa total).

El tallo, a diferencia de hojas y raíces, mantuvo un incremento constante durante los 8 estados fenológicos evaluados iniciando el incremento significativo a partir del estado 4 con 6.5 g MS planta⁻¹ (65.7 % de la biomasa total del estado) y alcanzando un promedio final de 44.44 g MS planta⁻¹ (75.2 % de la biomasa total).

Esta mayor proporción del peso de tallo en la biomasa total, se observa en la Figura 5c. En el estado 1, existe una alta relación hoja-tallo con un valor promedio de 6.18, mientras que para los siguientes estados, esta relación disminuye fuertemente, incrementando el peso del tallo sobre el de las hojas, mostrando el estado 8 una relación de 0.16. Los estados fenológicos que presentan relación hoja-tallo superior o igual a 1 son el 1, 2, 3 y 5.

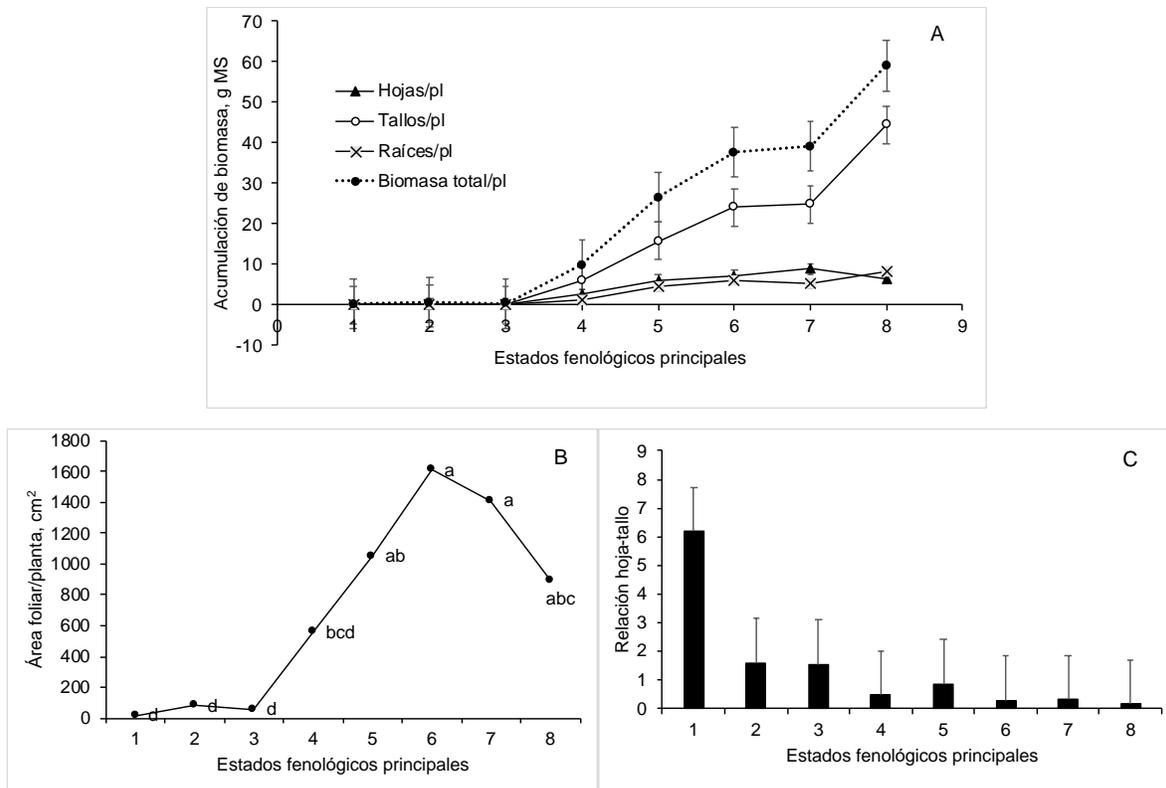


Figura 5. Acumulación total de biomasa (a), desarrollo del área foliar (b) y relación hoja-tallo (c) de estados fenológicos principales de Chipilín.

1.5.3 Proteína y minerales en hojas y semilla

Los rangos de variación durante el desarrollo fenológico del contenido de proteína en hojas fueron de 22.9 a 43.99 % (Cuadro 7). Los contenidos mas altos se observaron en el estado 0 (presencia de cotiledones abiertos) y en semillas. El contenido mas bajo en hojas de los estados 2, 5, 6 (floración), 7 y 8.

Los resultados de la cuantificación de micro y macro nutrientes durante el desarrollo fenológico de Chipilín se muestran en el Cuadro 8. La Figura 6 muestra una representación gráfica de los contenidos de minerales durante el desarrollo fenológico de Chipilín, incluye los contenidos en la semilla.

El K mostró un rango de variación de 0.22 a 0.40 %, correspondiendo el porcentaje mas alto al estado 07 (emergencia de cotiledones), mientras que los porcentajes mas bajos correspondieron a los estado 7 y 8.

Cuadro 7. Concentración de proteína en semillas y hojas durante el desarrollo fenológico de Chipilín.

Estado fenológico	Contenido de proteína, %
0	40.7a
1	28.71b
2	26.5bc
3	28.87b
4*	27.07bc
5	23.53c
6	22.91c
7	25.49bc
8	25.55bc
Semilla	43.99a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

*50 % de acumulación de materia seca antes de emergencia de inflorescencias (Estado 5).

Cuadro 8. Concentración de minerales en semilla y hojas durante el desarrollo fenológico de Chipilín.

Estado fenológico	K	P	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Mn	Zn
	%					mg kg ⁻¹			
0	0.40^a	1.27 ^a	0.07 ^c	0.07 ^{bc}	0.02 ^a	852.4^a	27.28^a	351^a	717^a
1	0.38 ^{ab}	0.83 ^{bc}	0.26 ^b	0.10^a	0.02 ^a	294.75 ^b	10.65 ^b	78.11 ^b	31.61 ^b
2	0.35 ^{ab}	0.79 ^{bc}	0.23 ^b	0.08 ^{abc}	0.01 ^a	275.66 ^b	10.09 ^b	58.59 ^b	30.09 ^b
3	0.36 ^{ab}	0.87^b	0.2 ^b	0.07 ^{abc}	0.01 ^a	205.25 ^b	11.68 ^b	58.22 ^b	32.19 ^b
4*	0.31 ^{ab}	0.68 ^{cd}	0.22 ^b	0.07 ^{bc}	0.03 ^a	232.36 ^b	15.0 ^b	54.51 ^b	37.81 ^b
5	0.25 ^{ab}	0.58 ^{de}	0.23 ^b	0.07 ^{bc}	0.03 ^a	135.72 ^b	18.85 ^{ab}	50.64 ^b	30.14 ^b
6	0.24 ^{ab}	0.58 ^{de}	0.23 ^b	0.06 ^c	0.01 ^a	122.58 ^b	18.3 ^{ab}	45.46 ^b	32.25 ^b
7	0.22 ^b	0.52 ^{de}	0.27 ^b	0.07 ^{bc}	0.02 ^a	102.58 ^b	17.22 ^b	37.74 ^b	30.3 ^b
8	0.22 ^b	0.44 ^e	0.44^b	0.1 ^{abc}	0.03 ^a	141.07 ^b	11.81 ^b	49.67 ^b	31.5 ^b
Semilla	0.22 ^b	1.20 ^a	0.03 ^c	0.03 ^d	0.01 ^a	72.75 ^b	17.47 ^{ab}	6.55 ^c	48.27 ^b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

*50 % de acumulación de materia seca antes de emergencia de inflorescencias (Estado 5)

Números marcados en negritas indican los estados fenológicos donde los valores de minerales fueron más altos

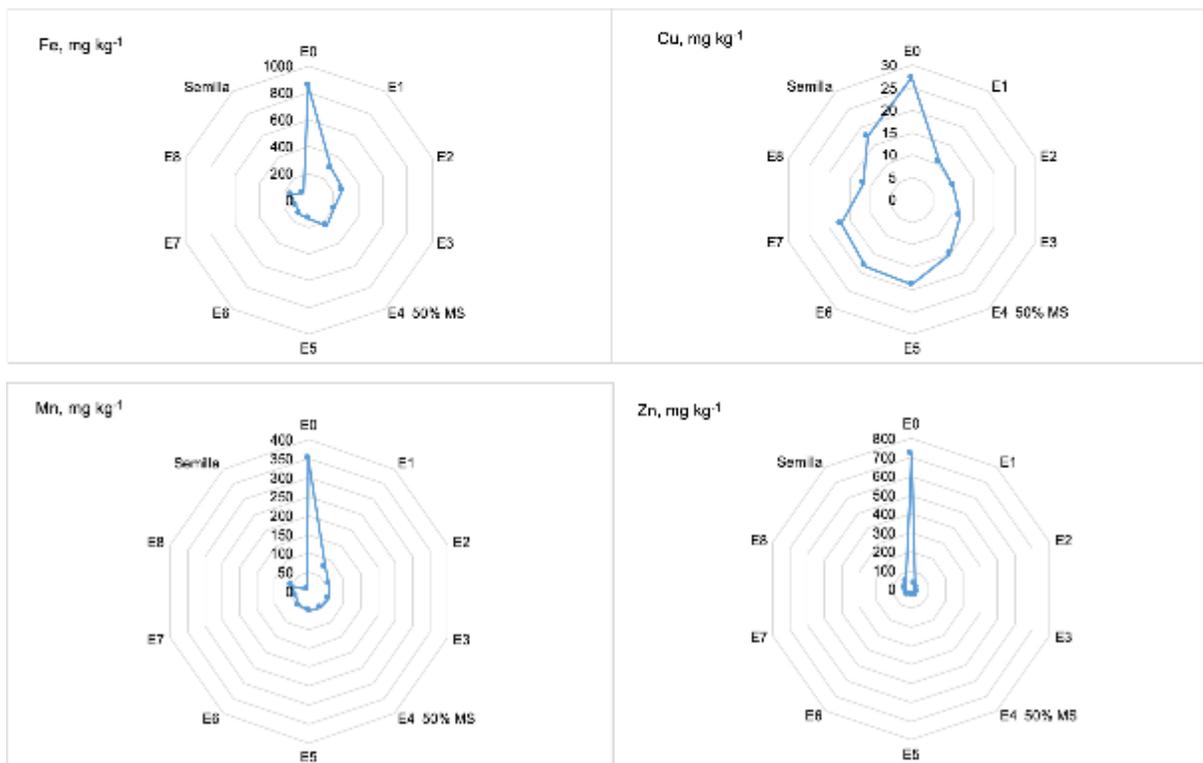
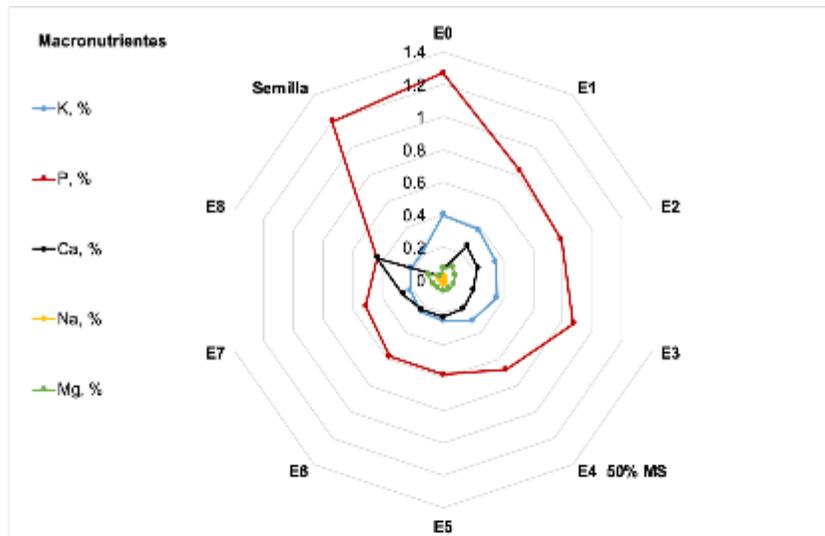


Figura 6. Representación gráfica del contenido de minerales en semilla y en hojas de Chipilín en los estados fenológicos principales del 0 al 8. E=estado fenológico principal.

El rango de variación para P fue de 0.44 a 1.27 % siendo el estado de maduración de vainas (estado 8) donde se observó la menor concentración de este elemento y el estado 0 la mayor.

Ca y Mg presentaron la mayor concentración en el estado 8 y la menor en el estado 0. Los rangos de variación para estos elementos fueron de 0.07 a 0.44 % para Ca y de 0.07 a 0.1 % para Mg. El Na se encontró presente en el desarrollo de toda la planta, sin embargo, la cuantificación de este mineral no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los estados fenológicos evaluados.

Respecto a los microelementos, el rango de variación para Fe fue de 102 a 852 mg kg⁻¹. La mayor concentración de éste elemento se observó en el estado 0 (germinación, 09 emergencia de cotiledones), sin diferencias significativas entre los otros estados fenológicos. Al igual que para Fe, la mayor concentración de Cu, Mn y Zn se observó en el estado 0, con valores muy altos en comparación con los otros estados fenológicos.

1.5.4 Contenido de polifenoles y flavonoides totales

El contenido de polifenoles y flavonoides en hojas y semilla de Chipilín durante cada etapa de desarrollo vegetativo, se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Concentración de polifenoles y flavonoides en hojas durante el desarrollo fenológico de Chipilín.

Estados fenológicos principales y secundarios	Polifenoles totales	Flavonoides totales
	mg g ⁻¹	
0. Germinación	87.19 ^a	110.70 ^a
1. Desarrollo de hojas	30.45 ^{cd}	20.82 ^b
2. Formación de brotes secundarios	33.79 ^{bcd}	26.24 ^b
3. Elongación del tallo principal	27.56 ^d	23.73 ^b
41. 10% de acumulación de biomasa	30.46 ^{bc}	27.46 ^b
43. 30% de acumulación de biomasa	33.29 ^{bc}	27.55 ^b
45. 50% de acumulación de biomasa	33.04 ^{bcd}	25.05 ^b
46. 90% de acumulación de biomasa	33.38 ^{bc}	23.25 ^b
5. Emergencia de inflorescencia	32.94 ^{bcd}	25.06 ^b
6. Floración	40.27 ^{bc}	26.61 ^b
7. Desarrollo de vainas	36.02 ^{bcd}	28.32 ^b
8. Maduración de vainas	41.84 ^b	35.31 ^b
Semilla seca	88.65 ^a	42.28 ^b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

La mayor concentración de polifenoles se presenta en semillas (88.65 mg g⁻¹) y el estado 0 (87.19 mg g⁻¹), la menor en el estado 3 correspondiente a la elongación del tallo (27.56 mg g⁻¹). Los flavonoides presentaron variaciones de 20.82 a 110.7 mg g⁻¹.

El contenido más alto de estos metabolitos se observa en el estado 0 (110.70 mg g⁻¹) correspondiente a la germinación, cuando la planta presenta los cotiledones abiertos completamente pero no se observa presencia de hoja. Las semillas presentaron contenidos de 42.28 mg g⁻¹, los cuales no fueron significativamente diferentes de los de otros estados fenológicos en la planta.

1.6 Discusión

El uso de la escala BBCH para describir el desarrollo fenológico de esta especie mostró que las semillas pre-tratadas para interrumpir la latencia, inician el proceso de imbibición rápidamente, y el estado 09 se completó a los siete días con la emergencia de los cotiledones. Esto indica que el metabolismo interno de la semilla se reactivó para apoyar el crecimiento del embrión y lograr la protrusión de la radícula. Nonogaki *et al.* (2020) nombran a esta etapa como fase I y II, indicando que durante estas fases, la semilla realiza la imbibición de agua e incrementa las divisiones mitóticas y expansión celular para que la radícula rompa la testa y emerja.

En el presente estudio se observó la emergencia de la radícula cuatro días. La fase III del proceso de germinación en Chipilín es completada a los siete días, donde se observa la elongación de la radícula y formación de las dos primeras hojas verdaderas. El tiempo para germinar de las semillas de Chipilín es semejante al tiempo de emergencia, para *C. Spectabilis*, reportada por Daimon (2006). Esta rapidez de germinación y formación de hojas cotiledonares en Chipilín, contrasta con el tamaño de la semilla, ya que 1000 semillas pesan 8.40 g, aunque este peso es mayor al de 1.6 g reportado por Miller (1967) para semillas de *C. longirostrata* provenientes de Guatemala.

El desarrollo foliar es una característica importante de ésta especie, ya que son las hojas los productos comestibles. La formación de hojas trifolioladas, y la elongación del tallo principal fue lento en esta especie durante los primeros meses, y es el tallo el que presentó mayor crecimiento y acumulación de biomasa en comparación con hojas y raíces. Lo anterior parece indicar que los productos de la fotosíntesis realizada por las

hojas son utilizados principalmente para apoyar la elongación del tallo, seguido de la formación de nuevas hojas.

Así mismo, durante este periodo se observó una fuerte dominancia del meristemo apical del tallo, inhibiendo el crecimiento de brotes secundarios. En Chipilín, esta dominancia podría ser una estrategia para permitirle al tallo principal alcanzar el grosor y tamaño requerido para ramificar. También parece ser que los brotes que logran desarrollar ramificaciones son los cercanos al meristemo apical del tallo, dando lugar a la arquitectura arbustiva de la planta.

Por otro lado, Pardo-Aguilar *et al.* (2020) observaron que la dominancia del meristemo apical en Chipilín puede romperse aplicando cortes sucesivos al tallo principal para permitir la ramificación de los brotes secundarios, lo que incrementa la biomasa foliar. Este proceso de inhibición de la dominancia apical del tallo y el desarrollo de ramificaciones de los brotes secundarios en Chipilín parecer ser mas complejo, ya que Dun *et al.* (2006) han observado que entre los factores descritos que tienen un efecto en el control de ramificaciones están el estado de desarrollo de la planta, el sitio de localización de las yemas, y los ambientales como cantidad de luz incidente, adquisición de carbono y la nutrición de la planta.

En todos los estados fenológicos, los tallos representaron la proporción mas alta (75 %) de la biomasa total de la planta de Chipilín, lo que coincide con lo observado tanto por Ramón-López *et al.* (2020) en plantas de hasta 110 días de edad expuestas a 100 % de radiación solar; como por Barbosa *et al.* (2020) en *C. spectabilis* y *C. juncea* donde los tallos representan el 70 y 75 % de la materia seca total de la planta, respectivamente.

Las especies del género *Crotalaria* están consideradas como de rápido crecimiento, sin embargo los estudios realizados sobre acumulación y distribución de biomasa, indican que existen diferencias entre especies. Mientras *C. juncea* requiere 195 días para alcanzar la máxima producción de materia seca, *C. spectabilis* solo requiere 150 días (Barbosa *et al.*, 2020); por otra parte, el Chipilín requirió 240 días para terminar el primer ciclo de floración. En este sentido el Chipilín presenta un ciclo mas largo que estas dos especies de *Crotalarias*.

La floración marca el estado de transición de la fase vegetativa a la reproductiva de una planta, que va acompañada por cambios en un amplio rango de otras características

de desarrollo como la elongación del tallo, dominancia apical, ramificaciones laterales, traslocación de fotoasimilados, maduración y rendimiento (Weller y Ortega, 2015). El Chipilín, inició la floración una vez que cesó la elongación del tallo principal y se formaron las primeras ramificaciones, produciendo una inflorescencia terminal, con floración de la base hacia la punta de la inflorescencia. Durante la etapa de floración de Chipilín continuó la formación de hojas pero cuando inició la formación de vainas, la biomasa de hojas disminuyó manteniéndose la de los tallos, por el incremento de las ramificaciones. Esta reducción en biomasa foliar también se observa en *C. juncea* y *C. spectabilis* cuando inicia la floración de acuerdo con Barbosa *et al.* (2020).

Proteína y minerales

El uso comestible de plantas de Chipilín es conocido desde tiempos ancestrales, tienen diversas formas de ser empleadas, y forman parte del grupo de leguminosas, consideradas como relevantes para la alimentación humana por el Codex alimentario (Olmedilla *et al.*, 2010). La composición mineral de Chipilín varió según el estado fenológico de la planta. Los estados 0 germinación y del 1 al 3, mostraron las concentraciones más altas de macroelementos. En el caso de Ca y K, Jimenez-Aguilar y Grusak (2015), indican concentraciones más bajas de Ca de 0.13-0.21 % y de K de 0.21-0.29 %. Para Na, los valores son inferiores a los observado por Jimenez-Aguilar y Grusak (2015) (6.7-15 %). En el caso de P, en Chipilín se observaron las concentraciones más altas en los estados 0, 1, 2 y 3 (estados de germinación, desarrollo de hojas y de tallo principal) y en semilla, lo que difiere con lo observado en *C. juncea* donde la mayor concentración de P se observó a los 120 dds; pero coincide con *C. spectabilis*, a los 90 dds que correspondería al estado 3 de nuestro estudio (Barbosa *et al.*, 2020). Aunque la comparación de concentraciones de minerales entre especies establecidas en sitios diferentes debe de tomarse con reserva, debido a que estas concentraciones responden a la biodisponibilidad del elemento relacionado con el tipo de suelo donde se encuentran (White y Brown, 2010).

Los resultados de los microelementos cuantificados en Chipilín son más altos para Fe y Cu que los observados en planta entera seca de *C. longirostrata* de Guatemala (80-105 mg kg⁻¹ y 3-5 mg kg⁻¹, respectivamente) (Cáceres *et al.*, 2019). En el caso de Fe, los

resultados obtenidos son mas altos que los observados por Morton (1994) (24.3-42.8 mg kg⁻¹) y Jimenez-Aguilar y Grusak (2015) (5.69-13.38 mg kg⁻¹). Resalta el estado fenológico 0 (germinación) donde los valores de microelementos fueron muy altos en nuestro estudio, lo que podría conllevar un posible riesgo toxicológico (Rubio *et al.*, 2007).

De acuerdo con Olmedilla *et al.* (2010) el grupo de las leguminosas se caracteriza por poseer altos contenidos de hierro, zinc y calcio, además de presentar alto contenido proteico con alrededor de 20 a 30 % en frijoles y 38 a 40 % en soya y lupino, resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio donde la proteína en hojas varío de 22.9 a 28.8 %, y en el estado 0 germinación y en semillas fue de 40.7 % a 43.9 %, respectivamente. El alto contenido de proteína en la semilla puede ser resultado de la fijación de nitrógeno a través de la actividad de la bacterias fijadoras de nitrógeno en las raíces, que hacen disponible el nitrógeno amoniacal para la síntesis de proteínas (Maphosa y Jideani, 2017), además de la contribución en nitrógeno proporcionada por la presencia de alcaloides, los cuales son compuestos nitrogenados. Durante la germinación, se observa un incremento en contenido proteico atribuido a la síntesis de nuevas proteínas para apoyar el crecimiento de la radícula, ya que durante la fase II de la germinación se realizan procesos de transcripción y traducción de los ARNm para apoyar la síntesis de nuevas proteínas y que éstas estén disponibles para la emergencia de la radícula y el crecimiento del embrión (Nonogaky *et al.*, 2010).

Debido a su alto contenido mineral las leguminosas como *C. longirostrata* pueden ser consideradas como alimento funcional, además la Organización Mundial de la Salud recomienda también el uso de leguminosas para la reducción del riesgo de enfermedades relacionadas con la alimentación como obesidad y diabetes mellitus tipo 2, en especial *C. pallida* donde se han realizado los estudios del efecto de extractos sobre diabetes (Panda *et al.*, 2015).

Polifenoles y flavonoides

Las especies de *Crotalaria* son una excelente fuente de compuestos bioactivos, como ácidos fenólicos (ácido cafeico, ferúlico) y flavonoides (quercetina, kaempferol, espinacetina), carotenoides, ácido α -linolénico y betalainas, que presentan elevada

actividad antioxidante (Santiago-Saenz *et al.*, 2019). De los pocos estudios realizados sobre contenido de polifenoles y flavonoides en Chipilín, los resultados obtenidos de la cuantificación de estos compuestos durante el desarrollo fenológico, se observó mayor concentración, particularmente en el estado 0 (germinación) y en semillas, en referencia a lo mostrado por Jimenez-Aguilar y Grusak (2015). Estos autores determinaron 115.73 a 178.88 $\mu\text{g CE g}^{-1}$ en flavonoides y 2.68-3.38 mg GAE g^{-1} de compuestos fenólicos totales, valores mas bajos que los observados en nuestro estudio. Los altos contenidos de polifenoles y flavonoides observados en las semillas de Chipilín en comparación con los de las hojas, podrían asociarse a la función que tienen como antialimentarios (amargura, astrigencia), lo que puede ser una estrategia de la planta para ahuyentar a los depredadores (Tarasevičienė *et al.*, 2019). Estos altos contenidos de compuestos fenólicos en semillas (fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, coumarinas, estilbenos, taninos condensados y ligninas), se incrementan durante la germinación debido a la síntesis y transformación de compuestos fenólicos por la degradación de carbohidratos, donde la glucosa es el principal precursor de la síntesis de estos y de sus rutas de señalización como la glicólisis y la de propanoides (Idowu *et al.*, 2020).

Considerando la importancia de los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante (Pandey y Rizvi, 2009), y la presencia de estos en Chipilín en todos los estados fenológicos estudiados, se recomienda su estudio detallado en esta verdura de hoja verde, con el fin de promover su consumo.

1.7 Conclusión

El Chipilín presenta un ciclo fenológico largo (ocho meses para primera floración), que requiere de la elongación y engrosamiento del tallo principal para iniciar ramificaciones secundarias y floración. Del número de ramificaciones depende la fructificación y producción de semillas, ya que produce inflorescencias terminales. Durante todo el ciclo fenológico, el tallo presenta la mayor acumulación de biomasa, seguido de las hojas y raíces. Los estados de desarrollo fenológico del 1 al 4 son los que presentan mayor contenido proteico. Los compuestos fenólicos totales y flavonoides no presentan variación del estado fenológico 1 al 8. El estado fenológico principal 0 germinación en el estado 09 formación de hojas cotiledonares presentó elevados contenidos de proteína, P, y particularmente de Fe, Mn, Zn y Cu.

CAPÍTULO II. VARIACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS DURANTE EL DESARROLLO FENOLÓGICO DE CHIPILÍN (*Crotalaria longirostrata*)

2.1 Resumen

Dentro del género *Crotalaria*, compuestos del metabolismo secundario están presentes, muchas especies poseen altas concentraciones de alcaloides pirrolizidínicos (AP) lo que las hace altamente tóxicas para animales y humanos. El Chipilín pertenece a este género, sus hojas son consumidas en alimentación en el sureste mexicano, y se desconoce la presencia de AP en hojas de esta especie. El objetivo del estudio fue determinar la presencia de compuestos fenólicos y AP en semillas y hojas durante el desarrollo fenológico del Chipilín. Para la determinación de los compuestos fenólicos (CF) y AP se obtuvieron extractos de hojas de nueve estados fenológicos. Los extractos de CF se analizaron por cromatografía de placa fina, y los de AP por GC-MS usando como estándar de referencia monocrotalina. Los resultados mostraron que la mayor riqueza de CF se observa en los estados fenológicos 2: desarrollo del tallo, 3: elongación del tallo, 4: desarrollo de partes vegetativas, 5: inflorescencia y 6: floración con un total de 5 compuestos identificados, de los cuales el C5 con un valor R_f de 0.71 es exclusivo de estos estados fenológicos. Mientras que en los extractos de semilla se encontraron 3 compuestos, de los cuales destaca el C6 con un valor R_f de 0.87 y presente solo en la muestra de semilla. La identificación cualitativa de alcaloides a partir del extracto de CF permitió observar la presencia de alcaloides principalmente en semillas y el estado 0 al formarse turbidez y un precipitado naranja-marrón, semejante al que se observó en la muestra control de semillas de *Lupinus*. El análisis GC-MS no detectó la presencia de AP en hojas en ningún estado fenológico evaluado. Entre los compuestos presentes e identificados están la aspidoalbina y obscurinervidina 6,7-dihidro, compuestos que pertenecen a los alcaloides indolizidínicos, además de la presencia de ácidos fenólicos. En semillas y estado 0 germinación, se identificaron AP que implican toxicidad como la heliotridina y la senecifilina, por lo que su consumo para alimentación no sería recomendable.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, GC-MS, hojas, semillas, germinación

2.2 Abstract

Within the genus *Crotalaria*, secondary metabolism compounds are present, and many species have high concentrations of pyrrolizidine alkaloids (PA) which makes them highly toxic to animals and humans. The Chipilín belongs to this genus, its leaves are consumed in food in the Mexican southeast, and the presence of PA in leaves of this species is unknown. The objective of the study was to determine the presence of phenolic compounds and AP in seed and leaves during the phenological development of Chipilín. For the determination of phenolic compounds (PC) and AP, leaf extracts of nine phenological stages were obtained. PC extracts were analyzed by thin plate chromatography, and AP extracts by GC-MS using monocrotaline as reference standard. The results showed that the greatest PC richness is observed in the phenological stages 2: stem development, 3: stem elongation, 4: development of vegetative parts, 5: inflorescence and 6: flowering with a total of 5 identified compounds, of which the C5 with an Rf value of 0.71 is exclusive of these phenological states. While in the seed extracts 3 compounds were found, of which C6 stands out with an Rf value of 0.87 and present only in the seed sample. The qualitative identification of alkaloids from the PC extract allowed observing the presence of alkaloids mainly in seeds and stage 0, when turbidity and an orange-brown precipitate were formed, similar to that observed in the control sample of *Lupinus* seeds. The GC-MS analysis did not detect the presence of AP in leaves in any evaluated phenological stage. Among the compounds present and identified are aspidoalbina and obscurinervidin 6,7-dihydro, compounds that belong to the indolizidine alkaloids, in addition to the presence of phenolic acids. In seeds and germination stage 0, PAs that involve toxicity such as heliotridine and senecifiline were identified, so their consumption for food would not be recommended.

Keywords: Secondary metabolites, GC-MS, leaves, seeds, germination

2.3 Introducción

Los metabolitos secundarios presentes en diferentes órganos vegetales, están asociados con la protección de plantas contra patógenos y roedores, ejercen funciones fisiológicas de protección contra factores de estrés como la radiación ultravioleta, y

presentan actividad antioxidante (Barba *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos y los alcaloides forman parte de los metabolitos secundarios presentes en plantas (Erb y Kliebensteinb, 2020). En especies del género *Crotalaria*, se han identificado altas concentraciones de compuestos fenólicos. En *C. retusa* se encuentran miricetina, quercetina y retina en corteza, frutos y flores, y el ácido-p-hidroxibenzoico, un derivado fenólico del ácido benzoico, en todos los órganos de esta especie (Sinan *et al.*, 2020). En Chipilín, los compuestos fenólicos con actividad antioxidante y antifúngica han sido encontrados en altas concentraciones en extractos de hojas o de mezclas de ramas con hojas (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020). Entre los ácidos fenólicos identificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) están el ácido gálico, cafeico y ferulico; y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS por sus siglas en inglés) la monocrotalina (20.7 %), el ácido ftálico (16.47 %), el fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano) (12,39 %), el vinil crotonato (8.76 %), el ácido hexadecanoico metil éster (8.03 %), el ciclopropanocarboxílico, 2-isopropoxifenil éster (6.94 %), el clorocresol (6.64 %), el 2-metil-2-propenoico ácido, etenil éster (5.32 %) y el adogen 73 (9-octadecenamida) (1.18 %) (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020).

Respecto a los alcaloides, muchas de las especies del género *Crotalaria* contienen alcaloides pirrolizidínicos (AP) y aminoácidos no proteicos, principalmente en sus semillas, con actividad hepatotóxica, neumotóxica y mutagénica en humanos y animales (Williams y Molyneux, 1987; Wilson *et al.*, 1992). Los AP son tóxicos a través de sus productos metabólicos, que al ser transformados por las enzimas hepáticas citocromo P-450 en pirroles causan daño a nivel cromosómico (Asres *et al.*, 2004). El patrón de los AP varía ampliamente dentro del género y depende de factores como la variedad o tipo de planta, las condiciones climáticas, el periodo de muestreo y la parte de la planta analizada, entre otros (Fletcher *et al.*, 2009). Independientemente de la toxicidad que estas moléculas pueden causar en humanos y animales, los AP tienen muchas propiedades farmacológicas, como anticancerígenas, las cuales pueden ser explotadas en diversos programas (Moreira *et al.*, 2018); y han sido utilizados como marcadores quimiotaxonómicos a nivel familiar, subfamiliar y también infragenérico en plantas (Flores *et al.*, 2009).

La molécula de AP es derivada de la ornitina, comprende un heterociclo pirrolizidínico, con un grupo metilo y un sustituyente hidroxilo (necina). Existen 4 bases necinas básicas: platinecina, retronecina, heliotridina y otonecina. Los alcaloides básicos, parece ser que se acumulan más en las semillas; mientras que los N-óxidos se concentrarían en las partes verdes de las plantas, principalmente en el follaje en crecimiento (Schoental, 1955; Dusemund *et al.*, 2018). En el caso de las especies de *Crotalaria*, se han detectado, por GC-MS, 33 alcaloides diferentes colectados de brotes y puntas en floración de 24 taxa presentes en Australia (Fletcher *et al.*, 2009), y en semillas de 28 especies de *Crotalaria* de Brazil (Flores *et al.*, 2009). Los principales AP encontrados son monocrotalina, integerrimina, senecionina, ridelina, retrorsina; y en semillas son la monocrotalina y la tricodesmina (Elika, 2013; Flores *et al.*, 2009). En semillas de Chipilín, la concentración de alcaloides pirrolizidínicos detectadas son bajas (0.31 %) y no se registra la presencia de monocrotalina, lo que contrasta con las altas concentraciones determinadas en semillas de *C. spectabilis* (3.85 %), *C. retusa* (2.69 %), y *C. alata* (1.60 %) donde si está presente la monocrotalina (Williams y Molyneux, 1987). Sin embargo, en mezclas de ramas con hojas de Chipilín, Cruz-Rodriguez *et al.* (2020) reportan la presencia de monocrotalina. Otro alcaloide presente en especies de *Crotalaria* es la junceina, alcaloide con capacidades inhibitorias sobre microorganismos patógenos aislado de *C. juncea* (Peñaloza y Pelaez, 2008).

Dada la cultura de consumo de hojas y brotes tiernos de Chipilín en México, particularmente en la región del sur-sureste, surge la necesidad de conocer la presencia de compuestos fenólicos y de alcaloides durante su desarrollo fenológico, ya que los estudios realizados hasta la fecha en esta especie de *Crotalaria* no indican edad de la planta, ni periodo de muestreo, lo cual puede causar variación entre los compuestos presentes (Elika, 2013; Flores *et al.*, 2009). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue conocer la variación de los compuestos fenólicos y alcaloides pirrolizidínicos presentes en hojas durante el desarrollo fenológico de la planta de Chipilín. Con los resultados obtenidos se espera contribuir al conocimiento fitoquímico de esta especie de *Crotalaria* y a la toma de decisiones para la cosecha de sus partes vegetativas, ya que además de ser un ingrediente gastronómico, esta especie podría tener mayores aportes en otras ramas de la investigación.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Establecimiento de experimento

El experimento se estableció a cielo abierto en Cárdenas, Tabasco, México, durante el periodo del 07 de septiembre 2020 al 30 de septiembre 2021. Para la siembra, las semillas fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % (Garduza-Acosta *et al.*, 2020) lavadas con agua destilada y sumergidas en agua a 80 °C por 1 min para liberarlas de la latencia. La siembra se realizó en macetas de 5 kg, conteniendo una mezcla de suelo y vermiculita (3:1). Por cada estado fenológico principal se establecieron 10 repeticiones, considerando una maceta como una repetición, haciendo un total de 90 macetas. En cada maceta se depositaron 3 semillas, con excepción de los estados 0 y 1 donde se depositaron 10 semillas por maceta. Cuando inició el primer ciclo de floración las plantas fueron directamente establecidas en el suelo, colocando la bolsa sin perturbar el desarrollo radicular.

2.4.2 Caracterización del desarrollo fenológico

En este estudio se definieron nueve estados fenológicos principales de la escala BBCH (Hess *et al.*, 1997) que comprendieron desde la germinación hasta la maduración de vainas. Los estados fueron: estado 0 (germinación), estado 1 (desarrollo de hojas), estado 2 (formación de brotes secundarios), estado 3 (elongación del tallo principal), estado 4 (desarrollo de partes vegetativas cosechables), estado 5 (emergencia de inflorescencias), estado 6 (floración), estado 7 (desarrollo de vainas), estado 8 (maduración de vainas). Cada uno de los 9 estados principales fueron subdivididos en estados secundarios, que fueron representados con un doble dígito correspondiendo el primero al estado principal y el segundo al estado secundario. Estos estados secundarios corresponden a intervalos de desarrollo cortos dentro de un estado fenológico principal y fue el momento en el que se tomaron las muestras foliares para el estudio, con excepción del estado 0 donde se cosechó al momento de emergencia de cotiledones de la superficie del suelo (estado 07 Emergencia del hipocotilo con cotiledones). Los otros estados secundarios muestreados fueron 19 Nueve o más hojas trifolioladas abiertas, 29 Nueve o más brotes secundarios visibles, 39 Nueve o más nudos

visibles, 43 30 % de acumulación de biomasa, 45 50 % de acumulación de biomasa, 46 90 % de acumulación de biomasa, 59 Inflorescencia con pétalos visibles pero aún cerrados, 65 Floración total, 79 Casi todas la vainas alcanzan su tamaño final, y 89 Casi todas las vainas están maduras, semillas con su color final, secas y duras.

Las muestras foliares se secaron a 50 °C y pesaron para obtener el peso seco.

2.4.3 Extracción de compuestos fenólicos

Los extractos fueron obtenidos en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. El método de extracción se realizó de acuerdo con Stratil *et al.* (2006), 1 g de muestra de hojas previamente se desengrasó con hexano en una relación 1:10 (p/v); la mezcla se agitó durante 2 h a 280 rpm a 4 °C, al término se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el precipitado libre de grasa se dejó secar. Para la extracción, se pesaron 250 mg de la muestra desgrasada, se agregó 1 mL de metanol al 80 % y se agitó por 1 min en vortex, luego fueron colocadas a baño maría a 50 °C por 15 min. Al término la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min, el sobrenadante se recuperó en otro tubo y el residuo se lavó nuevamente y se agitó con 0.5 mL de metanol al 100 %, ambos sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -20°C protegidos de la luz.

2.4.4 Identificación de compuestos fenólicos por cromatografía de capa fina

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México. Del extracto obtenido se tomaron 0.3 µL de cada muestra, para ser colocados en una placa con sílica gel (TLC-PET White Fluorecent Indicator 254 nm). Para la fase móvil se realizaron ensayos previos (AcOEt/MeOH 9:1, 6:4, 5:5, MeOH/H₂O 98:2, MeOH 100, CHCl₃/ MeOH 9:1, 7:3, 6:4, 5:5), seleccionando, de acuerdo a la polaridad de las muestras, la fase móvil cloroformo/metanol en relación 7:3. Una vez observada la corrida de compuestos, la placa se sacó del recipiente conteniendo el solvente y se dejó secar. Para el revelado de placas se utilizó cámara de rayos UV de onda larga (365nm) y onda corta (254 nm). Esto permitió visualizar los compuestos que no pueden ser visibles para el ojo humano, y observar los compuestos fluorescentes revelados con luz de onda larga y onda corta.

Posteriormente, las placas se secaron a temperatura ambiente. Al término se asperjaron con una solución de sulfato cérico/agua a una concentración de 2.60 % m/m , y se secaron colocando la capa de sílica en una plancha de calor. Se marcaron los compuestos revelados. Los valores de R_f fueron obtenidos con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{=distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el solvente}}$$

Alternativamente se realizaron placas para detectar la presencia de monocrotalina o algún otro alcaloide usando como revelador el reactivo de Dragendorf.

2.4.5 Identificación de presencia de alcaloides en extractos con el reactivo de Dragendorff

Una primera prueba consistió en colocar una muestra de 3 μ L del extracto metanólico de hojas sobre la capa de sílica, posteriormente se colocó en la cámara que contiene el solvente con la fase cloroformo/metanol en relación 7:3. Una vez que se observó la corrida de los compuestos, se retiró del recipiente y se dejó secar. Para finalizar se realizaron asperciones hasta cubrir totalmente la placa con reactivo de Dragendorff y se procedió a observar la identificación de los compuestos alcaloidales presentes en las muestras, los cuales se deben de teñir de color naranja.

Para la segunda prueba, se realizaron reacciones de precipitación con el reactivo de Dragendorff. A 0.5 mL del extracto metanólico se le agregaron 5 a 6 gotas de ácido clorhídrico al 10 %. Se agitó y se colocó en baño María por 20 min, se dejó enfriar y se agregaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff hasta observar la formación de precipitados color anaranjado-marrón (Dominguez, 1988).

2.4.6 Extracción de alcaloides pirrolizidínicos

La extracción de alcaloides se realizó de acuerdo con Witte *et al.* (1993). Se pesaron 0.5 g de la muestra seca, se agregaron 15 mL de H_2SO_4 0.05 M y se homogeneizaron por 3-4 min, posteriormente se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente. Para separar el sobrenadante, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se pasó por papel filtro y midió para dividirlo en dos partes iguales.

Primera parte: 3 mL de la muestra se alcalinizaron (pH 9-10) con 1 mL de hidróxido de amonio NH_4OH (Este pH se checó con una tira indicadora de pH). Este volumen alcalinizado se eluyó a través de una columna de Extrelut NT3 (Merck) (1.4 mL de solvente por gramo de Extrelut). Los alcaloides pirrolizidínicos terciarios se eluyeron con CH_2Cl_2 (diclorometano) en relación de 6 mL por gramo de Extrelut. El eluido se evaporó a 60°C y el residuo se disolvió con metanol.

Segunda parte: 3 mL de la muestra se ajustaron a pH ácido con 0.025 M de H_2SO_4 y se mezclaron con 0.5 g de polvo de Zn. La mezcla se agitó durante 5 h a temperatura ambiente, después se filtró y se prosiguió con los pasos de la primera parte.

2.4.7 Identificación de alcaloides en GC-MS

Los extractos obtenidos se diluyeron con 1 mL de metanol y se colocaron en viales ámbar a 4°C . La identificación se realizó en un cromatógrafo de gases marca Varian 3900 modelo Saturn 2100T, acoplado a un espectrómetro de masas con triple cuádrupolo modo full scan (MS), con automuestreador CombiPal, y energía de ionización (EI) de 70eV.

La columna utilizada fue DB-5MS (30 m x 0.25 mm; J & W Scientific). El volumen de inyección fue de 1 μL . Las condiciones de temperatura de la columna fueron 100°C por 1 min; incremento a 140°C a una velocidad de 6°C min^{-1} manteniendo constante por 10 min; e incremento a 200°C a una velocidad de 5°C min^{-1} manteniendo constante por 40 min, el tiempo final de corrida fue de 69.7 min. El gas acarreador fue Helio a un flujo de 1.6 mL min^{-1} .

El detector de masas se utilizó con un rango de 60-480 m/z . Compuestos en cada muestra fueron identificados por comparación con el espectro de masas de la National Institute of Standards and Technology Library (NIST Search 2.0). Como alcaloide de referencia, se usó monocrotalina (SIGMA-ALDRICH C2401-500 mg).

2.5 Resultados

2.5.1 Identificación de compuestos fenólicos por cromatografía de capa fina (TLC)

El revelado con sulfato cérico permitió observar 6 compuestos fenólicos. 5 de ellos presentes en las muestras de hojas a diferentes etapas de desarrollo de la planta (C1, C2, C3, C4, y C5); y uno (C6) en los extractos de semillas (Figura 7). Visiblemente se puede observar que existe una variación en la concentración de los compuestos encontrados, ya que las marcas de cada compuesto en el cromatograma se aprecian con diferentes tonalidades para el mismo compuesto, lo que se deduce como diferencias en la concentración del compuesto en cada etapa de desarrollo fenológico.

En la Figura 7, se muestra que el C1 está presente durante todo el desarrollo fenológico de la planta, solo que al parecer en concentraciones diferentes (evaluadas de acuerdo a la coloración del compuesto).

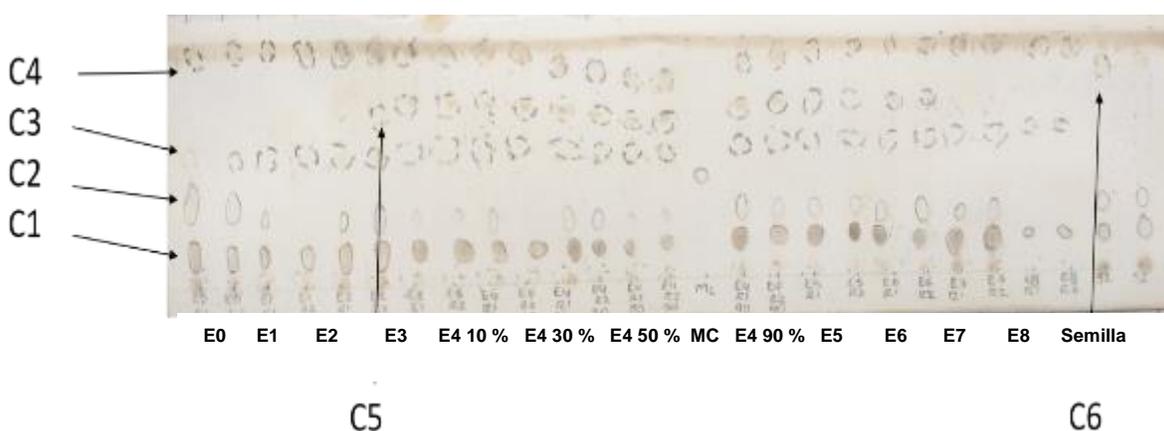


Figura 7. *Crotalaria longirostrata*, en la fase móvil cloroformo/metanol en relación 7:3, en donde se pueden observar 6 compuestos diferentes C1, C2, C3, C4, C5, y C6. Estados fenológicos (e0: germinación, E1: desarrollo de hojas, E2: desarrollo del tallo, E3: elongación, E4: 10% acumulación de biomasa, E4: 30% de acumulación de biomasa, E4: 50% de acumulación de biomasa, E4 90% de acumulación de biomasa).

Por otro lado, el C5 se observa del estado 3 hasta el estado 6, estados en los que ocurre principalmente el desarrollo del tallo y hojas, por lo que se puede atribuir a que el compuesto está presente únicamente durante la fase de desarrollo de estos órganos. Los valores de R_f de cada compuesto se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Valores de *Rf* de cada compuesto encontrado por TLC en muestras de hojas y semillas de Chipilín (*Crotalaria longirostrata*).

	Compuesto					
	1	2	3	4	5	6
Rf	0.14	0.27	0.55	0.92	0.71	0.87
D.E.	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0

D.E.=Desviación estándar.

La mayor riqueza de compuestos encontrada en el estudio realizado se observa en los estados de desarrollo fenológico 2: desarrollo del tallo, 3: elongación del tallo, 4: desarrollo de partes vegetativas, 5: inflorescencia y 6: floración con un total de 5 compuestos identificados, de los cuales el C5 con un valor *Rf* de 0.71 es exclusivo de estos estados fenológicos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Índices de retención (*Rf*) de compuestos identificados por TLC de extractos de compuestos fenólicos de hojas y semillas de Chipilín (*Crotalaria longirostrata*).

Estado fenológico	Compuesto revelado					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Estado 0: germinación	0.15	0.35	0.53	0.94		
Estado 1: desarrollo de hojas	0.12	0.28	0.53	0.97		
Estado 2: desarrollo del tallo	0.15	0.28	0.53	0.94	0.69	
Estado 3: elongación del tallo	0.15	0.28	0.56	0.94	0.74	
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 10 %	0.12	0.25	0.56	0.94	0.74	
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 30 %	0.12	0.25	0.53	0.89	0.71	
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 50 %	0.12	0.25	0.53	0.82	0.66	
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 90 %	0.17	0.3	0.56	0.89	0.69	
Estado 5: inflorescencias	0.17	0.28	0.56	0.92	0.74	
Estado 6: floración	0.15	0.25	0.56	0.94	0.71	
Estado 7: formación de vainas	0.12	0.25	0.58	0.94		
Estado 8: maduración de vainas	0.15		0.61	0.94		
SEMILLA	0.15	0.3				0.87

Mientras que en los extractos de semilla se encontraron 3 compuestos, de los cuales destaca el C6 con un valor *Rf* de 0.87 y que está presente solo en la muestra de semilla.

Revelado en cámara de UV. La cámara ultravioleta visible permitió observar compuestos fluorescentes (Figura 8). En el extracto de semilla se observa un tipo de compuesto (C6) con una coloración blanca-azulada fluorescente, mientras que en los extractos de hoja en los 9 estados evaluados se puede apreciar un compuesto (C4) con una coloración rosa-violeta. Este último compuesto no se observa en las muestras de semilla. De acuerdo con la coloración que presentan estos dos compuestos observados por fluorescencia, se puede deducir que se trata de compuestos totalmente diferentes. Los resultados revelados en onda corta son los mismos que los revelados con sulfato cérico ilustrados en la Figura 9.

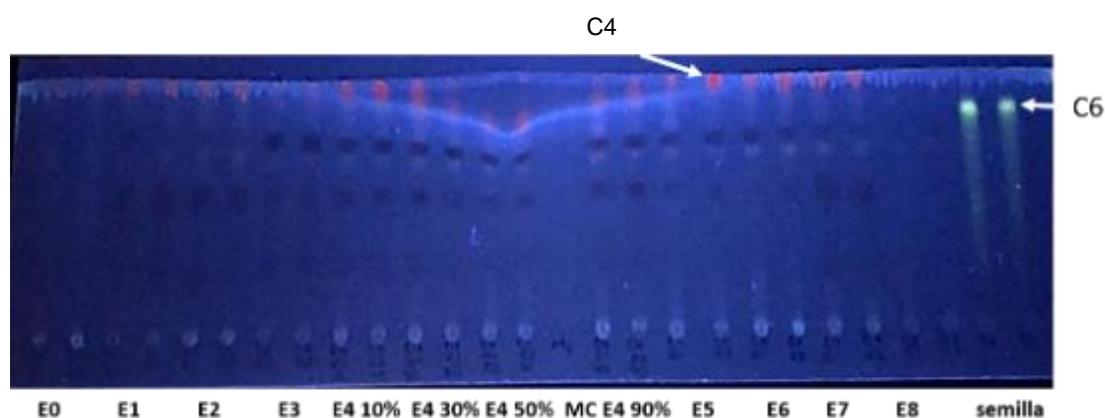


Figura 8. Revelado de extractos de compuestos fenólicos, en cámara ultravioleta visible a 365 nm, obtenidos a partir de hojas de diferentes estados fenólicos de Chipilín.

2.5.2 Identificación de presencia de alcaloides en extractos con el reactivo de Dragendorff.

Al revelar con reactivo de Dragendorff los extractos de compuestos fenólicos de Chipilín depositados en placa de sílica gel junto con el estándar comercial del alcaloide monocrotalina, se observa que éste alcaloide no está presente en los extractos de hoja en la planta, ni al parecer ningún otro alcaloide, ya que no se observaron manchas reveladas (Figura 9a). Al aplicar calor a la placa, el estándar desaparece de la fase estacionaria, por lo cual cabe la posibilidad de que esta molécula pirrolizidínica sea termolábil.

Sin embargo, la identificación cualitativa de alcaloides a partir del extracto de compuestos fenólicos permitió observar la presencia de alcaloides en semillas y el estado

0 germinación de Chipilín al formarse turbidez y un precipitado naranja-marrón, semejante al que se observó en la muestra control de semillas de *Lupinus* (Figura 9b). En las otras muestras solo se colorearon de naranja-rojizo pero no se observó formación de precipitado.

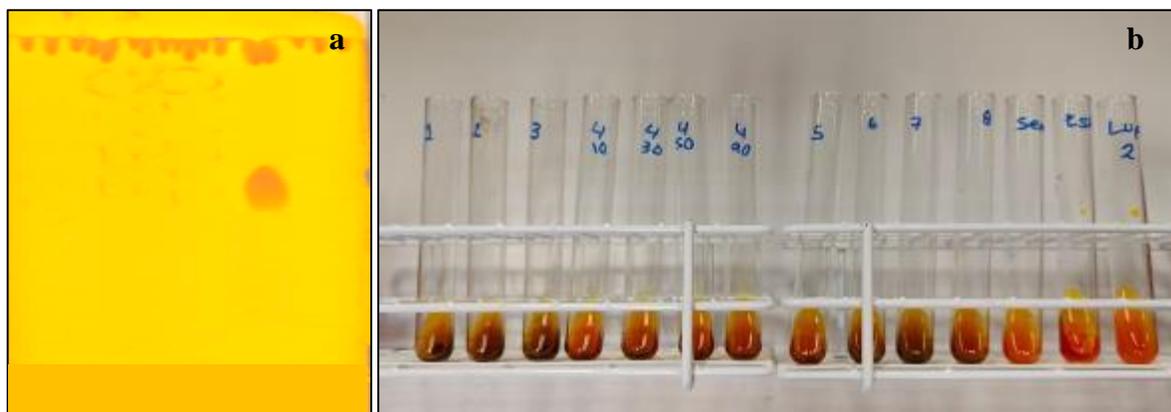


Figura 9. Presencia del alcaloide monocrotalina, revelado con reactivo de dragendorff sin aplicar calor (a), y formación de precipitado naranja con turbiedad indicando la presencia de alcaloides en los extractos de compuestos fenólicos obtenidos de semilla durante el desarrollo fenológico de Chipilín (b).

2.5.3 Identificación de alcaloides en GC-MS

Durante el desarrollo fenológico de Chipilín, se identificaron 2 alcaloides pirroizididínicos (Cuadro 12). Uno de ellos, la senecifilina, que es un diéster cíclico de necina, cuyo precursor es la senecionina (Yaber *et al.*, 2009).

La presencia de este alcaloide fue detectada en el estado 0 correspondiente a la germinación de la planta (Figura 10a), etapa donde solo se analizan los cotiledones ya que no hay presencia de hojas; y en semillas:

Cuadro 12. Alcaloides pirroizidínicos identificados por GC-MS en hojas durante el desarrollo fenológico de *C. longirostrata*

Compuesto	Tipo	Estado fenológico (E)	M+ m/z	IONES, m/z (abundancia relativa)
Heliotridina	Diéster no cíclico	Semilla	155	80-111-155-94-41-68-81-54-39-45
Senecifilina	Diéster cíclico	E0 Germinación	333	94-93-120-43-95-119-80-121-53-108

El segundo compuesto pirrolizidínico detectado fue la heliotridina (Figura 10b). El alcaloide monocrotalina no fue identificado en ningún estado fenológico analizado en GC-MS.

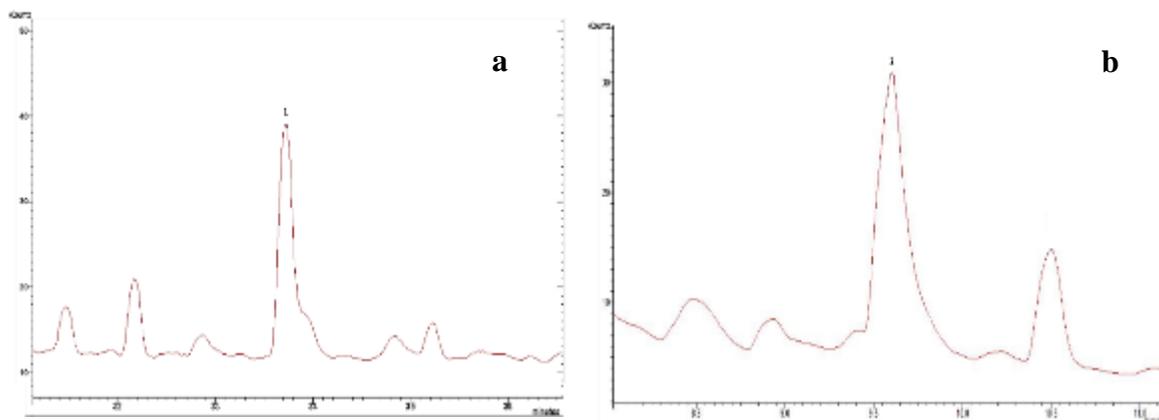


Figura 10. Cromatogramas correspondientes al estado 0: germinación, mostrando la presencia de senecifilina (1a) y de heliotridina (2b) en muestras de Chipilín.

En las hojas durante el desarrollo fenológico de Chipilín solo se detectaron alcaloides tipo indol como la obscurinervidine-6,7-dihidro en los estados de desarrollo fenológico 0, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y semilla, con excepción de los estados 1 y 2 (Cuadro 13, Figura 11)

Cuadro 13. Alcaloides tipo indol detectados por GC-MS en hojas durante el desarrollo fenológico de *C. longirostrata*.

Compuesto	Tipo	Estado fenológico (E)	M+ m/z	IONES, (abundancia relativa)	m/z
Obscurinervidine-6,7-dihidro	Indolizidínicos	E0, E1, E2 E3, E4 10%, E4 30 %, E4 90 %, E5 , E6, E7, E8 y Semilla	426	411-426-71-69-85-83-412-427-97-70	
Aspidoalbina	Indolizidínicos	E3, E4 10 %, E5, E7, E8, Semilla	428	138-384-428-110-57-370-109-160-371-385	

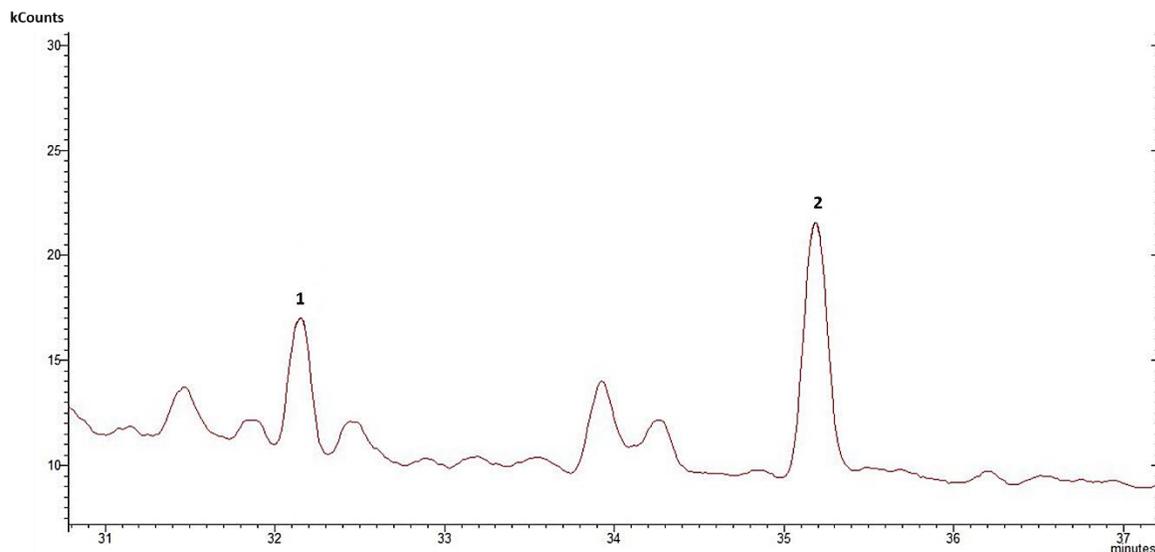


Figura 11. Cromatograma correspondiente al estado 5: emergencia de inflorescencia, con presencia de alcaloides indolizidínicos obscurinervidina 6,7-dihidro (1) y aspidoalbina (2).

Además, de los alcaloides pirrolizidínicos e indolizidínicos, el análisis GC-MS detectó ácidos fenólicos y otros compuestos presentes en diferentes etapas del desarrollo fenológico del Chipilín (Cuadro 14). Entre estos compuestos, destacan los ésteres del ácido ftálico presentes en todos los estados de desarrollo fenológico y en semilla.

Cuadro 14. Compuestos no pirrolizidínicos encontrados en extractos de hojas *Crotalaria longirostrata*, durante el desarrollo fenológico.

Compuesto	Estado fenológico (E)	M+ m/z	IONES
Ftalato de metilo-2-hetilhexilo	E4 50 %, E5, E8	292	163-149-181-70-164-77-112-83-92-41
Acido heptadecanoico-16-metil ester	E0, E3, E4 10 %, E4 30 %, E4 50 %, E4 90 %, E5, E6,E7	298	74-87-75-45-57-55-69-143-298-83
Acido ftálico, di(octyl ester)	E0, E1, E2, E3, E4 10 %, E4 30 %, E4 50 %, E4 90 %, E5, E6, E7, E8, Semilla	390	149-167-150-279-104-57-71-55-70-69
Metilfluroglucinol	Semilla	140	140-139-138-69-123-111-122-141-55-39
Tetrametil pirrol	Semilla	123	122-123-108-107-42-120-53-79-41-77
193e-5-8-indolizina	Semilla	193	152-96-153-70-122-55-67-54-68-150

2.6 Discusión

Identificación de compuestos por cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina reveló 6 compuestos en el extracto de compuestos fenólicos a partir de hojas con diferentes R_f , lo que indica diferencias en polaridad entre los compuestos revelados. Los compuestos C1 y C2 son de alta polaridad, C3 y C4 de polaridad intermedia, mientras que C5 y C6 de baja polaridad. Entre estos últimos se encuentran los ácidos carboxílicos, fenoles, flavonoides y alcoholes; entre los de polaridad intermedia aminas, ésteres, flavonoides glicosilados y aldehídos y cetonas; y los de alta polaridad son derivados halogenados, éteres, alcanos y alquenos (Vallejo-Rosero *et al.*, 2021).

En semillas solo se observaron dos compuestos de alta polaridad y el C6 de baja polaridad. Este compuesto de baja polaridad presentó fluorescencia blanca-azulada a 364 nm, en semillas y rosa-violeta intenso en los otros estados de desarrollo fenológico, indicativo de una molécula que posee dobles enlaces conjugados y grupos funcionales aromáticos, como los fenoles, flavonas, isoflavonas o hidroxiflavonas, cumarinas e incluso alcaloides que presenten un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (Romero *et al.*, 2002). Sin embargo, estos compuestos no son alcaloides ya que al ser asperjados con el reactivo de Dragendorff no se colorearon (Dominguez, 1988).

Identificación de ácidos fenólicos y ésteres del ácido ftálico

Otros compuestos detectados durante todos los estados de desarrollo de Chipilín fue la presencia de ácidos fenólicos (ácido heptadecanoico-16-metil ester), y ésteres del ácido ftálico. Los ésteres de ácido ftálico son sustancias lipofílicas que son utilizadas como plastificantes o aditivos en algunos productos, sin embargo, estudios recientes han demostrado su presencia en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas de 60 especies vegetales pertenecientes a 38 familias botánicas, entre ellas la Fabaceae (Sing *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2021).

Estos compuestos han demostrado poseer características alelopáticas, antimicrobianas, insecticidas y otras actividades biológicas, por lo que no deben ser considerados solo como contaminantes creados por el humano (Huang *et al.*, 2021). Cruz-Rodríguez *et al.* (2020) indican, resultados similares a este estudio, la presencia

del ácido ftálico y ácidos fenólicos como el ácido heptadecanoico-16-metil ester en ramas (hojas más tallos) de *C. longirostrata*.

En semillas, solo se detectó la presencia de metilfluroglucinol, un ácido fenólico derivado del ácido gálico. Este compuesto también se encuentra bajo la forma de metilfluroglucinol-galoil-hexosa en la cáscara y la pulpa del fruto de guayaba (Rojas-Garbanzo y Pérez, 2019).

Identificación de alcaloides en GC-MS

Múltiples especies de *Crotalaria* contienen abundantes metabolitos secundarios, entre ellos alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos, mutágenicos, neumotóxicos (Asres *et al.*, 2004), y con potencial cancerígeno (Fletcher *et al.*, 2009). El estudio realizado en la búsqueda de alcaloides pirrolizidínicos en hojas de Chipilín no mostró la presencia de estos compuestos, al menos en cantidad detectable por GC-MS. En contraste, en semillas, se detectó la presencia de dos alcaloides pirrolizidínicos, la senecifilina, un diéster cíclico de necina cuyo precursor es la senecionina (Yaber *et al.*, 2009) y la heliotridina.

Los alcaloides han sido también identificados en extractos metanólicos de flores, frutos y corteza de *Crotalaria retusa* (Sinan *et al.*, 2020), además de ser propios de las especies de Senecio, entre ellas *Senecio madagascariensis*, clasificada como maleza altamente tóxica (Gardner *et al.*, 2006). La senecionina y sus derivados al ser diésteres cíclicos son altamente tóxicos, a diferencia de los diésteres no cíclicos que presentan toxicidad intermedia, los monoésteres que inducen la menor toxicidad y los amino alcoholes que no son tóxicos (Mattocks, 1967, *et al.* 1971, 1988).

Estos alcaloides, al igual que la heliotridina, alcaloide pirrolizidínicos presente como base libre en especies de *Crotalaria*, o como sus derivados lasiocarpine y heliosupine (diésteres de cadena abierta) presentan fuerte citotoxicidad (Glück *et al.*, 2021). Por lo que la presencia de estos alcaloides en semillas y en el estado 0 germinación, debe ser indicativo para evitar su consumo.

La monocrotalina un alcaloide pirrolizidínico de alta toxicidad presente en numerosas especies del género *Crotalaria*, no fue detectado en semilla ni en ningún estado de desarrollo de Chipilín bajo las condiciones de este estudio. La no presencia de

monocrotalina en semillas de Chipilín, concuerda con lo observado por Williams y Molyneux (1987), en semillas de *C. longirostrata*, donde no detectó la presencia de monocrotalina en las semillas, entre las especies de *Crotalaria* que presentaron alta concentración de monocrotalina (3.85 %) en sus semillas está *C. spectabilis*.

Por otro lado, se detectaron alcaloides indolizilidínicos como la aspidoalbina y obscurinervina 6,7-dihidro. La presencia de este tipo de alcaloides ha sido reportada en otras especies de *Crotalaria* como *C. spinosa*, *C. emarginella*, *C. phillipsiae*, donde se identificó al alcaloide tashiromine (5-hydroxymethyl-trans-indolizidine) en hojas y flores, en asociación con alcaloides quinozilidínicos (Asres *et al.*, 2004). Respecto a la aspidoalbina y obscurinervina, son alcaloides que caracterizan al género *Aspidosperma* de la familia Apocynaceae (Reina *et al.*, 2014). Estos alcaloides indolizidínicos son utilizados como hipotensores arteriales, simpaticolíticos, diuréticos, vasoconstrictores periféricos, estimulantes respiratorios, anestésicos, bloqueantes adrenérgicos, espasmogénicos intestinales, sedantes y relajantes del músculo esquelético; aunque también tienen efectos mutagénicos, de inhibición de la monoaminoxigenasa en tejido animal, del crecimiento y de la mitosis de fibroblastos cardíacos y han mostrado su efecto antiparasitario contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum* (Pereira *et al.*, 2007).

Implicaciones para el consumo de Chipilín

Aunque existe un alto consumo gastronómico de hojas de Chipilín en el estado de Tabasco (Centurión *et al.*, 2000; Jimenez Aguilar y Grusak, 2015), los estudios realizados a nivel nutricional son escasos y por ello no fue posible realizar una comparación de datos en cuanto al contenido de alcaloides presente en hojas. No obstante, se resalta que en los análisis realizados durante esta investigación, en hojas de Chipilín de cualquier estado fenológico no se identificaron compuestos tóxicos del grupo pirrol, pero si del grupo indol, lo cual requiere de otros estudios específicos para confirmar su presencia, concentración y grado de toxicidad.

La presencia de alcaloides y compuestos fenólicos puede ser uno de los factores que hacen que esta planta se utilice en la medicina tradicional (Ek-Chulim *et al.*, 2020). El consumo gastronómico de las hojas de Chipilín en Tabasco pasa previamente por un

proceso de cocción, donde tal vez estos compuestos son degradados a formas no tóxicas, lo que requiere de ser comprobado.

En México, no existen regulaciones para la concentración de alcaloides pirrolizidínicos en alimentos. En Europa, las regulaciones alemanas y holandesas indican que el consumo de preparaciones que contienen estos alcaloides debe ser limitado a su uso en un periodo corto (definido como 6 semanas) y a dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Chen *et al.*, 2019).

En contraste, en las semillas y en el estado 0 germinación se identificó al menos un alcaloide tóxico, pero al igual que indica Morton (1994) no fue detectada la presencia del alcaloide cancerígeno monocrotalina, alcaloide que se encuentra en al menos el 20 % de las especies del género *Crotalaria*. En *Crotalaria retusa*, en donde están presentes alcaloides pirrolizidínicos, se emplea el polvo de sus semillas para tratar ciertas enfermedades como la lepra, la fiebre y en el tratamiento de picaduras de serpientes (Sinan *et al.*, 2020). Lo antes mencionado nos da una pauta para indicar el no consumo de semillas de Chipilín ni del estado 0 germinación y de buscar el potencial medicinal que pueda tener la presencia de estos alcaloides, lo que sería otra forma de aprovechar el cultivo de *Crotalaria longirostrata*.

2.7 Conclusión

La ausencia de alcaloides pirrolizidínicos, en especial de monocrotalina en hojas de *Crotalaria longirostrata*, puede indicar un riesgo toxicológico bajo para el consumo de las hojas de esta verdura indígena; sin embargo, la presencia de alcaloides indolizidínicos debe de ser objeto de estudio. En contraparte, el consumo de las semillas y de germinados (estado fenológico 0 germinación) no debe estar permitido, ya que en estos estados se detectó la presencia de alcaloides pirrolizidínicos que implican toxicidad alta como la heliotridina y la senecifilina. La búsqueda del potencial bioactivo de estos metabolitos secundarios presentes tanto en hojas como en semillas pueden desembocar en nuevos productos o usos del Chipilín. La corroboración de la presencia de alcaloides tanto en hojas como en semillas es necesaria por diferentes métodos de análisis, incluyendo HPLC, a fin de determinar la inocuidad para consumo.

CAPITULO III. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS FOLIARES DE *Crotalaria longirostrata*

3.1 Resumen

La creciente necesidad de combatir a los patógenos causantes de enfermedades de los cultivos incrementa cada día, ya que causan múltiples pérdidas en cultivos como el cacao, además de ser un motivo para crear productos antimicrobianos que sean efectivos y no dañen el ambiente, a partir de compuestos bioactivos presentes en las plantas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad del extracto de compuestos fenólicos totales de hojas de diferentes estados fenológicos de Chipilín sobre *Moniliophthora roreri in vitro*. Los resultados mostraron que el crecimiento micelial de *M. roreri* es inhibido en un 30 % con extractos de muestras foliares colectadas durante la floración, utilizando una concentración de 4000 mg L⁻¹. La esporulación disminuyó hasta un 60% con extractos foliares de los estados fenológicos correspondientes a desarrollo de hojas (E1), elongación del tallo (E3), 50 y 90 % de acumulación de biomasa (E4). En resumen, los extractos foliares de *C. longirostrata* mostraron variación en efectividad sobre crecimiento micelial y esporulación de *M. roreri* dependiendo del estado fenológico en el que se encuentre la planta.

Palabras clave: estado fenológico, antifúngico, polifenoles, crecimiento micelial, esporulación

3.2 Abstract

The growing need to combat pathogens that cause crop diseases increases every day, since they cause multiple losses in crops such as cocoa, as well as being a reason to create antimicrobial products that are effective and do not harm the environment, from bioactive compounds present in plants. The objective of this research was to evaluate the activity of the extract of total phenolic compounds from leaves of different phenological stages of Chipilín on *Moniliophthora roreri in vitro*. The results showed that the mycelial growth of *M. roreri* is inhibited by 30% with extracts of foliar samples collected during flowering, using a concentration of 4000 mg L⁻¹. Sporulation decreased up to 60% with foliar extracts of the phenological stages corresponding to leaf development (E1), stem

elongation (E3), 50 and 90 % biomass accumulation (E4). In summary, the foliar extracts of *C. longirostrata* showed variation in effectiveness on mycelial growth and sporulation of *M. roreri* depending on the phenological stage of the plant.

Keywords: phenological state, antifungal, polyphenols, mycelial growth, sporulation

3.3 Introducción

La presencia de enfermedades fungosas son uno de los principales factores limitantes para la producción de cacao, responsables de grandes pérdidas en rendimiento (Phillips-Mora y Cerda, 2011). La moniliasis es una enfermedad que ataca a las plantaciones de cacao, que es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*. Este patógeno se encuentra presente en diversos países de América Latina, causando pérdidas económicas significativas para todos los productores de cacao (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Las pérdidas que causa este fitopatógeno se estiman en aproximadamente el 75 % de la producción anual. En el noreste de Colombia surgió el primer reporte, a partir de ahí se ha diseminado a otros 14 países de centro y sudamérica. En 2005, la moniliasis fue reportada en México y desde entonces es considerada la mayor amenaza para la producción de cacao (De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2020).

Esta enfermedad actúa exclusivamente en los frutos de cacao, desde etapas tempranas de desarrollo donde no es posible observar visualmente los daños (Phillips-Mora y Cerda, 2011). El ciclo de vida del agente infeccioso inicia con la aparición de polvo blanco formado por esporas sobre las mazorcas. Estas esporas se desprenden y son arrastradas por el viento, lluvia o animales, donde pueden depositarse en frutos sanos y germinar, inoculándose de manera natural a través de los estomas presentes en las mazorcas e infectar los tejidos, induciendo la formación de gibas, todo esto aún cuando se encuentra en la fase biotrófica (De la Cruz-Ricardez, 2018). Para el inicio de la fase necrotrófica, el patógeno ha invadido intercelularmente el tejido del fruto y se produce el necrosamiento de los tejidos invadidos (Evans, 1981). Los principales factores que promueven la propagación de la enfermedad en la plantación son el sombreado excesivo, la alta humedad relativa y la falta de ventilación (Phillips-Mora y Cerda, 2011). El manejo cultural ha sido empleado como una alternativa para el control del patógeno,

en donde deben realizarse actividades como la remoción seminal de frutos enfermos, antes que la mancha inicie la esporulación, mantenimiento de drenajes, poda y reducción de altura de árboles de sombra (De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2020).

Otro de los métodos de control empleados ha sido evaluar el uso del fungicida azoxistrobin para la cura de la moniliasis, así como el estudio del efecto que produce la sombra en la enfermedad (Ortíz-García *et al.*, 2015).

El incremento del daño de las enfermedades por la presencia de plagas que atacan simultáneamente a los cultivos ha sido motivo para crear nuevos antimicrobianos para eliminar estos patógenos, por tal motivo se ha impulsado el uso de compuestos bioactivos a partir de extractos de plantas, ya que el uso de productos naturales para el tratamiento de enfermedades fúngicas es una forma no contaminante para sustituir fungicidas sintéticos (Miranda-Granados *et al.*, 2018) y el cambio hacia un manejo agroecológico.

De acuerdo con García-Mateos *et al.* (2021) los mecanismos de defensa que las plantas emplean contra sus antagonistas, y detener las enfermedades y depredadores incluyen la presencia de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, los que pueden ser obtenidos por medio de extractos vegetales.

La creciente demanda de productos orgánicos ha incrementado los estudios sobre la actividad fungicida de los extractos vegetales y sus componentes, ya que los extractos vegetales que tienen propiedades fungistáticas (inhibición del desarrollo del hongo) o fungicidas (destrucción) tienen las ventajas de no generar resistencia, son biodegradables por lo que no contaminan (García-Mateos *et al.*, 2021).

Por tal motivo, conociendo que las especies de *Crotalaria* son una fuente importante de metabolitos secundarios, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de extractos de hojas de Chipilín sobre *Moniliophthora roreri in vitro*.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Obtención de la cepa Moniliophthora roreri

Las pruebas se realizaron con las cepas MRCP250121 del hongo proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Para

obtener esta cepa, el hongo se aisló de los frutos de cacao infectados en el estado de Tabasco, el aislamiento fue conservado en medio de cultivo V8 sólido a 4 °C en tubos de ensayos.

3.4.2 Obtención de extractos de compuestos fenólicos

Los extractos vegetales fueron obtenidos en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. El método de extracción se realizó de acuerdo con Stratil *et al.* (2006). 1 g de muestra de hoja previamente desengrasada con hexano en una relación 1:10 (p/v), la mezcla se agitó durante 2 h a 280 rpm a 4 °C, al término se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el precipitado libre de grasa se dejó secar. Para la extracción se pesaron 250 mg de la muestra, se agregó 1 mL de metanol al 80 % y se agitó por 1 minuto en vortex, luego fueron colocadas a baño María a 50 °C por 15 min. Al término la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min, el sobrenadante se recuperó en otro tubo y el residuo se lavó nuevamente y se agitó con 0.5 mL de metanol al 100 %, ambos sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -20 °C protegidos de la luz.

3.4.3 Preparación del medio V8

El medio de cultivo V8 empleado para la evaluación del crecimiento del hongo se preparó utilizando 300 mL de jugo comercial V8 de la marca Campbell[®], con 1.5 g de agar-agar y 4.5 g de carbonato de calcio. Primero se mezcló el jugo V8 y el carbonato de calcio, posteriormente se filtró la mezcla. El agar-agar se disolvió en 500 mL de agua destilada en agitación. Por último se agrega la mezcla de jugo V8 y carbonato de calcio al agar disuelto, se mezcla y se afora todo a 1 L con agua destilada.

*3.4.4 Efectividad de los extractos sobre el hongo *Moniliophthora roreri**

Se evaluó el efecto del extracto de compuestos fenólicos de los nueve estados fenológicos y de semillas de Chipilín sobre *M. roreri*, considerando como variables de

respuesta el crecimiento micelial y la producción de esporas. A partir de la cuantificación de polifenoles totales (PFT) en cada estado fenológico se determinó la cantidad de extracto necesaria para obtener una concentración de 4000 mg L⁻¹ en el medio de cultivo (Cuadro 15).

Cuadro 15. Contenido de polifenoles totales en hojas y semillas de *C. longirostrata* y volumen de extracto utilizado para una concentración de 4000 mg L⁻¹.

Estado fenológico	Polifenoles totales (mg g⁻¹)	Extracto (mL) tomado para una concentración de 4000 mg L⁻¹
Estado 0: germinación	87.19	1.37
Estado 1: desarrollo de hojas	30.45	3.93
Estado 2: desarrollo del tallo	33.79	3.55
Estado 3: elongación del tallo	27.56	4.35
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 10%	30.46	3.93
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 30%	33.29	3.60
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 50%	33.04	3.63
Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 90%	33.38	3.59
Estado 5: inflorescencias	32.94	3.64
Estado 6: floración	40.27	2.97
Estado 7: formación de vainas	36.02	3.33
Estado 8: maduración de vainas	41.84	2.86
Semilla	88.65	1.35

El volumen de extracto (mL) de cada estado fenológico necesario para alcanzar la concentración de 4000 mg L⁻¹ de polifenoles totales, fue depositado en matraces de Erlenmeyer de 25 mL y puestos a 70 °C para evaporar completamente el solvente. El residuo sin solvente se disolvió con agua destilada estéril al mismo volumen inicial (ESS).

El volumen de ESS de los diferentes estados fenológicos y semilla resuspendido en agua fue agregado al medio de cultivo V8 clarificado. De este medio de cultivo, agregaron 5 mL a cajas petri de 60 mm de diámetro con apoyo de una jeringa de autollenado marca Socorex ® 173, y se dejó solidificar. A partir de los cultivos de *M. roreri* de 10 días de edad se realizaron implantes de 5 mm de diámetro, los cuales fueron extraídos con un sacabocado de 5 mm. Estos implantes fueron colocados en las cajas Petri que contenían

el medio de cultivo V8 clarificado más la concentración de 4000 mg L⁻¹ del ESS. Cinco repeticiones por tratamiento fueron realizadas mas un testigo sin adición de ESS.

Las cajas Petri con el inóculo se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 11 días, periodo en el que las colonias del tratamiento testigo llenaron completamente la caja. Las mediciones de las variables de respuesta fueron tomadas cada 24 h en dos ejes ortogonales por caja Petri. La medición del crecimiento micelial se realizó utilizando un Vernier manual marca Pretul ®. Los cálculos se realizaron para conocer el área de crecimiento micelial total y se determinaron los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial por cada tratamiento (Torres de la Cruz *et al.*, 2013).

3.4.5 Efectividad sobre la esporulación

A partir de los tratamientos en las cajas Petri donde se evaluó el crecimiento micelial, se cuantificaron las esporas para determinar el efecto de cada uno de los ESS sobre la esporulación. Para ello, 5 mL de agua destilada estéril se agregaron en cada caja Petri y con una espátula de acero inoxidable estéril se realizó el raspado de las esporas y se recuperó el sobrenadante (se obtuvo una suspensión de 10⁶ esporas/mL). Para el conteo de esporas se utilizó una cámara de Neubauer y la cuantificación total se obtuvo mediante la fórmula de Lipa y Slizynski (1973).

$$C=(Cc)(4 \times 10^6)(Fd/80)$$

Donde:

C= Número de esporas mL⁻¹

Cc= Número promedio de esporas contados en la cámara de Neubauer

Fd= Factor de dilución

3.4.6 Diseño experimental y análisis de los datos

El bioensayo fue establecido como un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento empleado utilizando una caja Petri como unidad

experimental. Con los datos obtenidos durante los bioensayos de los ESS sobre las variables de respuesta evaluadas se calculó la eficiencia utilizando la fórmula de Abbot (1925) modificada.

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Valor de la variable en el testigo} - \text{Valor de la variable en el tratamiento}}{\text{Valor de la variable en el testigo}} * 100$$

Previo al análisis de varianza de los 13 tratamientos en total, los valores del porcentaje de eficiencia obtenidos se transformaron al Arco seno de la raíz cuadrada de la proporción, a fin de cumplir con la condición de normalidad de la distribución (Steel y Torre, 1985). Posteriormente se realizaron los análisis de varianza y prueba de separación de medias (Duncan, 0.05 %) por cada una de las variables, mediante el software estadístico InfoStat (2017).

3.5 Resultados

3.5.1 Efectividad de los extractos sobre el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*

La Figura 12, muestra los efectos del ESS de Chipilín en el crecimiento micelial de las colonias de *M. roreri*. El crecimiento de la colonia que corresponde al tratamiento testigo se desarrollaron con forma, tamaño y textura visiblemente normal, color crema, el centro es color café claro a salmón, mostrando esporulación correcta *in vitro* (Evans, 1981).

Lo anterior permite deducir que las condiciones fueron adecuadas para llevar a cabo el estudio. La mayor reducción en el tamaño de colonia se observa en el estado 3, 5 y 6.

En el Cuadro 16 y Figura 13, se presenta el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del ESS de cada estado fenológico de Chipilín evaluado a una concentración de 4000 mg L⁻¹. Los resultados que indican que el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (30.28 %) se obtiene al aplicar el ESS del estado fenológico 6 correspondiente a la floración, seguido del estado 3: desarrollo de nudos con 28.9 %. Los ESS de los estados fenológicos 2, 4, 5 y 8 mostraron inhibiciones de 4.12 a 18.31 % sin diferencias estadísticas, y los ESS de los estados 0, 1, y semilla no mostraron inhibición sobre el hongo *M. roreri* a la concentración evaluada.



Figura 12. Crecimiento micelial de *M. royeri* sobre el extracto de *C. longirostrata* en concentración de 4000 mg L⁻¹ de nueve estados fenológicos evaluados.

Cuadro 16. Eficiencia de inhibición (%) sobre el crecimiento micelial y esporulación de *M. royeri*.

Tratamiento	Estado fenológico	Eficiencia de inhibición (%) a los 11 días después de inoculación	
		Crecimiento micelial	Esporulación
1	Estado 0: germinación	0 ^c	0 ^d
2	Estado 1: desarrollo de hojas	0 ^c	59.87 ^a
3	Estado 2: desarrollo del tallo	4.12 ^{bc}	17.66 ^{bcd}
4	Estado 3: elongación del tallo	28.97 ^{ab}	65.77 ^a
5	Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 10 %	7.01 ^{abc}	10.96 ^{bcd}
6	Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 30 %	7.63 ^{abc}	40.13 ^{ab}
7	Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 50 %	10.5 ^{abc}	62.06 ^a
8	Estado 4: desarrollo de partes vegetativas 90 %	3.18 ^c	58.68 ^a
9	Estado 5: inflorescencias	18.31 ^{abc}	19.81 ^{bcd}
10	Estado 6: floración	30.28 ^a	25.97 ^{abc}
11	Estado 7: formación de vainas	5.81 ^{abc}	0 ^d
12	Estado 8: maduración de vainas	7.81 ^{abc}	1.9 ^{cd}
13	Semilla	0 ^c	16.15 ^{bcd}

Los resultados obtenidos permiten señalar que el efecto inhibitorio del ESS de los estados fenológicos de Chipilín en la producción de crecimiento micelial de *M. roreri* tiene un bajo rendimiento en la concentración de 4000 mg L⁻¹.

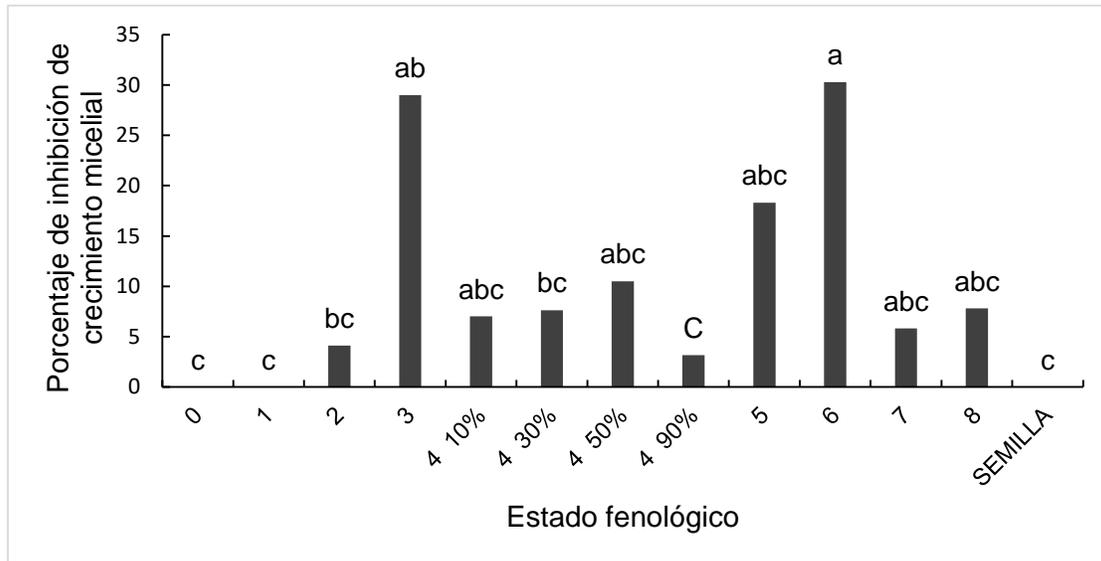


Figura 13. Efectividad *in vitro* de los extractos obtenidos de los nueve estados fenológicos evaluados de *Crotalaria longirostrata* sobre *M. roreri*. Barras con letra diferente son significativamente diferentes (Duncan $p \leq 0.05$)

3.5.2 Efectividad sobre la esporulación

La eficiencia de los ESS de Chipilín sobre la reducción de producción de esporas de *M. roreri* se presenta en la Figura 14. La concentración de 4000 mg L⁻¹ del ESS mostró un porcentaje de efectividad de 60 a 65 % en los estados de desarrollo fenológico 1: desarrollo de hojas, 3: elongación del tallo y 4: desarrollo de partes vegetativas cosechables (50 y 90 % de acumulación de biomasa). Los ESS de los estados 2, 5, 6 y semilla no mostraron diferencias significativas entre los mismos y alcanzaron de 17 a 25 % de efectividad en la reducción de producción de esporas. Los ESS de los estados 0, 7 y 8 no mostraron efectos sobre la producción de esporas de *M. roreri* y se observaron resultados similares con referencia al tratamiento testigo.

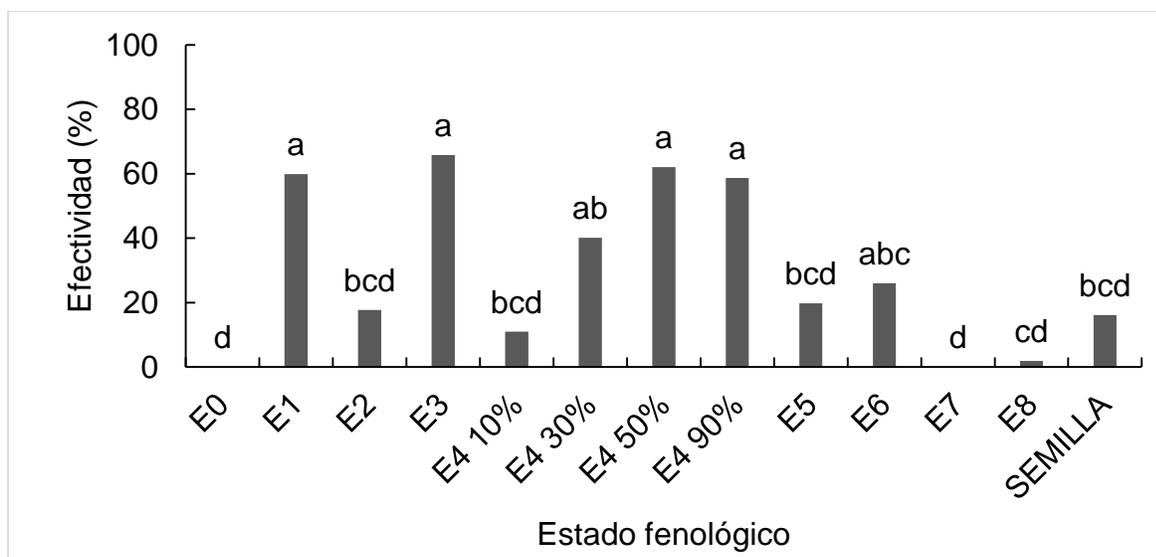


Figura 14. Efectividad en la producción de esporas de *M. roreri* con la concentración de 4000 mg L⁻¹ del extracto de *C. longirostrata*. Medias con letra común no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$)

3.6 Discusión

Efectividad sobre el crecimiento micelial hongo Moniliophthora roreri

La aplicación de extractos foliares de *C. longirostrata* en concentración de 4000 mg L⁻¹ aporta información que indica que el conocer las etapas de desarrollo en que se encuentra la planta en el momento de la extracción de metabolitos es crucial para su adecuado uso. Los extractos foliares obtenidos de nueve estados fenológicos de Chipilín mostraron diferencias significativas en porcentajes de eficiencia de inhibición de crecimiento micelial y en la esporulación de *M. roreri* de acuerdo a la edad de la planta.

El mayor efecto en crecimiento micelial *in vitro* (30.28 %) se presentó usando el extracto del estado de desarrollo 6 correspondiente a la floración, el cual presentó una concentración de polifenoles totales de 40.27 mg g⁻¹. La variación observada en efectividad de los extractos no parece estar asociada a la concentración de polifenoles, ya que la semilla que presentó la mayor concentración de estos compuestos no mostró efecto inhibitorio. El efecto podría ser atribuido a la composición de compuestos fenólicos presente en los extractos, los cuales puede variar con el desarrollo fenológico de una planta (Maina *et al.*, 2021). Además, este conjunto de compuestos fenólicos presentes

en el extracto crudo parece tener una ventaja sinérgica o de interacciones aditivas, ya que se ha observado que al aplicar separadamente compuestos fenólicos de Chipilín se traduce en una pérdida de actividad antifúngica (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020).

Este es el primer reporte de empleo de extractos foliares de *C. longirostrata* contra *M. roleri*. Se han realizado estudios que indican que los extractos foliares de Chipilín han mostrado inhibición del 25 a 40 % del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del agave como *Fusarium oxysporum* A. comiteca, *Fusarium oxysporum*, *A. tequilana*, y *Fusarium solani*, pero utilizando concentraciones mucho más elevadas (200 mg mL⁻¹) (Miranda-Granados *et al.*, 2018) que las usadas en nuestro estudio contra *M. roleri* (4.0 mg mL⁻¹). Ensayos *in vivo* utilizando los extractos foliares de *C. longirostrata* también mostraron reducción en la incidencia de la enfermedad causada por el hongo *Fusarium verticillioides* de 70.4 % a 40.1 %, empleando una concentración de 20 mg mL⁻¹ (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020).

El encontrar inhibiciones antifúngicas usando concentraciones bajas de extractos vegetales de especies nativas *in vitro* tendría la ventaja de la factibilidad de aplicación en campo (*in vivo*). Con especies nativas de *Capsicum*, también se ha observado que concentraciones bajas (1.0 y 2.5 mg mL⁻¹) de extractos frutales muestran una alta inhibición del hongo *M. roleri* (De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2020).

Efectividad sobre la esporulación

Los extractos foliares de los estados fenológicos 1, 3 y 4 correspondientes al desarrollo de hojas, elongación del tallo, y desarrollo de partes vegetativas cosechables, respectivamente, mostraron una inhibición del crecimiento del hongo *M. roleri* fungistática (60 a 65 %). Datos de inhibición de esporulación de extractos crudos de *C. longirostrata* en *Fusarium* sp. y *F. verticillioides* van de 60 a 71 %, y sobre *A. flavus* de 90 % (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017). No existen datos de efectividad sobre la esporulación de *M. roleri* usando extractos de *C. longirostrata*. En otras especies, como las especies nativas de *Capsicum*, el empleo de sus extractos vegetales ha logrado la inhibición de la esporulación del hongo *M. roleri* con un 100 % de efectividad (De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2020).

3.7 Conclusión

Los extractos foliares de *C. longirostrata* mostraron variación en su efectividad contra el crecimiento micelial y esporulación de *M. roreri*, dependiendo del estado fenológico de la planta. El extracto que presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (30.28 %) de este hongo fue el de hojas colectadas durante la floración de la planta. En cuanto a la esporulación de 65 % se obtuvo con el tratamiento correspondiente al estado fenológico 3: elongación de la planta. Estos resultados constituyen una aportación valiosa para continuar los estudios sobre esta especie probando concentraciones mas altas en busca mayor inhibición del hongo *M. roreri* u otros hongos fitopatógenos que atacan al cultivo del cacao y otros cultivos establecidos en el trópico húmedo mexicano.

DISCUSIÓN GENERAL

El Capítulo I nos mostró que el Chipilín es una planta con ciclo de desarrollo fenológico largo, con un periodo de ocho meses desde su siembra hasta el primer ciclo de maduración de vainas. Después de este primer ciclo se presentan ciclos consecutivos de floración y maduración de vainas.

El periodo de crecimiento más prolongado es de 73 días correspondiente al estado 4 desarrollo de partes vegetativas cosechables, el cual se presenta durante el primer ciclo del cultivo. Esto es importante porque durante este estado, el desarrollo del área foliar es mayor disminuyendo durante las etapas de floración y maduración de vainas, y las hojas son la parte comestible de esta planta, y hay que buscar alternativas para promover y mantener el desarrollo foliar. Aunado a esto, el estado fenológico 4 con 50 % de acumulación de biomasa, presenta contenidos de proteína foliar de 27.07 %, valores altos de macro y microelementos, de ácidos fenólicos y en este estado no se detectaron alcaloides pirrolizidínicos ni indolizidínicos.

La dificultad práctica reside en determinar este estado fenológico durante el desarrollo de un cultivo de Chipilín. Por lo tanto, tal vez la estrategia de cortes sucesivos al follaje (Pardo-Aguilar *et al.*, 2020) podría ser una alternativa para promover el desarrollo foliar conservando las características nutricionales. Los contenidos de proteína, polifenoles totales y flavonoides cuantificados en este estudio fue mayor durante la germinación y en semillas, en referencia a lo mostrado por Jiménez-Aguilar y Grusak (2015).

Otro aspecto que afecta la producción foliar es que los tallos en Chipilín representan una alta proporción de la biomasa total. En el estado 4 es de 65.7 % de la biomasa total y a maduración de vainas alcanza el 75.2 %. Lo anterior concuerda con estudios presentados por Ramon-Lopez *et al.* (2020) en plantas de hasta 110 días de edad expuestas a 100 % de radiación solar.

Respecto a la composición mineral de hojas se determinó que existen variaciones según el estado fenológico. El estado principal 0: germinación y estado 1 y 3 mostraron las más altas concentraciones de macroelementos y microelementos. En especial el estado 0 donde altas concentraciones de microelementos podrían ser tóxicas para su

consumo. Y los contenidos son más altos en Fe y Cu que los presentados por Cáceres *et al.* (2019) en plantas completas y seca de *C. longirostrata* de Guatemala.

Esta variación en los contenidos dependiendo del sitio, pueden deberse al contenido nutrimental que presenten los suelos donde se establece el Chipilín, ya que de acuerdo a White y Brown (2010), la concentración de minerales en la planta depende del tipo de suelo donde se encuentra. Por lo que será necesario conocer la variación en contenidos nutrimentales del Chipilín cuando se establece en diferentes tipos de suelos.

El Capítulo II, demostró que de acuerdo con las condiciones de este estudio; el alcaloide monocrotalina no está presente en hojas y semillas de Chipilín, que las semillas y germinados de Chipilín (estado principal 0 germinación) no deben de ser consumidas porque contienen otros alcaloides pirrolizídínicos como heliotridina y senecifilina que son tóxicos.

La nula presencia de monocrotalina en semillas concuerda con lo reportado por Williams y Molyneux (1987). En hojas para todos los estados fenológicos evaluados con excepción del estado 4 con 50 % de acumulación de biomasa se detecta la presencia de alcaloides del grupo indol. Por lo que estudios específicos de toxicidad de extractos alcaloideos a partir de hojas durante el desarrollo foliar deben de realizarse, para determinar la inocuidad de su consumo.

Y el Capítulo III, demostró el potencial biológico de los metabolitos secundarios presentes en Chipilín. El extracto foliar de Chipilín por su riqueza en compuestos fenólicos presenta actividad antifúngica, y esta actividad varía según la etapa fenológica de la planta.

Los extractos obtenidos de los estados 3 (elongación del tallo) y 6 (floración) de la planta fueron los que presentaron un 30 % de inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri* con una concentración de 4.0 mg mL⁻¹ de compuestos fenólicos totales en el medio de cultivo.

Incrementando la concentración de compuestos fenólicos en el medio de cultivo se podría tal vez alcanzar mayores porcentajes de inhibición de este hongo. Dado que se ha observado inhibición de crecimiento micelial hasta del 70 % usando extractos metanólicos de *C. longirostrata* contra el hongo fitopatógeno del maíz *Aspergillus*

verticillioides, con una concentración más alta, de 20 mg mL⁻¹ en tratamiento *in vivo* (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES GENERALES

El Chipilín presenta un ciclo fenológico largo (ocho meses para primera floración), que requiere de la elongación y engrosamiento del tallo principal para iniciar ramificaciones secundarias y floración. Para el rendimiento de biomasa, el tallo presenta la mayor acumulación, seguido de las hojas y raíces.

Los estados de desarrollo fenológico del 1 al 4 son los que presentan mayor contenido proteico y adecuadas de macro y micronutrientes. Las concentraciones más altas de proteína, macro y micronutrientes, polifenoles totales y flavonoides se encuentran en el estado de germinación (estado principal 0) y en semilla.

La presencia de monocrotalina no fue identificada en semillas y hojas en los estados de desarrollo fenológicos evaluados, sin embargo, se identificaron alcaloides pirrolizídnicos en el estado principal 0 de germinación y en semilla como la heliotridina y la senecifilina, los cuales implican riesgos de toxicidad. En hojas se detectaron ácidos fenólicos como el ácido ftálico di(octyl) ester, el ftalato de metilo-2-hetilhexilo, el ácido heptadecanoico-16-metil-ester y los alcaloides indolizídnicos obscurinervidina 6,7-dihidro y aspidoalbina.

La evaluación de la actividad antifúngica demostró que es vital conocer la etapa de desarrollo de la planta para poder obtener mejores resultados, los efectos en cuanto a la reducción de crecimiento micelial fueron de 30 % utilizando los extractos foliares del estado principal 6 (floración), seguido del 28 % con los extractos foliares del estado de elongación del tallo (3). La esporulación fue inhibida en un 60 % con extractos del estado 3. Todo esto con una concentración de compuestos fenólicos totales en el medio de cultivo de 4000 mg L⁻¹.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 256-267.
- Acevedo, G.F., Huerta, O.E., Alonso, S.L., Sol Ortiz, G.S., 2009. La bioseguridad en México y los organismos genéticamente modificados: cómo enfrentar un nuevo desafío, en *Capital natural de México*, vol. II : Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 319-353.
- Álvarez-Parrilla, E., De La Rosa L. A., Amarowicz R., Shahidi F., 2011. Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *J. Agr. Food Chem.* 59, 163–173. <https://doi.org/10.1021/jf103434u>.
- Asres, K., F. Sporer, and M. Wink. 2004. Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 915–930. www.elsevier.com/locate/biochemsyseco.
- Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola, A., 2014. Chapter 11 - Bioactive Components from Leaf Vegetable Products. *Studies in Natural Products Chemistry* 41, 321-346.
- Barbosa, I.R., Silva, S.R., Mauad, M., Rodrigo Arroyo, G.R., 2020. Dry matter production and nitrogen, phosphorus and potassium uptake in *Crotalaria juncea* and *Crotalaria spectabilis*. *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia 50, e61011.
- Cáceres, A., Martínez-Arévalo, V., Mérida-Reyes, M.S., Sacbajá, A., López, A., Cruz, S.M., 2019. Contenido de oligoelementos y factores antinutricionales de hojas comestibles nativas de Mesoamérica. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 6(2). ISSN: 2410-6356 (electrónico) / 2409-3459 (impreso).
- Cavalcante, A.G., Lemos, L.B., Meirelles, F.C., Cavalcante, A.C.P., de Aquino, L.A., 2020. Thermal sum and phenological descriptions of growth stages of the common bean according to the BBCH scale. *Ann Appl Biol.* 176, 342–349.
- Camarillo-Castillo, F., Mangan, F.X.. 2020. Biological nitrogen fixation in chipilin (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), a sustainable nitrogen source for commercial production. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 26(2), 125-141. doi: 10.5154/r.rchsh.2020.01.002
- Castro-Lara. D., Basurto, P.F., Mera O.L.M., Bye, B.R.A., 2011. Los quelites, tradición milenaria en México. Universidad Autónoma Chapingo, México. 36 p. ISBN: 978-607-12-0202-4.
- Centurión, D.H., Espinoza, M.J., Cazares, C.J.G., 2000. Catálogo de plantas de uso alimentario tradicional en la región sierra del estado de Tabasco. Fundación Produce Tabasco A.C. Villahermosa, Tabasco, pp 21.

- Chen, L., Mulder, P.P.J., Peijnenburg, A., Rietjens, I.M.C.M., 2019. Risk assessment of intake of pyrrolizidine alkaloids from herbal teas and medicines following realistic exposure scenarios. *Food and Chemical Toxicology* 130, 142-153.
- Cornelio, P.B.A., 2016. Concentración de proteína y alcaloides totales en *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., durante su crecimiento. Tesis Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, UPCH, H. Cárdenas, Tabasco, México. 50 pág.
- Cruz-Rodríguez, R.I., Meza-Gordillo, R., Rodríguez-Mendiola, M.A., Arias-Castro, C., Mancilla-Margalli, N.A., Ávila-Miranda, M.E., Culebro-Ricaldi, J.M., Gutiérrez-Miceli, F.A., Ruiz-Valdiviezo, V.M., Ayora-Talavera, T. del R., 2017. Antifungal activity of *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. extracts against phytopathogen fungi from maize. *Gayana Bot.* 74, 167-175.
- Cruz-Rodríguez, R.I., Cruz-Salomón, A., Ruiz-Lau, N., Pérez-Villatoro, J.I., Esquinca-Avilés, H.A., Meza-Gordillo, R., 2020. Potential Application of *Crotalaria longirostrata* branch extract to reduce the severity of disease caused by *Fusarium*. *Agronomy-Basel* 10, 524; doi:10.3390/agronomy10040524.
- Daimon, H., 2006. Traits of the genus *Crotalaria* used as a green manure legume on sustainable cropping systems. *JARQ* 40(4), 299-305.
- De la Cruz, R.D., 2018. Efecto *in vitro* del extracto metanólico de especies de *capsicum* sobre *Moniliophthora roreri* y su caracterización química. Tesis Maestría en Ciencias. CP-Campus Tabasco. Programa Producción Agroalimentaria en el Trópico. H. Cárdenas, Tabasco, México. 105 p.
- De la Cruz-Ricardez, D., Ortiz-García, C.F., Lagunes-Espinoza, L.C., Torres-de la Cruz, M., 2020. Efecto antifúngico *in vitro* de extractos metanólicos de *Capsicum* spp. en *Moniliophthora roreri*. *Agrociencia* 54: 813-824.
- Dominguez, X., A., 1988. Métodos de investigación fitoquímica. Cuarta reimpresión. Ed. Limusa, Mexico. 281 pp.
- Dun, E.A., Ferguson, B.J., Beveridge, C.A., 2006. Apical Dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiology* 142, 812-819.
- Dusemund, B., Nowak, N., Sommerfeld, C., Lindtner, O., Schäfer, B., Lampen, A., 2018. Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food and Chemical Toxicology* 115, 63–72.
- Elika., 2013. Sustancias indeseables/ alimentación animal. Alcaloides pirrolizidínicos. Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. 1-6. <https://seguridadalimentaria.elika.eus/>.

- Ek-Chulim, A.R., Ventura-Canseco, L.M.C., Álvarez-Gutiérrez, P.E., Gutiérrez-Miceli, F. A., M. Abud-Archila., 2018. Pan vegano adicionado con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y harina de *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* y *Moringa oleífera*. Agroproductividad 11, 121-127.
- Enriquez-Hidalgo, D., Cruz, T., Teixeira, D.L., Steinfert, U., 2020. Phenological stages of Mediterranean forage legumes, based on the BBCH scale. Ann Appl Biol. 2020;176:357–368.
- Erb, M., Kliebenstein, D.J., 2020. Plant Secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: The blurred functional Trichotomy. Plant Physiology 184, 39–52.
- Evans, H.C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. Phytopathological Papers 24: 44.
- Fletcher, M.T., Ross, A.M., Blaney, B.J., Reichmann, K.G., 2009. Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* taxa from Northern Australia: Risk to grazing livestock. J. Agric. Food Chem. 57, 311–319.
- Flores, A.S., Tozzi, G de A.M.A., Trigo, R.J., 2009. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: chemotaxonomic significance. Biochemical Systematics and Ecology 37, 459-469.
- García-Mateos, M. R., Acosta-Ramos, M., Rodríguez-Pérez, E., Vásquez-Sánchez, J., & Hernández-Ramos, L., 2021. Extractos vegetales para el control de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*, en periodo de floración y poscosecha del fruto de *Carica papaya*. Polibotánica (51), 213-228. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.14>.
- Garduza-Acosta, B., Lagunes-Espinoza, L.C., Bautista-Muñoz, C.C., García-de-los-Santos, G., Zaldívar-Cruz, J.M., Hernández-Flores, A., 2020. Germination of *Crotalaria* and *Lupinus* (Fabaceae) seeds submitted to different pre-germination treatments and their effect on enzymatic activity during early germination. Brazilian Journal of Biology 80(1), 23-29. doi.org/10.1590/1519-6984.185813.
- Gardner, D.R., Thorne, M.S., Molyneux, R.J., Pfister, J.A., Seawright, A.A., 2006. Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. Biochemical systematics and ecology 34(10), 736-744.
- Glück, J., Waizenegger, J., Braeuning, A., Hessel-Pras, S., 2021. Pyrrolizidine Alkaloids Induce Cell Death in Human HepaRG Cells in a Structure-Dependent Manner. Int. J. Mol. Sci. 22, 202. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22010202>.
- Gómez-Sosa, E., 2000. Las especies argentinas de *Crotalaria* (Leguminosae-Crotalarieae): novedades, descripciones y clave. Gayana Botánica 57(1), 67-87.

- González-Esquinca, A.R., de-la-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Riley-Saldaña, A.A., 2016. Phenological strategies of *Annona* species from the tropical deciduous forest of Chiapas, Mexico. *Botanical Sciences* 94 (3), 531-541.
- Guerra-Centeno, D., Valdez-Sandoval, J.C., Villatoro, F., Rodenas, M., Fuentes-Rousselin, H., Díaz, M., Ríos, L., 2016. Crecimiento de la cría de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) utilizando hojas de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) como sustituto parcial del alimento balanceado. *REDVET Rev. Electrón. Vet.* 17, 1-12. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101016.html>.
- Hess, M., Barralis, G., Bleiholder, H., Buhr, L., Eggers, T.H., Hack, H., Stauss, R., 1997. Use of extended BBCH scale - general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research* 37, 433-441.
- Huang, L., Zhu, X., Zhou, S., Cheng, Z., Shi, K., Zhang, C., Shao, H., 2021. Phthalic acid esters: natural sources and biological activities. *Toxins* 13(7), 495. <https://doi.org/10.3390/toxins13070495>.
- Idowu, A.t., Olatunde, O.O., Adekoya, A.E., Idowu, S., 2020. Germination: an alternative source to promote phytonutrients in edible seeds. *Food Quality and Safety* 4, 129-133. doi:10.1093/fqsafe/fyz043.
- Jiménez-Aguilar, D.M., Grusak, M.A., 2015. Evaluation of minerals, phytochemical compounds and antioxidant activity of Mexican, Central American, and African green leafy vegetables. *Plant Foods Hum Nutr* 70, 357–364.
- Le Roux, M.M., Boatwright, J.S., van Wyk, B.-E., 2013. A global infrageneric classification system for the genus *Crotalaria* (leguminosae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon* 65(2), 957-971. <http://dx.doi.org/10.12705/625.1>.
- Lipa, J. J., y K. Slizynsky. 1973. Wskazówki metodyczne I terminología dowyznaczenia snedniej dawki swiertelnej (LD50) W Patologii Owadow i toksykologii. *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roslin* 15: 59-83.
- Maina, S., Ryu, D.H., Bakari, G., Misinzo, G., Nho, Ch.W., Kim, H-Y., 2021. Variation in phenolic compounds and antioxidant activity of various organs of African cabbage (*Cleome gynandra* L.) accessions at different growth stages. *Antioxidants* 10, 1952. <https://doi.org/10.3390/antiox10121952>.
- Maphosa, I., Jideani, V.A., 2017. The role of legumes in human nutrition. In: *Functional foods*. Chávarri, H.M. (ed). Intechopen, United kingdom. DOI: 10.5772/intechopen.69127

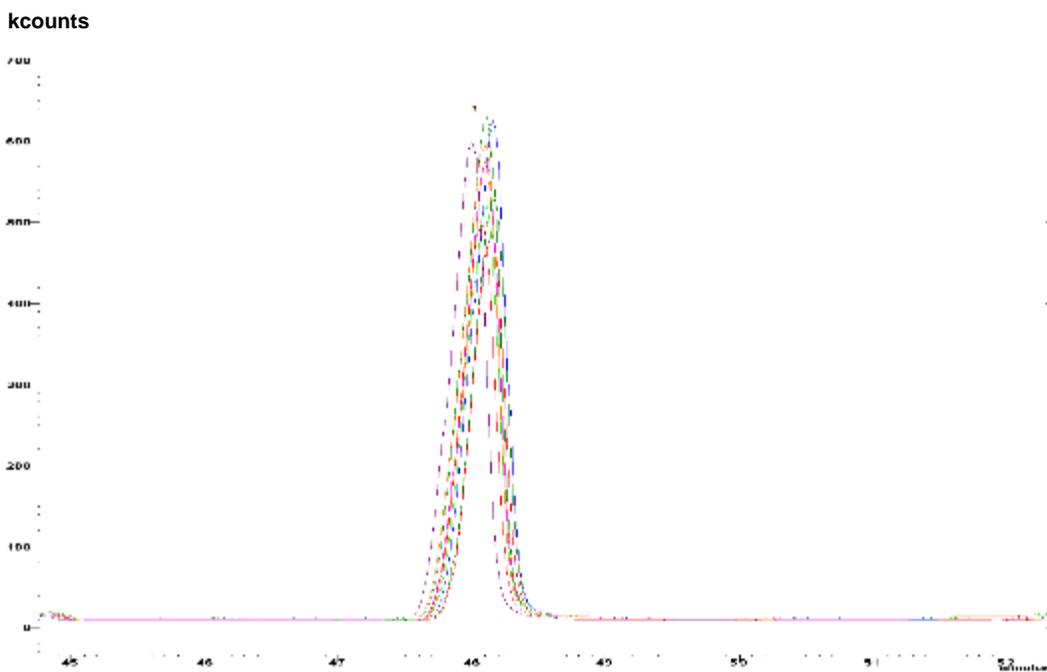
- Martínez, M.A.B., 2012. Hierba mora, chipilín, jícama y bledo para alimentarse con calidad y economía. Editorial universitaria. Universidad de San Carlos, Guatemala. 107 p.
- Mattocks, A.R., 1967a. Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin layer chromatography. *Journal of Chromatography*. 27, 505-508.
- Mattocks, A.R., Culvenor, C.C.J., Tandon, H.J., Prost, A., 1988b. IPCS:Criteria 80. Environmental health criteria for pyrrolizidine alkaloids, World Health Organization, Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm>
- Mattocks, A.R.. 1971c. The occurrence and analysis of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides. *Xenobiotica*. 1, 451-453.
- Menichini, F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M. R., Conforti F., Statti G., De Cindio B., Houghton P. J., Menichini F., 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chem.* 114, 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.086>.
- Miller, R. H., 1967. *Crotalaria* seed morphology, anatomy and identification. Technical Bulletin No. 1373. Agriculture Research Service, United States, Department of Agriculture. Washington D.C., USA.
- Miranda-Granados, J., Chacón, C., Ruiz-Lau, N., Vargas-Díaz, M.E., Zepeda, L.G., Alvarez-Gutiérrez P., Meza-Gordillo R., Lagunas-Rivera, S., 2018. Alternative use of extracts of Chipilín leaves (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) as antimicrobial. *Sustainability* 10, 883. Doi:10.3390/su10030883.
- Moreira, R., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., 2018. Pyrrolizidine alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. *International Journal of Molecules Sciences* 19:1668. Doi:10.3390/ijms19061668.
- Morton, J.F., 1994. Pito (*Erythrina berteroana*) and chipilín (*Crotalaria longirostrata*), (Fabaceae) two soporific vegetables of Central America. *Econ Bot* 48,130–138.
- Munger, P., Bleiholder, H., Hack, H., Hess, M., Stauss, R., van den Boom, T., Weber, E., 1997. Phenological growth stages of the soybean plant (*Glycine max* L. MERR.): Codification and description according to the BBCH scale. *J. Agronomy & Crop Science* 179, 209-217.
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., Bewley, J. D., 2010. Germination—Still a mystery. *Plant Science* 179, 574–581. doi:10.1016/j.plantsci.2010.02.010.

- Olmedilla Alonso, B., Farré Rovira, R., Asensio Vegas, C., Martín Pedrosa, M., 2010. Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética* 14, 72–76.
- Ortíz-García, C. F., M. Torres-De la Cruz y S. C. Hernández-Mateo. 2015. Comparación de dos sistemas de manejo del cultivo del cacao, en presencia de *Moniliophthora roreri*, en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38: 191-196.
- Panda, S. K., Das D., Tripathy N. K., 2015. Screening of antidiabetic activity of leaf extracts of *Crotalaria pallida* in alloxan induced diabetic rats. *Der Pharmacia Sinica*, 6, 41-44.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.-I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278.
- Pardo, A.N., 2019. Capacidad de rebrote, producción de área foliar y calidad nutritiva de dos especies del género *Crotalaria*. Tesis Maestría en Ciencias. CP-Campus Tabasco. Programa Producción Agroalimentaria en el Trópico. H. Cárdenas, Tabasco, México. 82 p.
- Pardo-Aguilar, N., Lagunes-Espinoza, L.C., Salgado-García, S., Hernández-Nataren, E., Bolaños-Aguilar, E.D. 2020. Chipilín (*C. longirostrata* Hook. and Arn.) Capacity for regrowth and leaf area production in response to Nitrogen and Phosphorus fertilizer application. *Legume Research* 44(4), 446-451.
- Peñaloza, A G.C., Pelaéz, J.C.A., 2008. Evaluación de la actividad biológica de extractos de *Crotalaria Juncea* mediante el modelo *Drosophila melanogaster*. *Vitae*, 15, 279-284.
- Phillips-Mora y Cerda B. R., 2011. *Catálogo: enfermedades del cacao*. 1ra edición. 24 pp.
- Phillips-Mora, W., and M. Wilkinson M. 2007. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97: 1644-1647. *Phytopathological Papers* 24: 44.
- Ponce-Díaz, P., Zuart-Macías J.L., 2013. Chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook & Arn.). pp. 212-214. En: *La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Gobierno del Estado de Chiapas, México.
- Ramón-López, V.E., Castillo-Álvarez, M., Almaguer-Vargas, G., Gaona-Ponce, M., Sánchez-Sánchez, C., 2020. Chipilín biomass production of *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn under different formulations of fertilization and solar radiation levels. *AGROFOR International Journal* 5(3), 132-140.

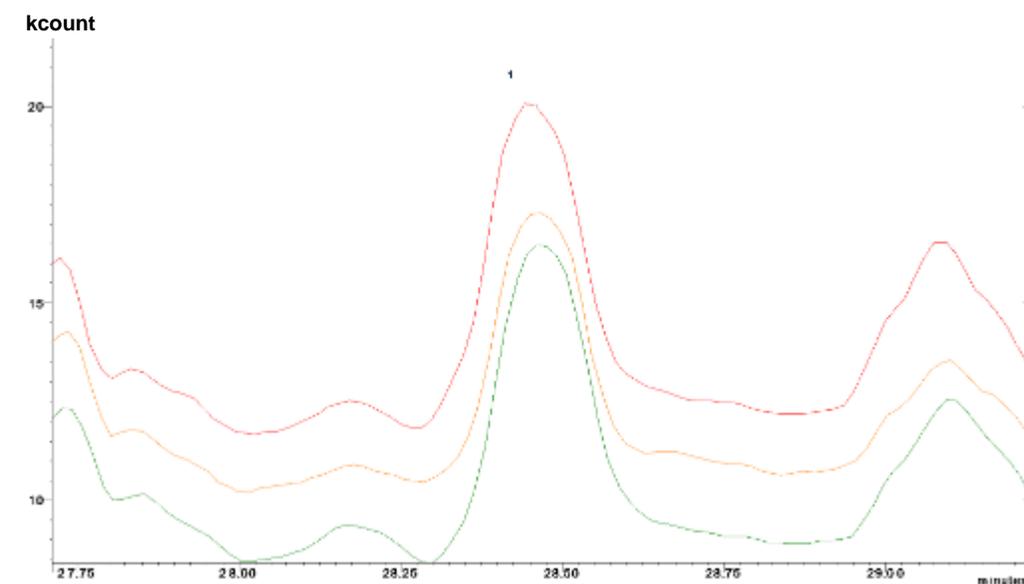
- Rojas-Garbanzo, C., Pérez, A.M., 2019, Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados. Capítulo 4: Cas. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 23 p. <http://alimentos-autoctonos.fabro.com.mx/>
- Romero, A.E, Olives, A.I., Martín, L., Martín M.A., Del Castillo, B., Agnese, A.M., Ortega, M.G., Nuñez-Montoya, S., Cabrera, J.L., 2002. Estudio del efecto solvatocrómico en derivados fenólicos naturales. *Ars Pharmaceutica*, 43(1-2), 57-71.
- Rubio, C., González, W.D., Martín-Izquierdo, R.E., Revert, C., Rodríguez, I., Hardisson, A., 2007. El zinc: oligoelemento esencial. *Nutr. Hosp.* 22(1), 101-107.
- Santiago-Saenz, Y.O., Hernández-Fuentes, A.D., López-Palestina, C.U., Garrido-Cauich, J.H., Alatorre-Cruz, J.Ma., Monroy-Torres, R., 2019. Importancia nutricional y actividad biológica de los compuestos bioactivos de quelites consumidos en México. *Rev Chil Nutr.* 46, 593-605.
- Schoental, R., 1955. Palatability of N-Oxides of Pyrrolizidine Alkaloids as a Factor in Senecio Poisoning. *Nature* 4457, 595.
- Sinan, K.I., Saftic, L., Persuric, Z., Kraljevic, P.S., Etienne, O.K., Picot-Allain, M.C.N., Mahomoodally, M.F., Gokhan Zengin, G., 2020. A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *Crotalaria retusa* L. stem barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols. *South African Journal of Botany* 128, 1-8.
- Singh, N., Mahmood, U., Kaul, V.K., Jirovetz, L., 2006. A new phthalic acid ester from *Ajuga bracteosa*. *Natural Product Research* 20(6), 593–597.
- SMN, 2021. Consultado en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>.
- Steel, G. D. R, y J. H. Torre. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. McGraw-Hill. Bogotá, Colombia. 613 p.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kubáň, V., 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *Agric. Food Chem.* 54(3), 607-616.
- Tarasevičienė, Ž., Viršilėb, A., Danilčenko, H., Duchovskisa, P., Paulauskienė, A., Gajewskic, M., 2019. Effects of germination time on the antioxidant properties of edible seeds. *CyTA - Journal of Food* 17(1), 447-454.
- Torres-De la Cruz, M., C. F. Ortíz-García, D. Téliz-Ortíz, A. Mora-Aguilera, y C. Nava Díaz. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de

- la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). Revista Mexicana de Fitopatología 31: 65-69.
- Vallejo-Rosero, Y., Barrios-Correa, L., Anaya-Gil, J., 2021. La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. Revista de Química 35(2), 19-25. <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/23788>.
- Weller, J. L., Ortega, R., 2015. Genetic control of flowering time in legumes. Frontiers in Plant Sciences 6, article 207. doi: 10.3389/fpls.2015.00207.
- White, P. J., Brown, P. H. , 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. Annals of Botany 105: 1073–1080.
- Williams, M.C., Molyneux, R.J., 1987. Occurrence, concentration, and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. Weed Science 35, 476-481.
- Wilson, D.W., Segall, H.P., Pan, L.C., Lame, M.W., Estep, J.E., Morin, D., 1992. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity, *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 307-325. DOI: [10.3109/10408449209146311](https://doi.org/10.3109/10408449209146311)
- Witte, L., Rubiolo, P., Bicchi, C., Hartmann, T., 1993. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochemistry 32(1), 187-196.
- Yaber G.M.A., Ciancia, M., Leicach, S.R., 2009. Variación en la producción de alcaloides en inflorescencias de *Senecio grisebachii* por deficiencia de nutrientes. CI. Suelo (Argentina) 27(1), 31-39.

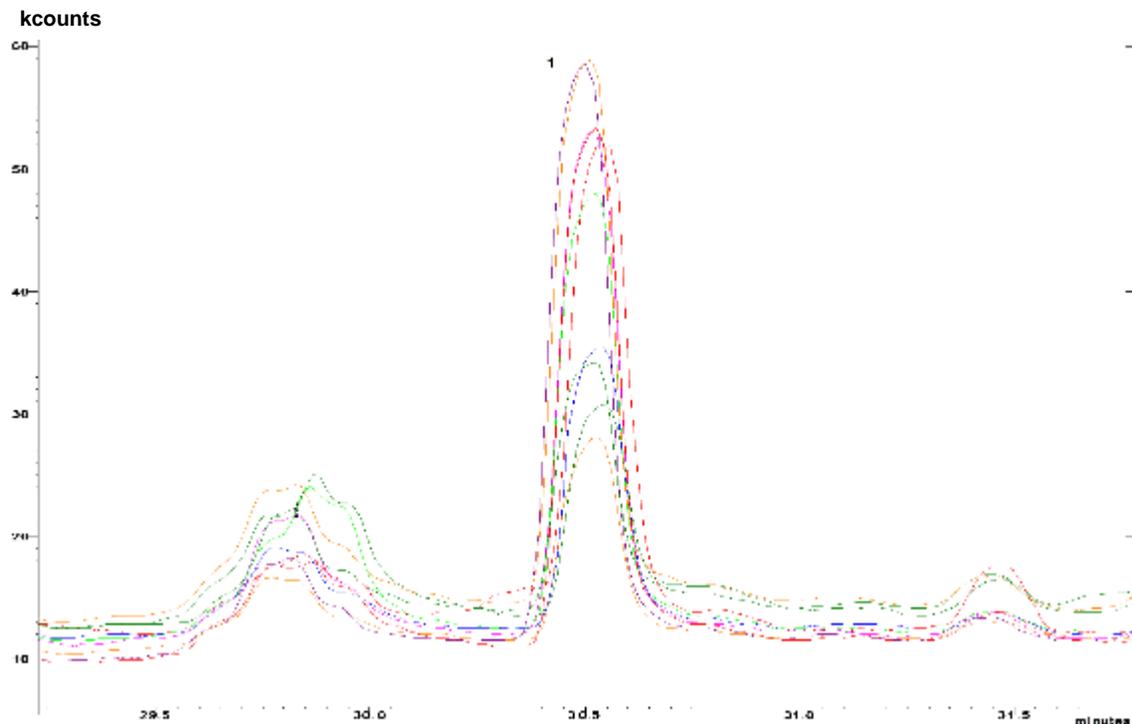
ANEXOS



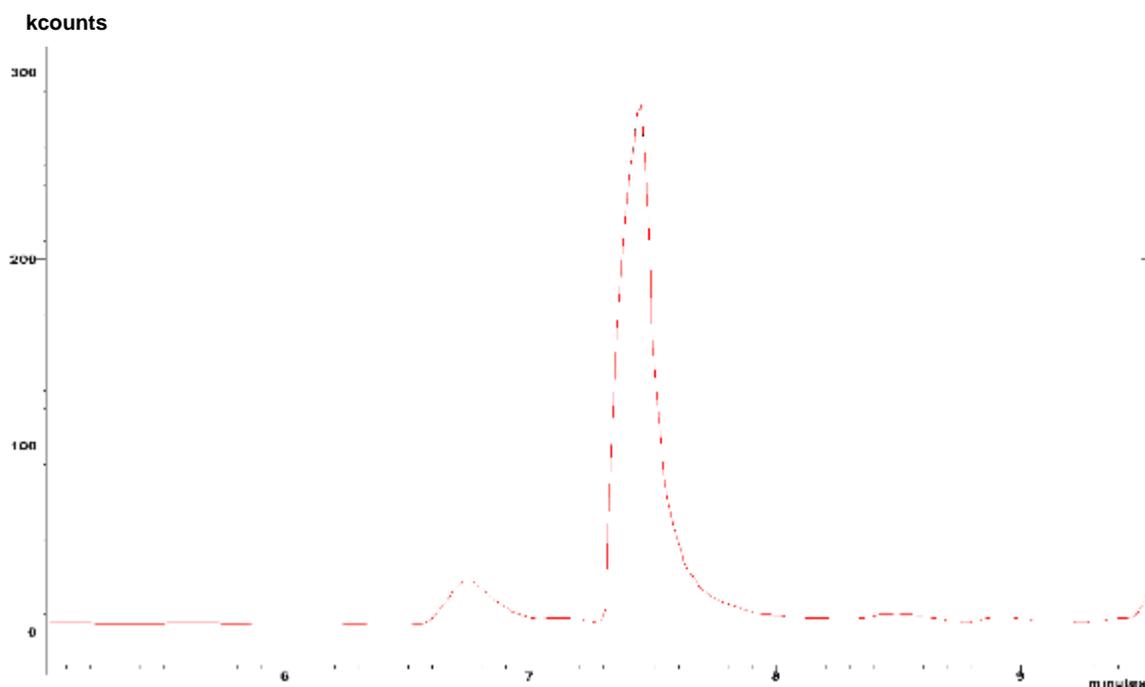
Anexo 1. Cromatogramas de Ácido ftálico di(octyl ester) en estados fenológicos principales 0 al 8 obtenidos por GC-MS en muestra de hojas de *C. longirostrata*.



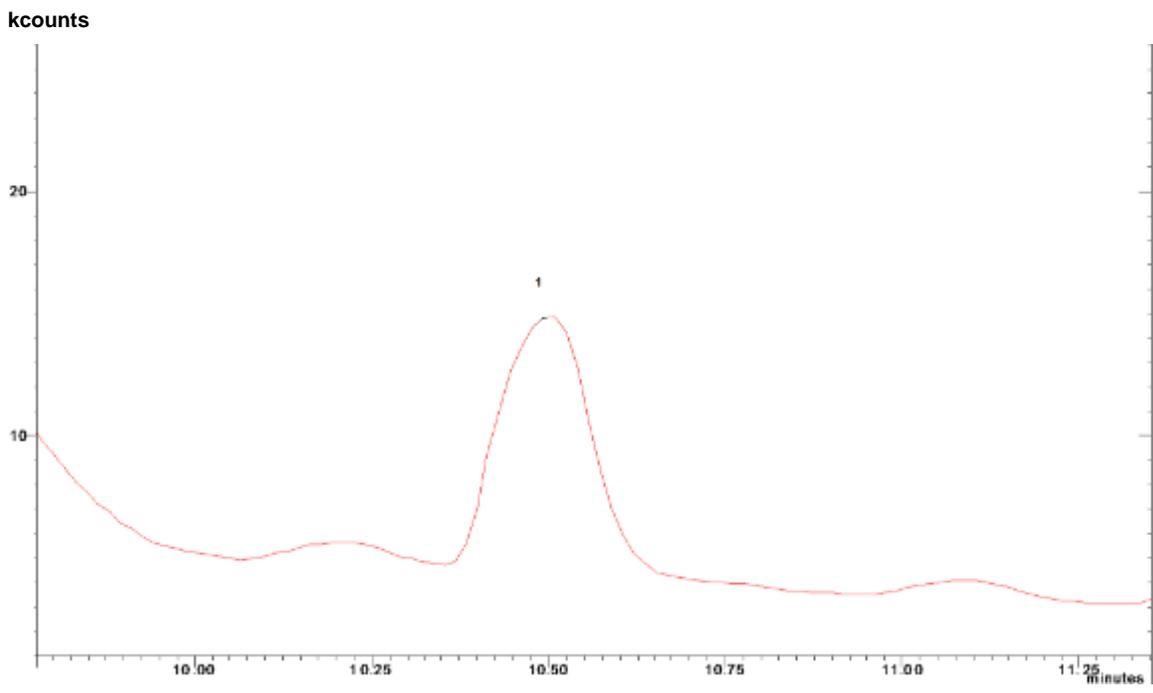
Anexo 2. Cromatograma de Ftalato de metilo-2-hetilhexilo presente en estados fenológicos 4, 5 y 8.



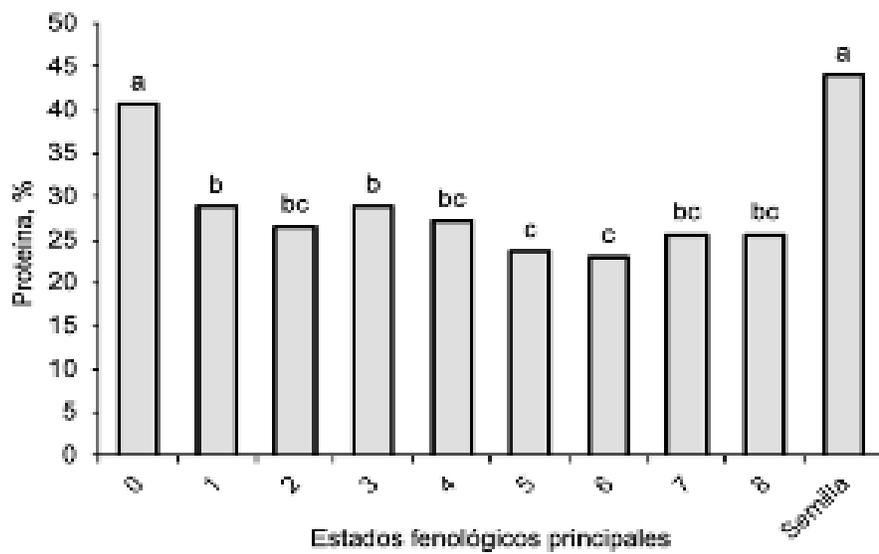
Anexo 3. Cromatograma de Ácido heptadecanoico-16-metil ester presente en estados fenológicos del 0 al 8.



Anexo 4. Cromatograma de Metilfluroglucinol presente en semillas.



Anexo 5. Cromatograma de 193e-5-8-indolizina presente en semillas



Anexo 6. Concentración de proteína durante el desarrollo fenológico de Chipilín