



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO DE LA TESIS

Análisis fitoquímico y actividad biológica de *Dodonaea  
viscosa* (L.) Jacq.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

NOMBRE DEL ALUMNO

SONIA ERIZBET SERRANO MUCIÑO



DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. JOSEFINA HERRERA SANTOYO  
2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombres Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1.Datos del alumno Serrano Muciño Sonia Erizbet 044 55 51 80 32 18 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301149671
2. Datos del tutor Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dra. Josefina Herrera Santoyo
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dra. Susana Valencia Ávalos
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombres Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 Dr. Héctor Mario Benavides Meza
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 Dra. Patricia Guevara Fefer
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 Q. en A. Verónica Muñoz Ocotero
7. Datos del trabajo escrito Título Subtítulo Número de páginas Año	Análisis fitoquímico y actividad biológica de <i>Dodonaea viscosa</i> L. Jacq 41 p 2013

## **Agradecimientos**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por enseñarme la magia que esconde su campus.

A cada uno de mis profesores por inculcar en mí el amor a la ciencia.

A la **Dra. Josefina Herrera Santoyo** por dirigir esta tesis, así como por su invaluable apoyo y valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

A la **Dra Patricia Guevara Feyer** por el apoyo durante mi estancia en el laboratorio, y por sus valiosos consejos que enriquecieron el presente trabajo.

A la **M. en C. Verónica Muñoz Ocotero**, por sus valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

A la **Dra. Susana Valencia Ávalos**, por enseñarme el maravilloso mundo de la botánica, así como por sus valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

Al **Dr. Héctor Mario Benavides Meza**, por sus enseñanzas y sus valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

A la **Dra. Rosa Irma Trejo Vazquez**, por el apoyo durante la colecta del material vegetal y por sus enseñanzas en campo.

Al **M. en C. Roberto Enrique Llanos Romero** por el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el laboratorio, así como por los valiosos comentarios para enriquecer el presente trabajo.

Al **M. en C. José de Jesús Reguera Serrano** por su invaluable apoyo durante la realización de los ensayos biológicos, así como por sus valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

Quiero agradecer a mis padres por darme la oportunidad de conocer este mundo,  
por tomar mi mano y soltarla cuando fue necesario  
y por enseñarme a crecer antes de lo previsto.

A **mi hermana** a quien admiro y quiero con todo el corazón y agradezco infinitamente por enseñarme a no desistir, pero sobretodo por creer siempre en mi y estar a mi lado cuando más la necesite.

A **Vonchis**, mi mounstro no del armario, pero si de mi vida que me ha acompañado desde siempre y me dio la fortaleza para continuar.

A **Ceci**, por darme el beneficio de la duda con su amistad y compartir un poco de su locura para aligerar este camino.

A **Noé, Ulises, Kika, Jhon, Cris, Lu, Ernie, Isaac, George y Robert** , por estar a mi lado cuando más los necesite.

**Josefina**, quizá el destino te puso en mi camino y agradezco que así haya sido, por que en el momento que me abriste la puerta, cuando muchas más se habían cerrado, transformaste mi vida a través de tu sabiduría, comprensión y cariño; por creer en mi sin conocerme, por sujetar mi mano cuando sentía que no podría continuar, por luchar conmigo cada batalla, pero sobretodo gracias por convertirte en mi guía de tantas noches oscuras.

A mis compañeros del laboratorio de Fitoquímica, pero en especial a **José y Enrique**, por apoyarme siempre de manera incondicional, por escucharme y por regalarme tantos buenos momentos.

A mis seres queridos y aquellos que se cruzaron en mi camino y sin saberlo contribuyeron a que este sueño se materializará.

*El descubrimiento consiste en ver lo que todos ven  
y pensar lo que nadie más ha pensado.*

Albert Szent-Györgi

*Hay hombres que luchan un día y son buenos,  
hay otros que luchan un año y son mejores,  
hay quienes luchan muchos años y son muy buenos,  
pero hay los que luchan toda la vida  
esos son los imprescindibles.*

Bertolt Brecht.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes. ....	6
3. Objetivos. ....	11
4. Materiales y métodos.....	12
4.1. Preparación del material vegetal. ....	13
4.2. Elaboración de extractos orgánicos.....	13
4.3. Elaboración de extractos acuosos.....	14
4.4. Determinación de grupos de metabolitos secundarios. ....	14
4.5. Obtención de perfiles cromatográficos.....	15
4.6. Actividad biológica (citotoxicidad).....	15
5. Resultados y discusión. ....	18
5.1 Rendimientos de los extractos orgánicos y acuosos.....	18
5.2 Determinación de grupos de metabolitos secundarios ....	19
5.3 Perfil cromatográfico de los extractos hexánicos.....	23
5.4 Perfil cromatográfico de los extractos de acetato de etilo.....	24
5.5 Perfil cromatográfico de los extractos metanólicos y acuosos.....	26
5.6 Bioensayos de germinación.....	27
5.7 Ensayos de supervivencia con <i>Artemia salina</i> ....	34
6. Conclusiones ....	37
7. Bibliografía.....	39

## 1. Introducción

---

Los organismos cumplen con un ciclo de vida en el cual nacen, crecen, se reproducen y mueren, y durante su historia de vida son afectados por las condiciones presentes en su medio ambiente y por los recursos que obtienen del mismo. Los organismos no viven aislados, necesitan convivir al menos una parte de su vida con individuos de la misma especie que coexisten en tiempo y espacio (Begon, *et. al.*, 2006).

Los individuos de una misma especie, género o familia, necesitan recursos (entidades requeridas por un organismo cuya cantidad es restringida por la actividad del mismo) muy similares para sobrevivir y cumplir con su ciclo de vida, no obstante la demanda puede exceder la cantidad disponible de estos, por lo cual los organismos deben competir para obtenerlos y garantizar su supervivencia (Begon, *et. al.*, 2006).

Cada especie puede influenciar la composición y diversidad de una comunidad a través de su actividad lo que le permite generar cambios en su ambiente; es decir, una especie es capaz de alterar las condiciones de su entorno al añadir o eliminar algunos recursos que están disponibles para otros organismos. Asimismo las interacciones entre los individuos de diferentes especies moldean la estructura y composición de las comunidades vegetales y animales (Begon, *et. al.*, 2006).

Debido a lo anterior, los organismos han desarrollado una serie de estrategias físicas, químicas, morfológicas y de comportamiento, que les han permitido reducir la oportunidad de ser encontrados por otro consumidor y que además incrementan sus probabilidades de supervivencia (Begon, *et. al.* 2006). En este contexto es posible que surjan relaciones evolutivas muy complejas y específicas entre organismos debido al establecimiento de un estrecho vínculo con el medio, donde solo aquellos que presentan algún carácter o cualidad que represente una ventaja respecto al resto de la población lograrán sobrevivir y dejar descendencia fértil.

Una de las estrategias que han utilizado las plantas para sobrevivir en sus ecosistemas, es el metabolismo secundario, el cual puede definirse como la capacidad que tienen los organismos de sintetizar compuestos que no utilizan directamente para sus funciones vitales, pero les permiten desarrollarse mejor en su ambiente (Bennet & Bentley, 1989 en Nugroho & Verpoorte, 2002).

Podemos definir a los metabolitos secundarios como compuestos con una presencia restringida a ciertos grupos taxonómicos, que aparentemente no son indispensables para las

funciones metabólicas de un organismo pero intervienen en la interacción de éstos con su ambiente y pueden favorecer la supervivencia en un ecosistema determinado (Verpoorte, 2000 en Nugroho & Verpoorte, 2002).

Los metabolitos secundarios representan la acumulación de productos finales de una compleja red de vías metabólicas que derivan del metabolismo primario. Tales compuestos son almacenados en un órgano, en un sitio de almacenamiento (por ejemplo: la vacuola) o son excretados y se acumulan en la superficie vegetal (Crawley, 1997).

Es necesario enfatizar que el metabolismo secundario es muy costoso energéticamente y depende directamente de las fuentes de energía y precursores necesarios formados durante el metabolismo primario por ejemplo: aminoácidos, carbohidratos, acetyl coenzima A, entre otros. Además debe existir un balance entre la síntesis de compuestos secundarios y el costo que implica el crecimiento para una planta; es decir, las plantas deben “elegir” entre producir nuevas hojas o defender químicamente aquellas hojas que están creciendo (Crawley, 1997).

Las rutas del metabolismo secundario están restringidas a especies individuales o géneros, o sólo son activadas durante ciertas etapas particulares del crecimiento y desarrollo. Otra característica muy importante del metabolismo secundario, es que pueden presentarse incrementos en la concentración de los compuestos sintetizados debido a una respuesta inducida por el daño mecánico o por el consumo de alguna parte de la planta por un herbívoro considerando que la competencia entre especies, el estrés y los daños por factores bióticos y abióticos son elementos comunes en el hábitat de un organismo (Crawley, 1997).

Además existen otras relaciones entre la concentración de metabolitos secundarios, la velocidad de crecimiento de la planta y su hábitat. Las plantas de lento crecimiento que viven en hábitats pobres en nutrientes tienden a presentar grandes cantidades de compuestos secundarios, en comparación con las plantas de rápido crecimiento de hábitats ricos en nutrientes (Mc Key 1979; Coley *et. al.*, 1985 en Crawley, 1997).

Existen diferentes teorías respecto a la función de los metabolitos secundarios, algunos autores han afirmado que solo son “productos de desecho” del metabolismo primario, que se han acumulado debido a la falta de un sistema efectivo de disposición de residuos. Sin embargo, otros autores sostienen que algunos de estos compuestos juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo, e incluso que la mayoría producen algún beneficio para la planta productora. La teoría más aceptada es que la mayoría de estos compuestos están involucrados en sistemas de defensa química, los cuales protegen a las plantas de la herbivoría e infecciones microbianas (Crawley, 1997).

Existen tres clases principales de metabolitos secundarios y son: los terpenoides, los compuestos nitrogenados, y los fenoles. Los terpenoides o isoprenoides, se sintetizan a partir de acetil coenzima A mediante la vía del ácido mevalónico. El grupo de los compuestos nitrogenados, son los alcaloides, los cuales se derivan a partir de aminoácidos. Finalmente los compuestos fenólicos, que se derivan del aminoácido aromático fenilalanina y también de la malonil coenzima A (Crawley, 1997).

En este contexto podemos definir la alelopatía, como un tipo de interacción química que ocurre entre plantas, animales y microorganismos, en la cual una planta produce un efecto sobre el crecimiento y distribución de otras (incluyendo microorganismos) a través de la liberación de compuestos químicos en el ambiente (Rice, 1984).

Reese (1979) define un aleloquímico como “un químico no-nutricional producido por un organismo que afecta la biología de la población de otras especies”.

Existen diversas formas por las cuales una planta puede liberar sus aleloquímicos al medio, y comprenden: la descomposición de materia orgánica, la volatilización de compuestos, la exudación por las raíces o la lixiviación (Anaya-Lang, 1999). La lixiviación y acumulación de materia orgánica en el suelo son las vías de liberación más importantes en regiones de clima húmedo, mientras que la descomposición de materia orgánica y la volatilización son más comunes en climas secos. En climas húmedos, los compuestos fenólicos son los principales inhibidores, mientras que en climas secos predominan los terpenoides (Ballester & Vieitez, 1978).

Los aleloquímicos sólo son efectivos cuando se liberan en el ambiente y se encuentran en una concentración adecuada. La liberación y producción de estos compuestos al medio depende de factores abióticos y bióticos, así como de las características fisiológicas de la planta excretora (genotipo, edad, enfermedades, etc) (Reigosa *et. al.*, 1999). Entre los factores abióticos se encuentran los siguientes: la temperatura, la duración e intensidad de la lluvia, la humedad del suelo, la luz, los nutrientes, entre otros. Los factores abióticos también determinan la calidad y concentración de los aleloquímicos en el medio, sin embargo, también depende de: la especie, las características de las hojas, el estado nutricional de las mismas, los desórdenes fisiológicos y la descomposición por los microorganismos del suelo principalmente (Reigosa *et. al.*, 1999).

El estrés puede definirse como “las limitantes externas que frenan o reducen la tasa de producción de toda la vegetación o parte de ella” (Grime, 1979) y de acuerdo con Einhellig (1996), bajo dichas condiciones las plantas tienden a producir más aleloquímicos e inclusive

las plantas sometidas a cierto tipo de estrés, también incrementan los efectos de los aleloquímicos recibidos.

Debido a que existe una gran variedad de compuestos químicos con potencial alelopático, los efectos fisiológicos también son muy variables. En la mayoría de los casos los efectos son dependientes de la concentración, del tiempo de residencia en el medio y de su interacción con el sustrato.

Generalmente los efectos observados son producto de una mezcla de aleloquímicos que actúan sinérgicamente y pueden afectar diferentes procesos simultáneamente. También las condiciones abióticas regulan los efectos producidos por estos compuestos (Reigosa *et. al.*, 1999).

Grime (1977, 1979) afirma que el estrés no sólo excluye a las especies competitivas, también reduce la importancia de la competencia como una fuerza conductora en la organización de las comunidades vegetales. Sin embargo, existe evidencia acerca de la influencia que tiene el estrés para inducir a la alelopatía como una fuerza en tal organización e incrementar la producción de compuestos secundarios (Einhellig, 1996).

Los compuestos secundarios liberados por las plantas pueden influenciar la competencia por los recursos, la dinámica de nutrientes, la ecología microbiana, las micorrizas y otros componentes abióticos del suelo (Wardle *et. al.*, 1998).

La alelopatía es un mecanismo ecológico que afecta directamente o bien sinérgicamente con mecanismos competitivos, la sucesión vegetal primaria y secundaria (Reigosa *et. al.*, 1999), la formación de comunidades vegetales, la dinámica entre diferentes formaciones (Rizvi *et. al.*, 1992), la dominancia de ciertas especies vegetales, (afectando la biodiversidad local), la distribución geográfica de especies, la evolución.

Es necesario hacer una diferenciación entre alelopatía y competencia, mientras que la competencia se refiere a una interacción entre individuos provocada por la búsqueda en común de un recurso limitado que conlleva a reducciones en la supervivencia, el crecimiento y/o la reproducción de los organismos competidores (Muller, 1969); la alelopatía no altera ningún recurso (nutrientes, oxígeno, agua, energía solar, etc) sino que añade al hábitat un nuevo factor de naturaleza bioquímica (Ballester & Vieitez, 1978).

De acuerdo con Whittaker & Fenny (1971), las especies dominantes por medio de supresión alelopática pueden invadir comunidades vegetales preexistentes y retardar su sustitución por otras especies.

De tal forma, que la competencia por los recursos y la alelopatía pueden operar simultáneamente y/o secuencialmente, influyendo una a la otra, mientras determinan la estructura de la comunidad (Inderjit & Del Moral, 1997). Por ello, es importante conocer cómo interactúan químicamente las plantas entre sí, para comprender la organización de una comunidad vegetal.

## 2. Antecedentes

---

Se considera que es necesario conocer la composición química de una planta para determinar la interacción que estos compuestos puedan tener con el medio (Pengelly, 2008). Por lo que se hace necesario ampliar el estudio químico de muchas especies vegetales, para comprender su actividad biológica.

*Dodonaea viscosa* L. Jacq. es una especie nativa de la Selva Baja Caducifolia en México, considerada por la CONAFOR y la CONABIO como una especie útil para la restauración y reforestación, además de que es utilizada con fines medicinales en diferentes partes del mundo.

**D. viscosa** es un arbusto perennifolio, perteneciente a la familia Sapindaceae. Algunos de sus nombres comunes son: “chapulistle”, “jarilla de la loma”, “hierba de la cucaracha”, “guayabillo” y “chapulixtle” entre otros. Es una especie cosmopolita que se distribuye en casi todo el país, tanto en zonas tropicales como subtropicales, en bosques de *Quercus* y de coníferas. Se cree que el centro de origen de esta especie es Australia, aunque se distribuye a través de los trópicos y subtropicos (Anilreddy, 2009).

En estado adulto mide de 1 a 5 m de altura; la corteza es de color marrón-rojiza, las hojas son lanceoladas, estrechas, de 10 cm de longitud, las flores son pequeñas, verdosas, amarillentas o rojizas, dispuestas en racimos cortos. El fruto es una cápsula ovoide de color amarillo-rojizo, que contiene semillas aladas, las cuales son tolerantes a la desecación y mantienen altos niveles de viabilidad durante la sequía por largos períodos de tiempo (Anilreddy, 2009).

Se establece en un intervalo altitudinal amplio (300 a 2,400 msnm) y en suelos desde someros hasta profundos, con textura arenosa a areno-arcillosa y muy pedregosos, bien drenados, preferentemente neutros y moderadamente salinos. Es capaz de crecer en suelos muy erosionados y con fuertes pendientes, sobre tepetate y toba removida. Es una especie demandante de luz, tolerante a sequías, sombra, inundaciones, viento y heladas; susceptible al ramoneo y al fuego. Necesita una estación seca definida. Se recomienda en el control de la erosión, como cortina rompevientos y como restaurador de suelos (Comisión Nacional Forestal).

Esta especie es utilizada por los nativos de distintas regiones en México y el mundo, debido a que posee diferentes propiedades medicinales. Las infusiones de las hojas y tallos son utilizadas para el tratamiento de lesiones en la garganta, y las de raíces para aliviar

resfriados. Los tallos y las hojas se utilizan también para combatir la fiebre, y las semillas en combinación con otras plantas se utilizan para tratar la malaria. Los tallos se utilizan en el tratamiento del reumatismo. Las hojas también se utilizan para aliviar picazón, fiebre, hinchazón, dolores y como agente antiespasmódico, las hojas y raíces se usan para calmar dolores de dientes y cabeza. También se reporta el uso de lociones elaboradas con partes no especificadas de la planta para aliviar torceduras, contusiones y heridas (Crib 1981 en Anilreddy, 2009).

Esta especie también se considera útil para tratar desórdenes del sistema digestivo, incluyendo indigestión, úlceras y diarrea, así como hemorroides (Anilreddy, 2009, Arun *et al.*, 2008).

En África se ha documentado el uso de las raíces en infusión para estimular la producción de leche después del parto y para el tratamiento de la dismenorrea, así como desórdenes durante la menstruación (Anilreddy, 2009).

En general diversos autores reconocen que *D. viscosa* posee actividad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y analgésica (Getie *et al.*, 2003). También se ha reportado efecto anestésico y actividad para relajar el músculo liso (Rojas, *et al.*, 1996).

En México se reporta el uso de esta especie para el tratamiento de reumatismo, infecciones de la piel, contra la diarrea y desórdenes que involucran los músculos liso, así como en el tratamiento de la menorragia en mujeres, contra la infertilidad y sangrados irregulares (Teshome *et al.*, 2009).

Las investigaciones fitoquímicas de esta especie han demostrado la presencia de diversos componentes, entre los que destacan: flavonoides, terpenos, cumarinas, esteroides y saponinas (Wagner *et al.*, 1986; Sachdev & Kulshreshtha, 1983;)

Ghisalberti (1998) refiere la presencia de 23 flavonas en las semillas, tallos, hojas y flores de *D. viscosa*, caracterizados por el oxígeno en el carbono 3 y en la mayoría de los casos presentan un grupo metoxilo en el carbono 6 (Ghisalberti, 1998 en Pengelly, 2008).

En 1998 Siddiqui realizó un estudio en el cual hace referencia a 18 flavonoides incluyendo glicósidos de quercetina e isorhamnetina, los cuales fueron previamente aislados por Fair & Subramanian en 1975 (Siddiqui, 1998 en Pengelly, 2008).

En 1991 Mata y colaboradores aislaron la sakuranetina y el 6-hidroxikaempferil-3,7-dimetil éter de *D. viscosa*.

Getie y colaboradores aislaron relativamente grandes concentraciones de quercetina, kaempferol e isorhamnetina en extractos crudos de hojas (Getie *et al.*, 2003). Se considera

que los flavonoides presentan diferentes efectos biológicos, principalmente antivirales, antiinflamatorios, antimutagénicos y anticarcinogénicos, y esta actividad está relacionada con las propiedades antioxidantes que posee la especie (Teshome *et. al.*, 2010)

En el cuadro 1 se muestran los compuestos identificados en *D. viscosa* (Anilreddy, 2009)

**Cuadro 1. Compuestos identificados en *Dodonaea viscosa***

Nombre común	Nombre químico	Referencia
Aliarina	5,7,4'-trihidroxi-3'-(3hidroximetilbutanol) 3,6-dimetoxiflavona	Sachdev & Kulshreshtha 1983
Pinocembrina	5,7-dihidroxi flavanona	Sachdev & Kulshreshtha 1983
Penduletina	5,4'-Dihidroxi-3,6,7 trimetoxi flavona	Sachdev & Kulshreshtha 1983
Viscosol	3'-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalil)-5,7-dihidroxi-3,6,4'-trimetoxi flavona	Sachdev & Kulshreshtha 1986
Sakuranetina	(S)-5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona	Mata <i>et al.</i> , 1991
Isokaempferida	3,5,7,4'-Tetrahidroxil-3'-metoxiflavona	Wollenweber, 1993
Ermanina (Campferol 3,4' dimetiléter)	3,5,7,4'-Tetrahidroxil-3,4'-Dimetoxiflavona	Wollenweber, 1993
Ramnocitrina (Campferol 7- metiléter)	3,5,7,4'-Tetrahidroxi-7-metoxiflavona	Wollenweber, 1993
Cirsimaritina (Escutellareina 6,7-Dimetioxi flavona)	5, 4'-Dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona	Wollenweber, 1993
Pectolarigenina (Escutellareina 6,4'- Dimetioxi flavona)	5, 7 -Dihidroxi-6, 4' - dimetoxiflavona	Wollenweber, 1993
Campferol 7,4'-dimetiléter	3,5-Dihidroxi-7,4'- dimetoxiflavona	Harborne, 1999
Campferol 3,7,4'- trimetiléter	5-Hidroxi-3,7,4'- trimetoxiflavona	Harborne & Baxter 1999
Santina	5,7-dihidroxi - 3,6,4'3'tetrametoxi flavona(trimetoxiflavona)	Sachdev & Kulshreshtha 1983 Harborne & Baxter 1999
Acacetina 7- metiléter	5 hidroxi -7,4' - dimetoxiflavona	Abdel-Mogis <i>et al.</i> , 2001
6 Hidroxi campferol – trimetil éter (Penduletina)	6 Hidroxi– 3,6,7 trimetoxi flavona	Wollenweber & Roitman 2007
Campferol 3 – metiléter	5,7,4'Trihidroxi-3-metoxiflavona	Wollenweber & Roitman 2007
Narigenina 7,4' –dimetil éter	5,7,4 –tri hidroxi –7,4' – Dimetioxi flavanona	Wollenweber & Roitman 2007

Narigenina 7– metiléter	5,7,4-trihidroxi7-metoxiflavanona	Wollenweber & Roitman 2007
Eriodictiol 7,3' – dimetiléter	5,7,3',4'Tetrahidroxi -7,3'-Dimetoxiflavona	Wollenweber & Roitman 2007
Eriodictiol7 – metiléter	7,3',4'Tetrahidroxi -7-Metoxiflavona	Wollenweber & Roitman 2007

En un estudio realizado por Khalil y colaboradores (2006) demostraron que los extractos acuosos y etanólicos de hojas de *D. viscosa* poseen actividad antiinflamatoria, y en una dosis de 300 mg/kg inhiben la formación de edemas en ratas, por lo cual estos resultados respaldan el uso tradicional de esta planta para aliviar la inflamación.

Los aceites esenciales y los extractos de hojas de *D. viscosa* muestran actividad antibacterial e hipotensiva. Los extractos acuosos y metanólicos presentan propiedades cardiaco depresivas y constrictivas coronarias, así como una ligera actividad antihelmíntica (Anilreddy, 2009).

La actividad espasmolítica se relaciona con la presencia de algunos diterpenos, sakuranetina, quercetina y rutina en las semillas, madera e inflorescencias. Se ha detectado que varios extractos de esta especie poseen actividad insecticida contra el gusano de la hoja de algodón *Spodoptera littoralis* (Pearman, 2000 en Anilreddy B., 2009).

Además *D. viscosa* muestra actividad antifúngica contra *Candida albicans* en pacientes infectados con VIH (Mrudula, 2008 en Anilreddy B., 2009).

Considerando la importancia ecológica, el impacto en la restauración, las múltiples propiedades medicinales y actividad biológica que se ha reportado para esta especie, así como su capacidad de formar poblaciones densas y dominantes, surge la necesidad de realizar el presente estudio para correlacionar la actividad biológica (citotóxica y alelopática) de *D. viscosa* con los metabolitos secundarios que produce, en poblaciones mexicanas, utilizando dos modelos biológicos diferentes: *Artemia salina* y *Lactuca sativa*, con diferentes extractos orgánicos y acuosos de hojas, tallos y frutos.

La selección de *A. salina* como modelo biológico se determinó debido a que este tipo de organismos han sido utilizados en estudios toxicológicos por más de 40 años para determinar el efecto letal en la supervivencia de nauplios y representan una herramienta práctica y económica en la evaluación preliminar de extractos y fracciones para identificar principios activos. Además *A. salina* es un organismo disponible comercialmente de manera continua, por la disponibilidad permanente de huevos, no es necesario mantener una colonia viva permanentemente, las pruebas se pueden realizar en cualquier sitio y puede disponerse de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.

Cabe mencionar que en México no se han reportado trabajos previos que describan el potencial alelopático para *D. viscosa*, por lo cual el presente estudio representa un punto de partida para futuras investigaciones en el tema.

### 3. Objetivos

---

#### **Objetivo general:**

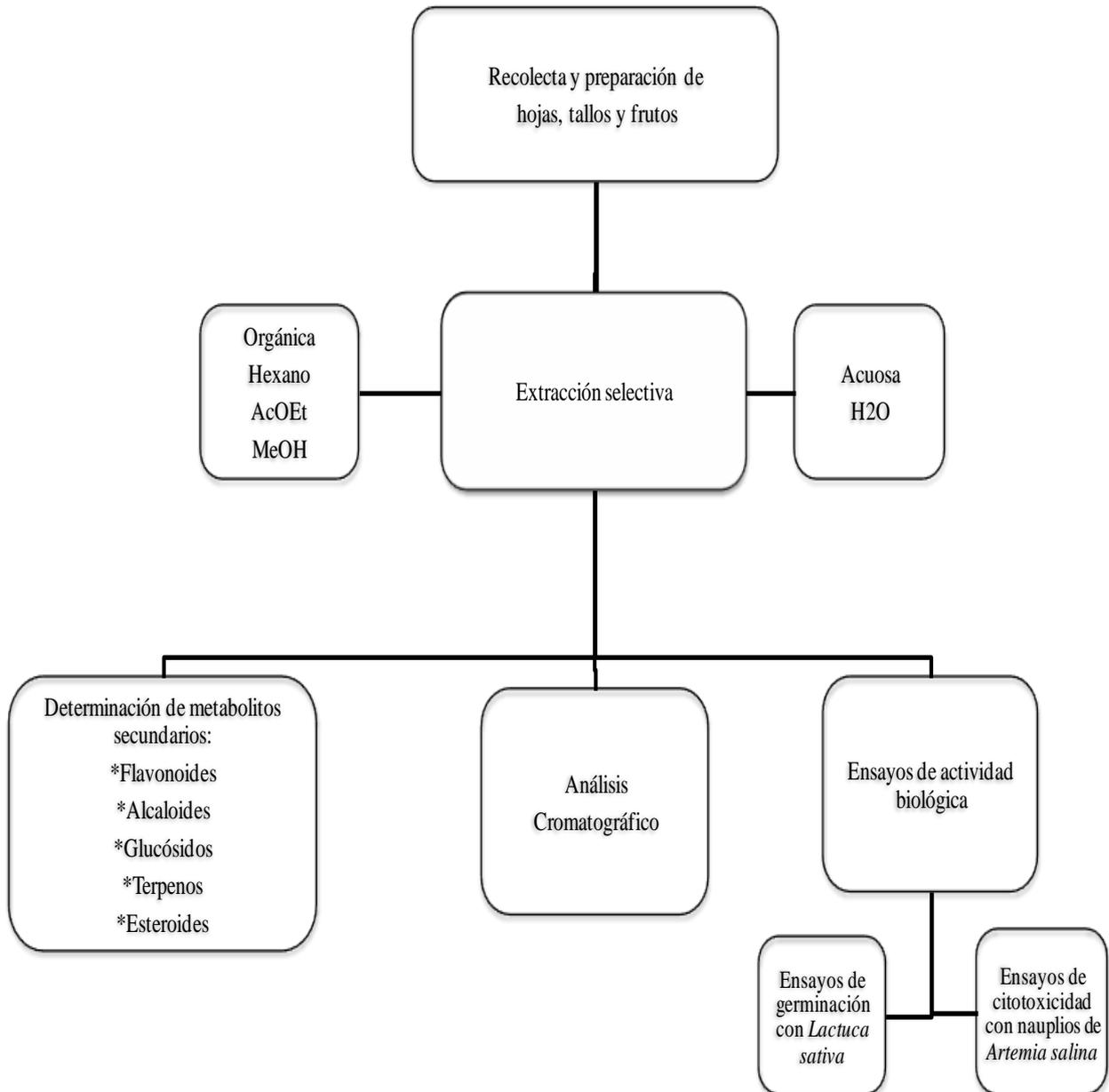
Realizar un estudio fitoquímico preliminar de hojas, tallos y frutos de *D. viscosa* para determinar la actividad biológica sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa* y la supervivencia de *Artemia salina*.

#### **Objetivos particulares:**

- Cuantificar y comparar los rendimientos obtenidos para los extractos orgánicos y acuosos de hojas, tallos y frutos.
- Identificar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos y acuosos de *D. viscosa*.
- Evaluar la complejidad de los extractos vegetales orgánicos y acuosos por medio de la cromatografía en capa fina.
- Analizar el efecto de los extractos obtenidos de *D. viscosa* sobre la germinación de semillas de lechuga.
- Determinar el efecto citotóxico de los extractos de *D. viscosa* sobre la supervivencia de *Artemia salina*.

## 4. Materiales y Métodos

---



**Figura 1. Diagrama Metodológico.**

#### **4.1. Preparación del material vegetal.**

Se realizó la recolecta de hojas, tallos y frutos maduros de individuos adultos de *Dodonaea viscosa* en las “Barrancas del río Tembembe” Morelos, durante el período de enero a febrero del 2008. El ejemplar de herbario fue identificado por el grupo de trabajo de la Dra. Rosa Irma Trejo Vázquez del Instituto de Geografía de la UNAM.

El material se separó de acuerdo al órgano vegetal y se colocó en bolsas de papel reciclado, las cuales fueron depositadas en una cámara de ambiente controlado con calor seco a una temperatura aproximada de 30-40 °C. Una vez seco se procedió a realizar la molienda del material separado (Figura 1).

#### **4.2. Elaboración de extractos orgánicos.**

Se realizaron extracciones selectivas de los tres órganos vegetales recolectados, utilizando los siguientes disolventes de menor a mayor polaridad:

- Hexano (HEX)
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Metanol (MeOH)

Se pesaron 100 g de hojas, tallos y frutos, los cuales se colocaron en matraces y se extrajeron por maceración con cada uno de los disolventes seleccionados, comenzando con el disolvente de baja polaridad, es decir, hexano durante 24 horas, el proceso de extracción se realizó por triplicado.

Transcurrido el tiempo de extracción de las muestras vegetales, se realizó una filtración y se colocaron los extractos en el rotavapor para destilar el exceso de disolvente, los extractos concentrados se transvasaron a frascos de vidrio y se dejaron a temperatura ambiente para evaporar el resto del disolvente. Después de la tercera extracción se realizó el cambio de disolvente y se continuó el proceso descrito anteriormente.

El procedimiento se realizó por triplicado para cada órgano vegetal (hojas, tallos y frutos) con cada uno de los disolventes utilizados. Una vez que se secaron totalmente los extractos obtenidos con cada disolvente se pesaron para obtener los rendimientos.

### 4.3. Elaboración de extractos acuosos.

Se elaboraron también extractos acuosos de tallos, hojas y frutos, utilizando 10 g de cada órgano, los cuales se sumergieron en agua destilada hasta cubrir la muestra vegetal. Después de 24 h a temperatura ambiente, se filtraron los extractos utilizando un embudo Buchner y presión reducida para acelerar el proceso, los extractos se congelaron y liofilizaron. Posteriormente se pesaron para calcular los rendimientos obtenidos.

### 4.4. Determinación de grupos de metabolitos secundarios.

Una vez obtenidos los extractos orgánicos y acuosos de todo el material extraído, se realizaron pruebas para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios. Para ello se pesaron 50 mg de cada uno de los extractos y se redisolviéron en 10 ml de cloroformo o metanol (dependiendo de la solubilidad del extracto), en el caso de los extractos acuosos se redisolviéron en metanol. De esta disolución madre, preparada para cada extracto obtenido con los tres disolventes utilizados (hexano, acetato de etilo y metanol) así como para los acuosos, se tomó 1 mL (5 mg) para realizar las siguientes pruebas para la identificación de metabolitos secundarios de acuerdo con Domínguez (1973):

Para la determinación de **Flavonoides** se realizó la **prueba de Shinoda**, la cual consiste en agregar un trozo de magnesio y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado a cada tubo con la muestra. Si la prueba es positiva se observa una coloración anaranjada, roja, roja azulosa o violeta.

Para la determinación de **Alcaloides**, la **prueba de Dragendorff** y la **prueba de ácido silicotúngstico**, consiste en redissolver la muestra en ácido clorhídrico al 1% y agregar 2 gotas del reactivo correspondiente. Ambas pruebas permiten la identificación de alcaloides, lo cual se visualiza al formarse un precipitado.

Para detección de **Glicósidos** en la **prueba de Mölish**, se redissuelve el extracto en metanol o etanol se agregan 2 gotas de  $\alpha$ -naftol y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo que contiene la muestra. Se toma la lectura de la coloración del anillo formado en la interfase, si la prueba es positiva se observa un color violeta.

Para la detección de **Terpenos** y **Esteroides** con la **Prueba de Lieberman-Buchard** es necesario redissolver la muestra en cloroformo y se agrega 1 ml de reactivo el cual contiene 1 ml de anhídrido acético, 1 ml de cloroformo y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Si la

prueba es positiva para identificación de terpenos se observa un cambio de coloración azul o verde; mientras que para esteroides la coloración es rosa o naranja.

#### **4.5. Obtención de perfiles cromatográficos.**

Con la finalidad de identificar el número aproximado de compuestos y/o mezclas presentes en los diferentes extractos orgánicos y acuosos de *D. viscosa*, así como sus características de polaridad, se obtuvieron los perfiles cromatográficos mediante cromatografía en capa fina.

Se utilizó como fase estacionaria placas de gel de sílice Merck 60 F<sub>254</sub>, 2 mm de 5 x 5 cm y para la fase móvil eluyentes de distinta polaridad que permitieran separar el mayor número de compuestos.

En cada placa se aplicó con un capilar una cantidad de la disolución madre que se preparó previamente. Se desarrollaron las placas en distintos sistemas de elución dependiendo de la polaridad del extracto. Se observaron las placas obtenidas en luz UV a 356 y 254 nm y se revelaron con los siguientes reveladores químicos: sulfato cèrico, y revelador de productos naturales (RPN). Se consideraron dos condiciones para seleccionar los mejores sistemas de elución para cada extracto: la presencia del mayor número de bandas tanto en luz UV, como al revelar con cada uno de los reactivos mencionados.

Una vez identificados los sistemas de elución correspondientes mediante el análisis cualitativo descrito anteriormente, para cada extracto se obtuvieron perfiles cromatográficos cuantitativos, para lo cual se utilizó un aplicador automático CAMAG TLC4, se aplicaron 50 µg de los extractos orgánicos y acuosos en placas cromatográficas de gel de sílice con un tamaño de 10 x 5 cm; la concentración de las disoluciones de cada uno de los extractos fue de 5 mg/mL. Los perfiles obtenidos para los extractos orgánicos y acuosos, se observaron en luz UV y posteriormente se revelaron con los reactivos correspondientes de acuerdo a los resultados obtenidos para la identificación de grupos de metabolitos secundarios.

#### **4.6. Actividad Biológica (citotoxicidad).**

##### **Ensayos de germinación con semillas de *Lactuca sativa*.**

Para la determinación del efecto alelopático sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), se utilizaron tres concentraciones por cada extracto: 10, 100 y 1000 ppm.

Las concentraciones fueron seleccionadas con base en la descripción del artículo de Maraschin-Silva y Alves Aquila (2005). Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de una vía utilizando el programa STATISTICA versión 7.0.

La selección de la especie blanco utilizada consideró los siguientes criterios: el tiempo de germinación, la viabilidad de las semillas, el tamaño y el costo.

Se utilizó como sustrato papel filtro, el cual fue impregnado con la disolución del extracto mediante un pincel para lograr una dispersión homogénea, y se colocó en cajas de Petri de vidrio. Se utilizaron cinco cajas de Petri por extracto y en cada una se colocaron 20 semillas de lechuga, las cuales se lavaron previamente con agua corriente y jabón por cinco minutos para eliminar la mayor cantidad de hongos, bacterias o impurezas presentes en la testa que intervinieran con la germinación. De tal forma que para cada tratamiento se colocaron 100 semillas de lechuga para evaluar el porcentaje de germinación.

Además se definió un grupo control, formado por semillas a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento, así como un grupo testigo, en el cual se colocaron 4 mL de cada uno de los disolventes utilizados para impregnar los diferentes extractos en el papel filtro. También para el grupo control y el testigo se colocaron 20 semillas en cada caja por quintuplicado.

Para todos los tratamientos, en cada caja de Petri que contenía las 20 semillas de lechuga se colocaron 6 ml de agua destilada, se cubrieron con papel aluminio y se colocaron en una incubadora a una temperatura de  $25 \pm 0.5$  °C.

Se realizaron dos lecturas, una a las 24 h y otra a las 48 h, para cuantificar el número de semillas germinadas por caja.

### **Ensayos de supervivencia con *Artemia salina*.**

Se realizó un ensayo con nauplios de *Artemia salina* (Leach), para determinar la actividad citotóxica de los extractos de mayor polaridad. Se utilizaron tres concentraciones por cada extracto: 10, 100 y 1000 ppm, para evaluar el posible efecto toxicológico sobre la supervivencia de los nauplios de *Artemia salina* (Leach). Con los resultados obtenidos se calculó la concentración letal 50 utilizando el análisis Probit.

Durante el proceso de eclosión se colocaron los huevecillos en agua salina a temperatura controlada de  $25$  °C  $\pm$   $0.5$  °C por 24 h.

La prueba se realizó por quintuplicado para cada una de las concentraciones de las disoluciones salinas de los extractos, y se colocaron 10 artemias por tubo de ensayo, con un volumen final de 10 mL. Los tubos se mantuvieron en una incubadora a temperatura controlada de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

Se realizó la lectura a las 24 h, para cuantificar el número de artemias sobrevivientes después de la exposición al extracto y se compararon los resultados de cada concentración.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

---

### 5.1. Rendimientos de los extractos orgánicos y acuosos.

Después de realizar las extracciones selectivas con cada uno de los disolventes (hexano, acetato de etilo y metanol), se obtuvieron en total 18 extractos orgánicos, los cuales se pesaron totalmente secos para obtener los respectivos rendimientos (Cuadro 2).

Se observó que los rendimientos obtenidos para los extractos hexánicos fueron mayores en hojas y frutos, de 3.0 y 2.8 % respectivamente. En el caso de los extractos de acetato de etilo se registraron los mayores rendimientos para las hojas 13.7 % y el menor rendimiento se obtuvo para los tallos con 3.7 %. Para los extractos metanólicos las hojas y frutos mostraron rendimientos mayores, siendo de 10.3 y 9.5 %, en comparación con los tallos que registraron el menor rendimiento que fue de 6.1 % (Cuadro 2).

Al comparar los valores obtenidos para los tres disolventes utilizados se observó que el órgano que presentó los mayores rendimientos fue la hoja, a diferencia del tallo que en general registró los rendimientos más bajos.

**Cuadro 2. Rendimientos obtenidos, expresados en porcentaje, de los diferentes extractos orgánicos.**

ÓRGANO	HEXANO	AcOEt	MeOH
HOJAS	3.0	13.7	10.3
TALLOS	1.3	3.7	6.1
FRUTOS	2.8	8.9	9.5

Se obtuvieron en total tres extractos acuosos del material vegetal, los cuales se liofilizaron y pesaron para obtener los rendimientos correspondientes. Se observó que los rendimientos fueron mayores para hojas 13.4 %, seguido de frutos 10.7 % y por último tallos con 2.6 %.

Las hojas y frutos contienen la mayor cantidad de compuestos por síntesis “in situ” o acumulación de biomasa, en los tallos se puede explicar la menor cantidad de materia orgánica por el funcionamiento que realiza este órgano, es decir, principalmente transporte de compuestos; además considerando que es una especie caducifolia la época de recolecta también debe influir en el comportamiento observado.

## 5.2. Determinación de grupos de metabolitos secundarios.

Los resultados de las pruebas de detección de metabolitos secundarios mostraron la presencia de terpenos, esteroides, flavonoides, alcaloides y glicósidos en los tres órganos bajo estudio de *D. viscosa* (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Metabolitos secundarios identificados en los diferentes extractos de material vegetal de *D. viscosa* (los parámetros para cuantificar la intensidad de la reacción fueron los siguientes: +=25 %, += 50 %, +++= 75 %, ++++= 100 %).**

Extracto	Órgano	Terpenos Esteroides	Flavonoides	Alcaloides		Glicósidos
				Dragendorff	Acido silicotúngstico	
<b>HEXANO</b>	<i>Hojas</i>	++++ verde	++ verde claro	Negativa	Negativa	Negativa
	<i>Tallos</i>	+++ verde	++ verde claro	Negativa	Negativa	Negativa
	<i>Frutos</i>	++ verde	+ verde claro	Negativa	Negativa	Negativa
<b>ACETATO DE ETILO</b>	<i>Hojas</i>	++ verde	++++ verde oscuro	Negativa	Negativa	Negativo
	<i>Tallos</i>	++ verde claro	+++ verde	Negativa	Negativa	Negativo
	<i>Frutos</i>	++ verde	+++ verde	Negativa	Negativa	Lig +
<b>METANOL</b>	<i>Hojas</i>	+ verde	+++ verde aceituna	Positiva +++	Positiva +++	Positiva +
	<i>Tallos</i>	Negativa	++ verde aceituna	.	Positiva ++	Positiva +
	<i>Frutos</i>	Negativa	+++ verde aceituna	Positiva +	Positiva +	Positiva ++
<b>ACUOSOS</b>	<i>Hojas</i>	+ rosado	+++ durazno	+	+	++++
	<i>Tallos</i>	+	++ durazno	Negativa	Negativa	+++
	<i>Frutos</i>	+ rosado	++ rosa	Negativa	Ligeramente +	+++

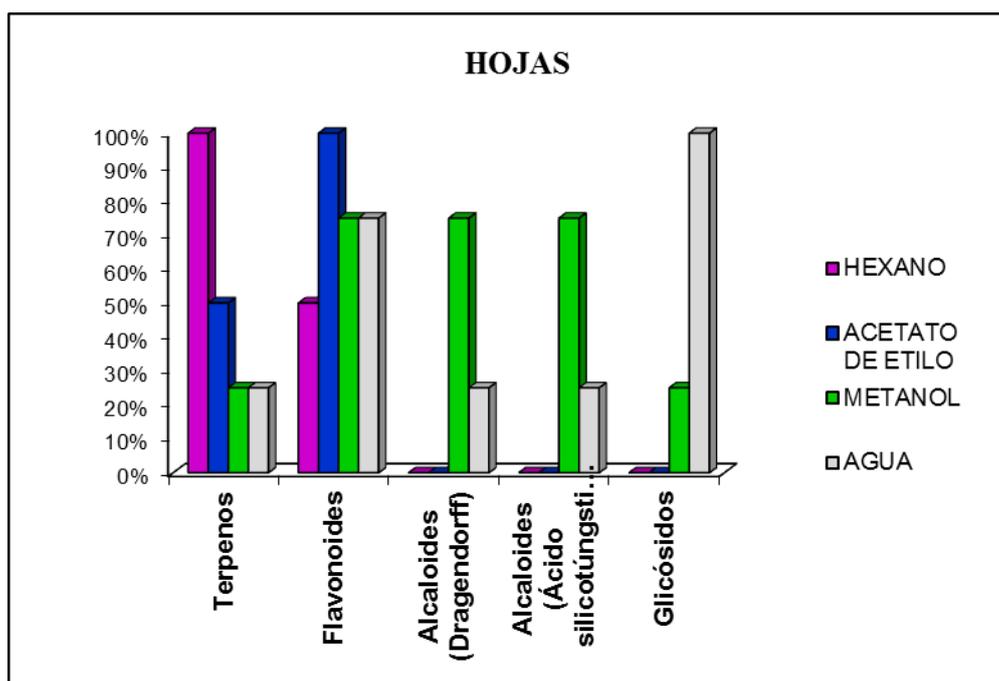
A nivel de órgano se encontró que los metabolitos identificados en los extractos de hojas fueron flavonoides, terpenos-esteroides y glicósidos con una intensidad de reacción alta

(100 %), es decir, se observó una mayor concentración de estos grupos de metabolitos secundarios.

En los extractos de tallos los resultados fueron similares a los extractos de hojas, se detectaron principalmente terpenos-esteroides, flavonoides y glicósidos, aunque la intensidad de reacción fue menor, lo cual significa que estos compuestos secundarios están presentes en tallos pero en una concentración más baja.

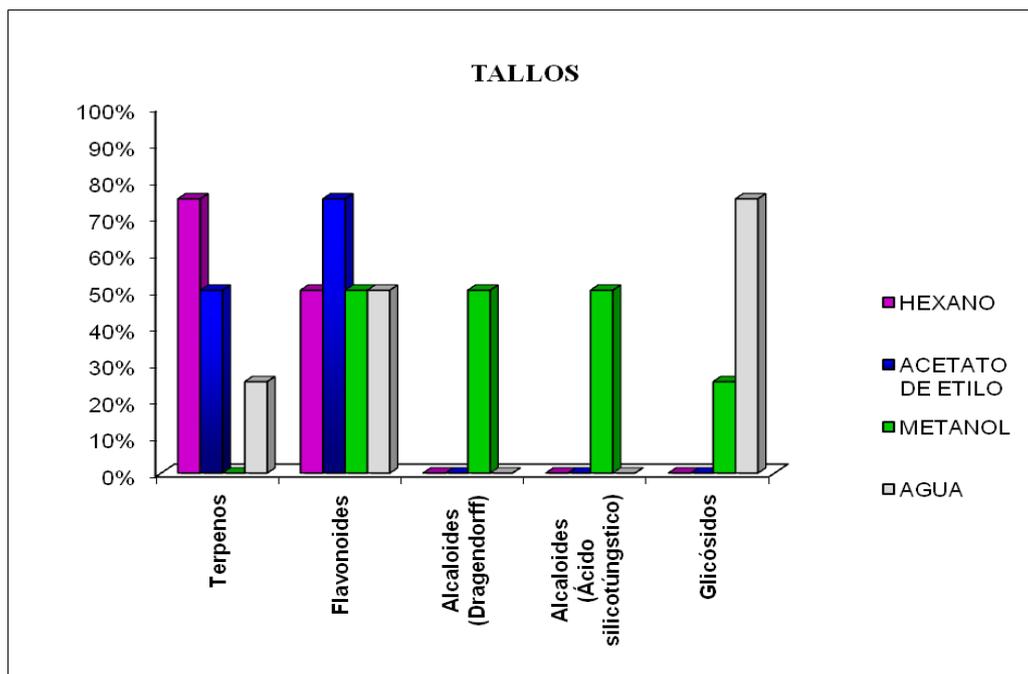
Mientras que en los extractos de frutos el comportamiento fue distinto, ya que predominó la presencia de flavonoides y glicósidos, y aunque se detectó la presencia de terpenos-esteroides la intensidad de la reacción fue menor en comparación con los registros para los extractos de hojas y tallos.

Para los extractos de hojas, se observó que en el extracto hexánico destacó la presencia de terpenos-esteroides, en el de acetato de etilo los flavonoides, para el extracto metanólico también resaltó la presencia de flavonoides y alcaloides y para el extracto acuoso se detectaron principalmente glicósidos (Figura 2).



**Figura 2. Metabolitos secundarios en los extractos orgánicos y acuosos de hojas, donde la intensidad de la reacción para cada una de las pruebas de detección se expresa en porcentaje.**

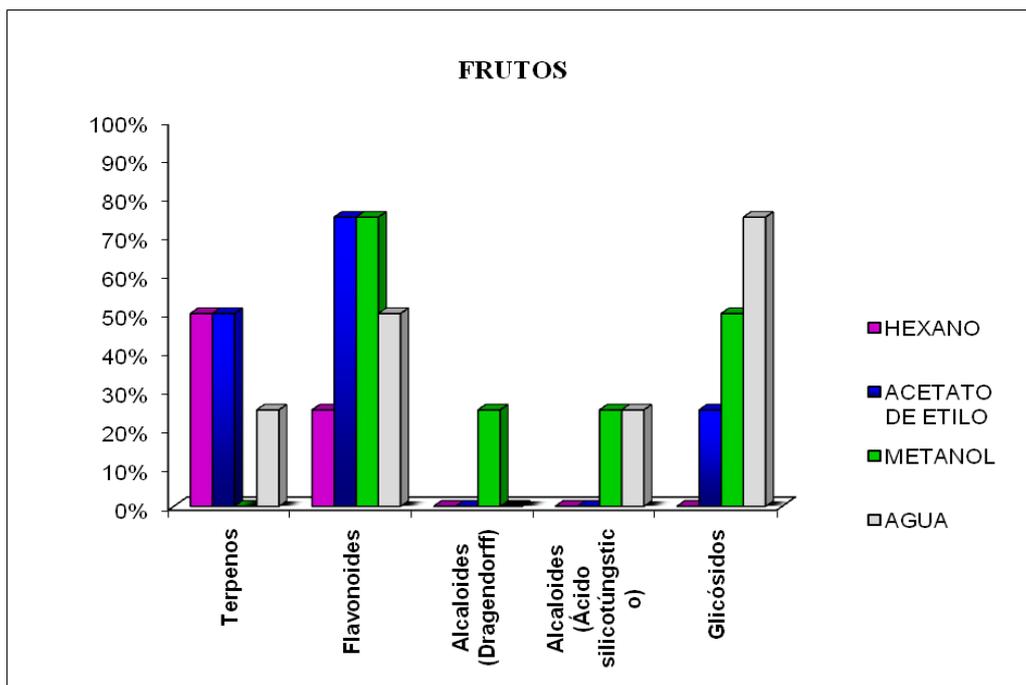
En los extractos de tallos, se detectaron los mismos grupos de metabolitos secundarios que los presentes en los extractos de hojas, aunque en concentraciones diferentes, lo cual se reflejó en las intensidades de reacción observadas (Figura 3).



**Figura 3. Metabolitos secundarios en extractos orgánicos y acuosos de tallos, donde la intensidad de la reacción para cada una de las pruebas de detección se expresa en porcentaje.**

En los extractos de frutos, nuevamente se encontraron los mismos grupos de metabolitos secundarios para cada disolvente, es decir, para el hexánico destaca la presencia de terpenos-esteroides, para el de acetato de etilo resaltan los flavonoides al igual que en el metanólico y para el acuoso predominan los glicósidos, sin embargo, a diferencia de los extractos de hojas y tallos aunque hay presencia de alcaloides la concentración de compuestos secundarios es menor, aproximadamente del 25 % (Figura 4).

Se observó que hay similitudes entre los diferentes órganos en cuanto a la presencia de metabolitos secundarios, sin embargo, las intensidades de reacción para cada grupo fueron diferentes tanto en los extractos como en los órganos analizados, lo cual podría relacionarse con la concentración presente en cada muestra analizada y por lo tanto se requiere la cuantificación en cada uno de los casos.



**Figura 4. Metabolitos secundarios en extractos orgánicos y acuosos de frutos, donde la intensidad de la reacción para cada una de las pruebas de detección se expresa en porcentaje.**

Estos resultados concuerdan con las investigaciones fitoquímicas realizadas sobre la especie, donde se ha demostrado la presencia de flavonoides, terpenos, esteroides, saponinas y glicósidos (Wagner *et. al.*, 1986; Kusum & Dinesh, 1983; Sachdev & Kulshreshtha, 1984; Siddiqui, 1998 en Pengelly, 2008).

Los extractos orgánicos y acuosos presentan similitudes en los grupos de metabolitos secundarios, sin embargo, suponemos diferencias en las estructuras químicas ya que los compuestos fueron extraídos en diferentes disolventes además de observar diferente intensidad de reacción para cada uno. Para los extractos orgánicos de hojas, tallos y frutos destacó la presencia de terpenos y flavonoides, mientras que en los extractos acuosos se observó una mayor intensidad de reacción para los glicósidos.

A nivel de órgano se observó que la intensidad de reacción para terpenos y flavonoides es similar en los extractos orgánicos y acuosos de hojas y frutos (100 %), sin embargo, en los extractos acuosos de frutos destaca la ausencia de alcaloides.

Es necesario enfatizar que al realizar una extracción selectiva de menor a mayor polaridad, se trata de obtener en los extractos componentes de polaridad semejante. Esta condición facilita el análisis del extracto en cuestión.

Por otro lado el extracto acuoso, presenta una mayor complejidad en cuanto a la polaridad de sus componentes, ya que se obtienen en este extracto tanto compuestos polares como de mediana polaridad.

### 5.3. Perfil cromatográfico de los extractos hexánicos.

La placa cromatográfica para los extractos hexánicos observada bajo luz ultravioleta de 365 nm, mostró que existe similitud entre los perfiles obtenidos para los tres órganos bajo estudio, lo cual se refleja en el número aproximado e intensidad de las bandas presentes en la zona de mediana polaridad (A), principalmente destaca la similitud de los extractos de tallo y fruto los cuales comparten bandas con la misma intensidad en la zona de mediana y alta polaridad (B), a excepción de una mancha presente en la zona de menor polaridad para el extracto de fruto (C) y para el extracto de hoja se observó que presentó similitudes principalmente en la zona de mediana polaridad (Figura 5).

Al revelar la placa con sulfato cérico, se detectaron algunos cambios en la presencia de las bandas observadas bajo luz ultravioleta. En la zona de mediana polaridad se observaron similitudes entre los extractos de hoja, tallo y fruto, aunque en el extracto de hoja se obtuvo una mayor intensidad en las bandas.

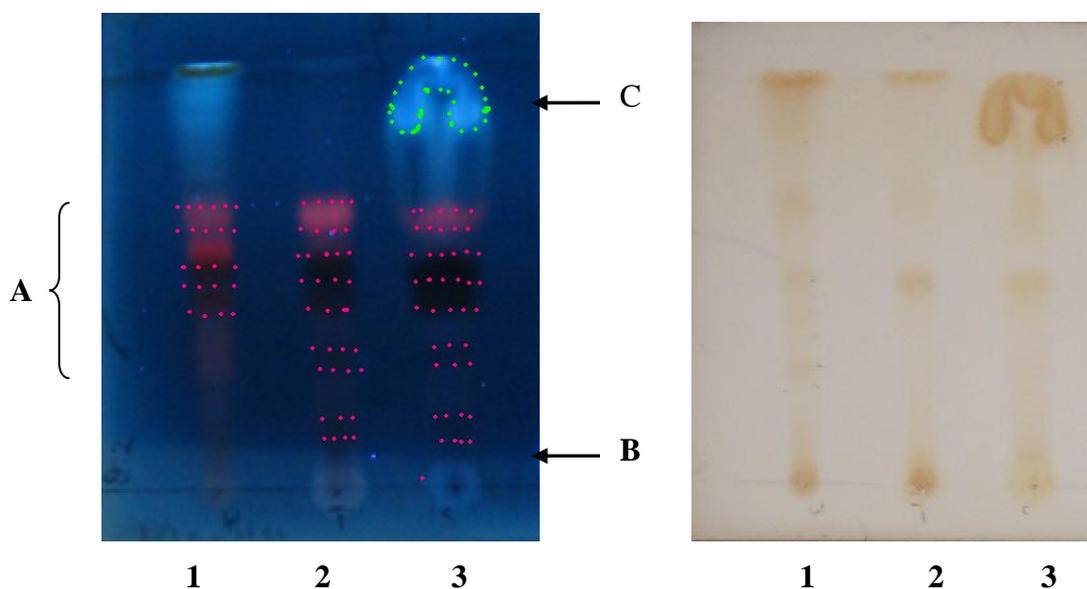
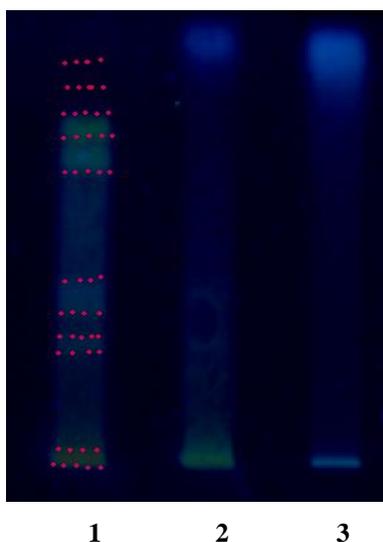


Figura 5. Placa cromatográfica del extracto hexánico, sistema de elusión hexano: acetato de etilo (8:2) bajo luz UV a longitud de onda de 356 nm (a la izquierda) y revelada con sulfato cérico (a la derecha). Carriles: 1.-hojas, 2.- tallos y 3.-frutos.

Por último en la zona de baja polaridad se observaron tres bandas pero con una diferencia en intensidad, siendo esta mayor para el extracto de hojas y frutos, cabe resaltar que la banda que caracterizó al extracto de fruto presentó el mismo perfil tanto en luz UV como al revelar con sulfato cérico (Figura 5).

En cuanto a la placa cromatográfica obtenida para los extractos hexánicos revelada con reactivo de productos naturales, se observaron similitudes en la zona de alta polaridad para los tres extractos, sin embargo se observa una mayor concentración de compuestos en el extracto de hoja y un mayor número de bandas distribuidas en todo el perfil cromatográfico (Figura 6).

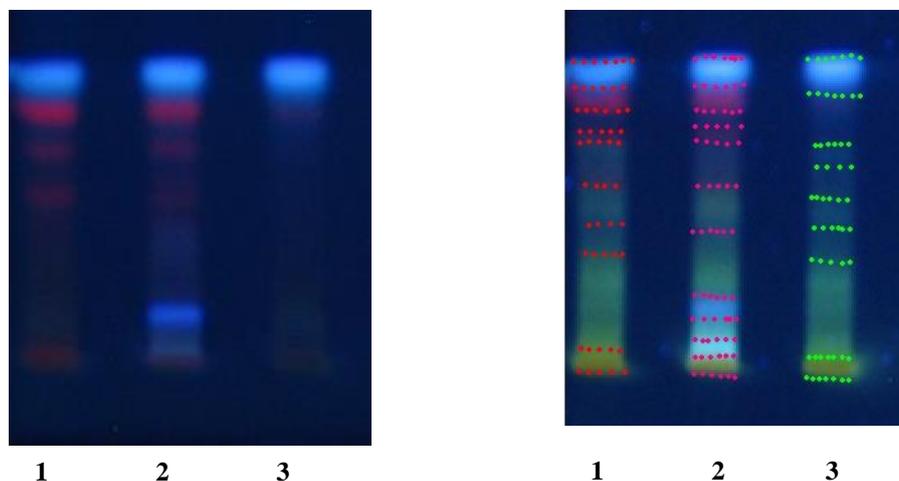


**Figura 6. Placa cromatográfica para los extractos hexánicos en sistema de elución hexano: acetato de etilo (5:5), revelada con reactivo de productos naturales. Donde los extractos están en los carriles 1-3, en la secuencia hojas, tallos y semillas.**

#### **5.4. Perfil cromatográfico de los extractos de acetato de etilo.**

La placa cromatográfica de los extractos de acetato de etilo observada bajo luz ultravioleta de 365 nm, muestra que existen algunas diferencias entre los perfiles obtenidos de los extractos de hojas, tallos y frutos (Figura 7).

Para el extracto de hojas se observaron un mayor número de bandas en la zona de menor polaridad, donde además la intensidad fue mayor, es decir, esto implica una mayor concentración de los compuestos y/o mezclas presentes en esa zona.



**Figura 7. Placa cromatográfica para el extracto de acetato de etilo en eluyente hexano: acetato de etilo 6:4, luz UV a longitud onda de 356 nm (a la izquierda) y revelada con reactivo de productos naturales (a la derecha). Carriles 1-3 de izquierda a derecha muestran los extractos en la secuencia hojas, tallos y frutos.**

El perfil de los extractos de tallos mostró una gran similitud en la zona de menor polaridad con el perfil del extracto de hoja, sin embargo en la zona de mayor polaridad se observaron bandas con mayor intensidad para el extracto de tallos, lo cual permite sugerir que este extracto tiene una mayor complejidad (mayor número de bandas), que posiblemente esté asociada con cualidades químicas diferentes a las que podemos encontrar en las hojas.

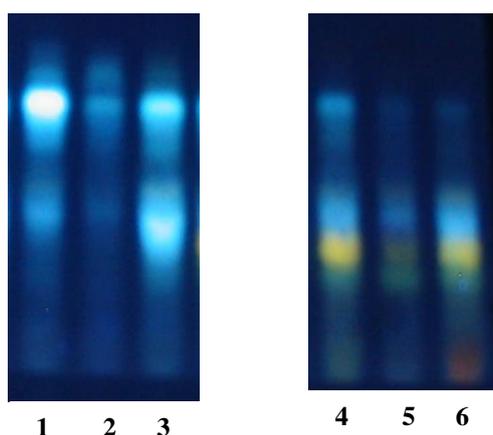
Se observó que algunos de los compuestos presentes en el extracto de hojas no están presentes en el extracto de frutos, y el extracto de tallos es totalmente diferente y es el que presentó un mayor número de bandas en el perfil cromatográfico.

Lo anterior se confirma al revelar la placa con reactivo de productos naturales donde observamos que nuevamente el extracto de tallos destacó por su perfil donde se encontraron un mayor número de bandas con una intensidad mayor y en segundo lugar, pero no con menor importancia, resalta el perfil del extracto de hojas que comparte similitudes tanto en la zona de baja como mediana polaridad y solo en la zona de mayor polaridad el perfil de tallos se mostró distinto, ya que se observaron bandas que no están presentes en el resto de los extractos de acetato de etilo (Figura 7).

Además en la placa cromatográfica de los extractos de acetato de etilo revelada con reactivo de productos naturales se observó la presencia de flavonoides (identificados por la coloración mostrada con el revelador específico) en cada una de las muestras, y se manifestaron con mayor intensidad en los extractos de hojas.

### 5.5. Perfil cromatográfico de los extractos metanólicos y acuosos.

La placa cromatográfica para los extractos metanólicos, revelada con reactivo de productos naturales mostró que los perfiles de hojas y frutos fueron similares entre sí, lo cual se aprecia en la intensidad y número de bandas presentes en la zona de baja y alta polaridad, a excepción de una banda en la zona de mediana polaridad que presentó mayor intensidad para el extracto de frutos. Para el extracto de tallos se observaron similitudes con los perfiles de hojas y frutos en la localización de las bandas, sin embargo la intensidad es menor (Figura 8).



**Figura 8. Placa cromatográfica de los extractos metanólicos y acuosos, en sistema de elusión Butanol: ácido acético: Agua (5:1:4), revelada con reactivo de productos naturales. Donde los carriles de derecha a izquierda representan: carriles 1-3 extractos MeOH de tres órganos de *D. viscosa*, 1.-Hojas, 2.- Tallos, 3.- Frutos; y del carril 4-6 se colocaron los extractos acuosos con la siguiente secuencia: 4.- Hojas, 5.- Tallos, 6.-Frutos.**

Por otro lado la placa cromatográfica de los extractos acuosos muestra que los perfiles de los tres órganos bajo estudio son similares, lo cual se observa en el número de bandas presentes en la zona de mediana y alta polaridad. Sin embargo, en el extracto acuoso de frutos destaca la presencia de una mancha color rojiza con una mayor intensidad en la zona de alta polaridad, la cual se aprecia con menor intensidad para los extractos de hojas y tallos. Es importante señalar que los perfiles de tallos y frutos continúan destacando por su complejidad química, ya que presentaron compuestos con la misma intensidad en las tres zonas de polaridad de la placa (Figura 8).

Si bien la polaridad del metanol y el agua son muy similares, los perfiles obtenidos para los extractos acuosos difieren de los extractos metanólicos en el número e intensidad de las bandas observadas, por lo cual se esperaría que dicha complejidad que caracteriza a los extractos acuosos esté relacionada con su actividad biológica y citotóxica.

Esto puede deberse a la forma de extracción, ya que se realizaron tres extracciones de 24 h cada una, por otro lado el tiempo de extracción acuosa fue menor, para evitar contaminación por bacterias y hongos. Sin embargo, se hace evidente la necesidad de realizar una extracción exhaustiva para el extracto acuoso.

### **5.6. Bioensayos de germinación.**

Los resultados obtenidos mostraron que los extractos de acetato de etilo fueron los más activos, al inhibir la germinación tanto a 10, 100 y 1000 ppm.

Para los extractos hexánicos se observó que el extracto de frutos presentó la mayor actividad sobre la inhibición de la germinación a 1000 ppm, las hojas y tallos presentaron una actividad similar.

En el caso de los extractos acuosos y metanólicos destacó la inhibición total de la germinación a 1000 ppm para la lectura a las 24 h.

A nivel de órgano se identificó que tanto en los extractos orgánicos como en los extractos acuosos los frutos fueron los más activos.

Para los extractos acuosos se obtuvo una disminución en el porcentaje de germinación a las 48 h en la concentración de 1000 ppm, en particular la inhibición fue mayor para los extractos de tallos y frutos.

Al comparar los resultados obtenidos para los extractos orgánicos y acuosos se apreció que los extractos acuosos fueron los más activos sobre la inhibición de la germinación desde 100 ppm a 24 horas e inhibiéndola casi totalmente a 1000 ppm, es decir, se detectó un efecto dosis-respuesta (Cuadro 4) en el cual al incrementar la concentración del extracto disminuye el porcentaje de germinación de las semillas de lechuga.

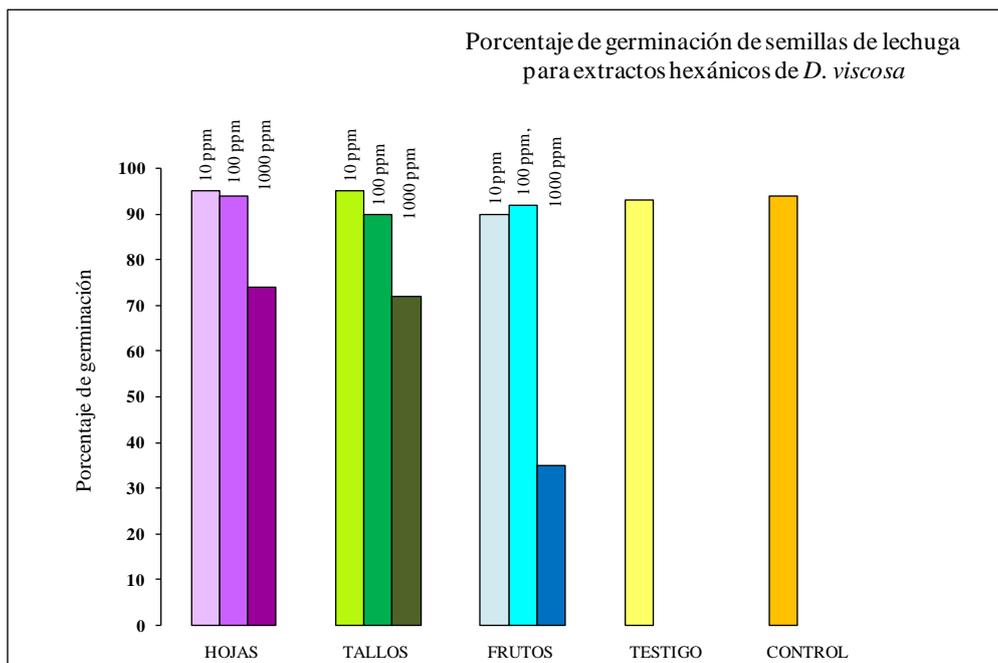
**Cuadro 4. Porcentajes de germinación de semillas de lechuga utilizando extractos de hojas, tallos y frutos de *D. viscosa* a diferentes concentraciones.**

EXTRACTO	ÓRGANO	CONCENTRACIÓN					
		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
HEXANO	<i>Hojas</i>	95	-	94	-	74	-
	<i>Tallos</i>	95	-	90	-	72	-
	<i>Frutos</i>	90	-	92	-	35	-
ACETATO DE ETILO	<i>Hojas</i>	56	84	46	90	0	77
	<i>Tallos</i>	64	93	54	91	17	89
	<i>Frutos</i>	73	97	16	75	0	63
METANOL	<i>Hojas</i>	63	80	69	79	0	50
	<i>Tallos</i>	89	95	67	95	0	54
	<i>Frutos</i>	88	93	81	93	0	13
AGUA	<i>Hojas</i>	35	95	10	90	0	4
	<i>Tallos</i>	40	95	25	90	0	4
	<i>Frutos</i>	60	95	20	95	0	6

En el caso de las concentraciones de 10 y 100 ppm para los extractos acuosos de tallos el porcentaje de germinación no sufrió modificaciones considerables, fue de 95 y 90 % respectivamente y para el extracto de frutos fue de 95 % en ambas concentraciones.

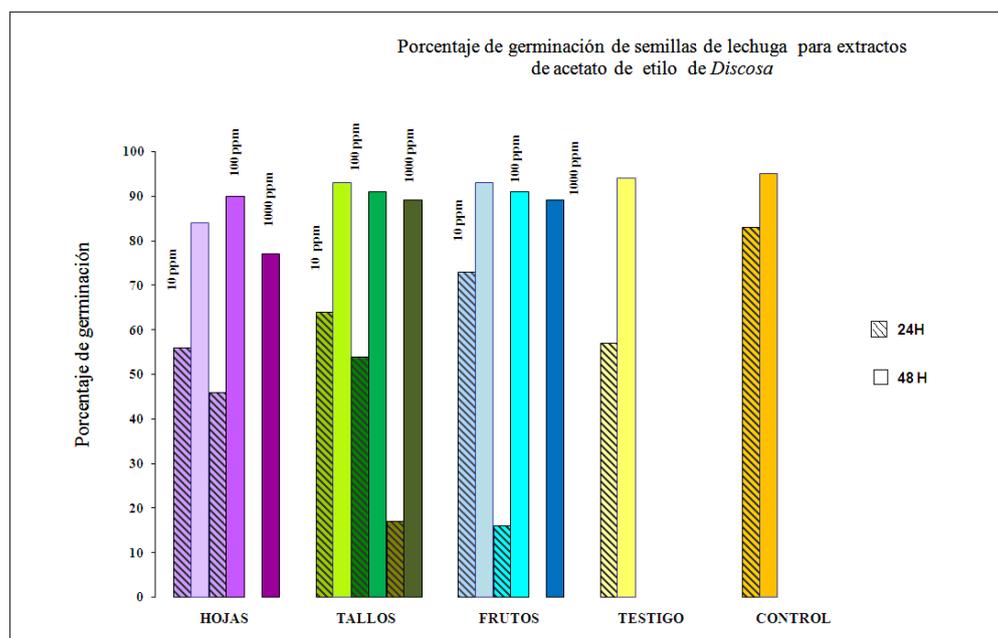
Se observó que al incrementar la polaridad de los extractos se produce una disminución en el número de semillas germinadas, por lo cual podemos afirmar que los compuestos secundarios que le confieren los efectos inhibitorios a la especie bajo estudio sean en su mayoría de naturaleza polar.

Para los extractos hexánicos, el porcentaje de germinación fue más bajo sobre todo para el extracto de frutos a 1000 ppm, donde se registró un 35 %, el cual representa un 65 % de inhibición (Figura 12).



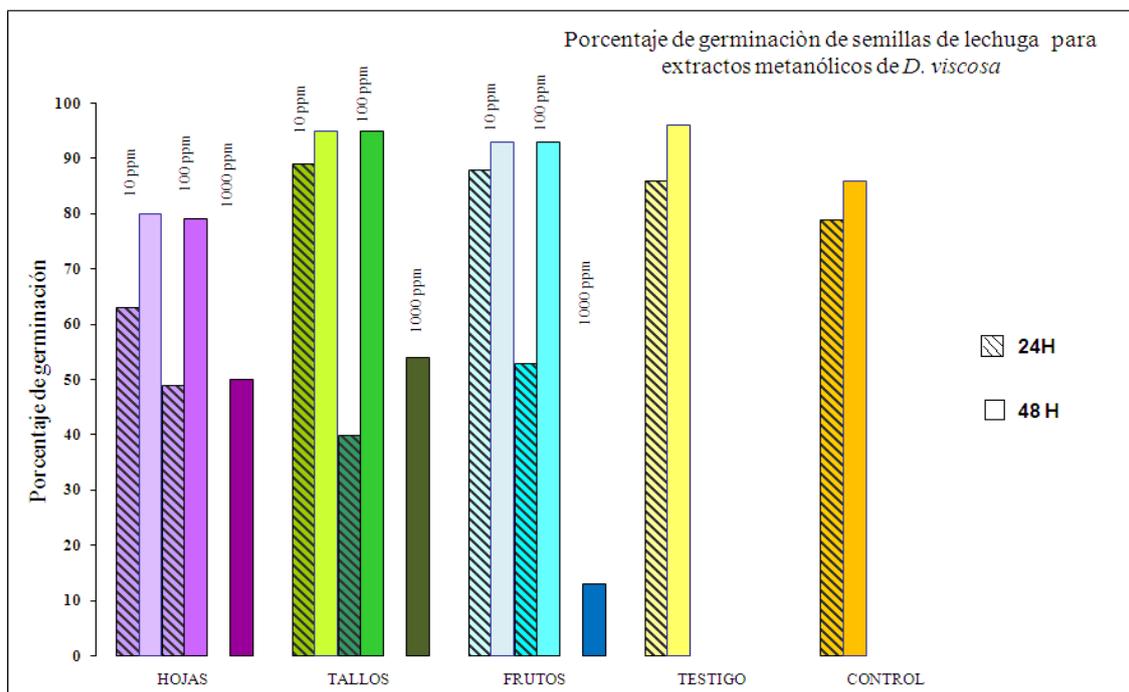
**Figura 12. Porcentajes de germinación de semillas de lechuga, utilizando extractos hexánicos de hojas, tallos y frutos de *Dodonaea viscosa*.**

En la Figura 13 se observa que en los extractos de acetato de etilo, para hojas y frutos se registró una inhibición total a una concentración de 1000 ppm a 24 h, pero después de 48 h se produce un cambio notable, incrementando la germinación en un 77 y 63 %, es decir, que suponemos que ocurre una degradación de los principios activos que le confieren la actividad alelopática.



**Figura 13 Porcentajes de germinación de semillas de lechuga, utilizando extractos de acetato de etilo de *Dodonaea viscosa*.**

En los extractos metanólicos se observó una inhibición total de la germinación a 1000 ppm a 24 h, y para los frutos sólo se obtuvo un ligero incremento en la germinación a las 48 h de 13 %, un valor que se puede considerar bajo en comparación con las concentraciones de 10 y 100 ppm (Figura 14).



**Figura 14. Porcentajes de germinación de semillas de lechuga, utilizando extractos metanólicos de hojas, tallos y frutos molidos y enteros de *Dodonaea viscosa*.**

En la figura 15 destaca la inhibición total de la germinación a una concentración de 1000 ppm a 24 h para los extractos acuosos. Después de 48 h, se obtuvieron los valores más bajos registrados durante el experimento, para hojas 4%, tallos 4% y frutos de 6 % (Cuadro 4).

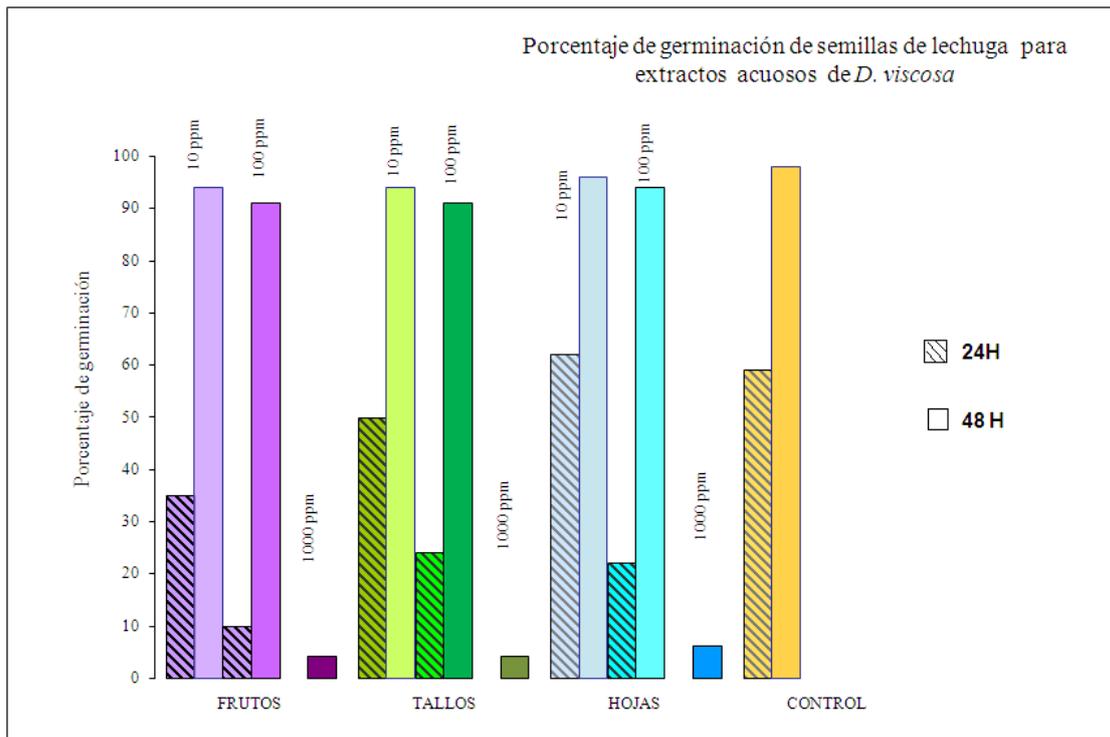


Figura 15. Porcentajes de germinación de semillas de lechuga, utilizando extractos acuosos de hojas, tallos y frutos molidos y enteros de *Dodonaea viscosa*.

El análisis de varianza aplicado a los resultados confirma que existen diferencias significativas entre el número de semillas germinadas de los extractos orgánicos y acuosos de todas las concentraciones probadas, donde los acuosos presentaron mayor actividad inhibitoria. Cabe resaltar que los extractos orgánicos tanto de acetato de etilo como metanólicos mostraron que es promisorio su estudio dada la actividad inhibitoria (Figura 9).

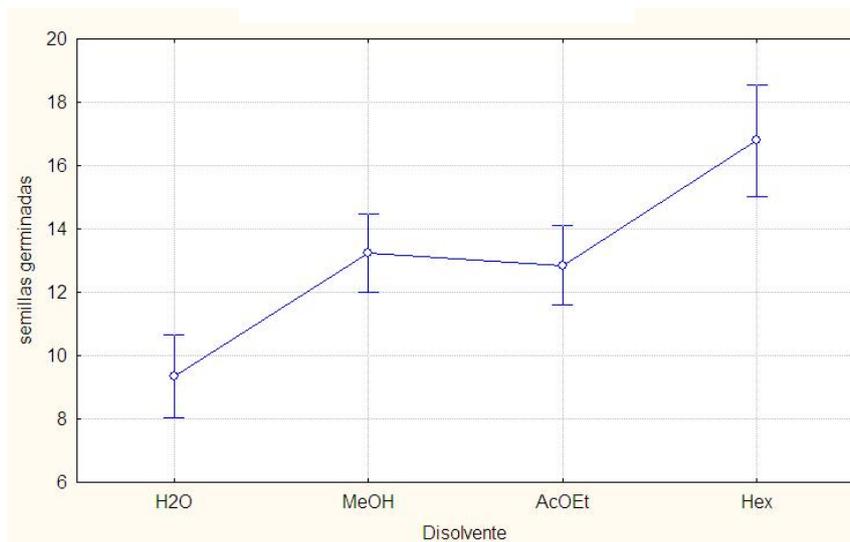
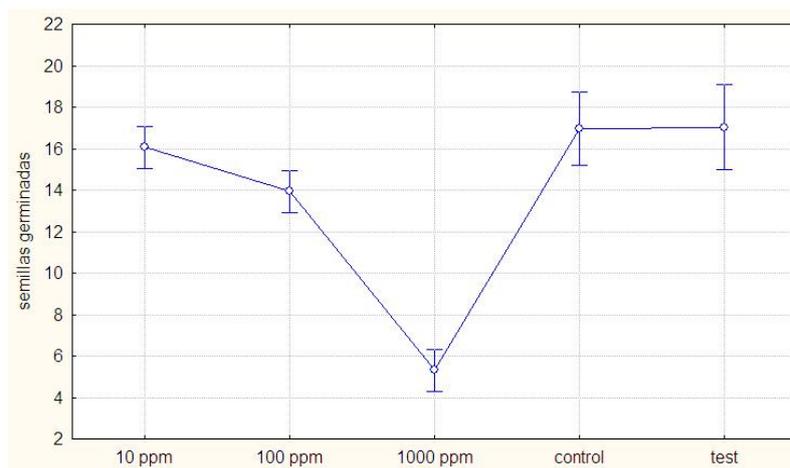


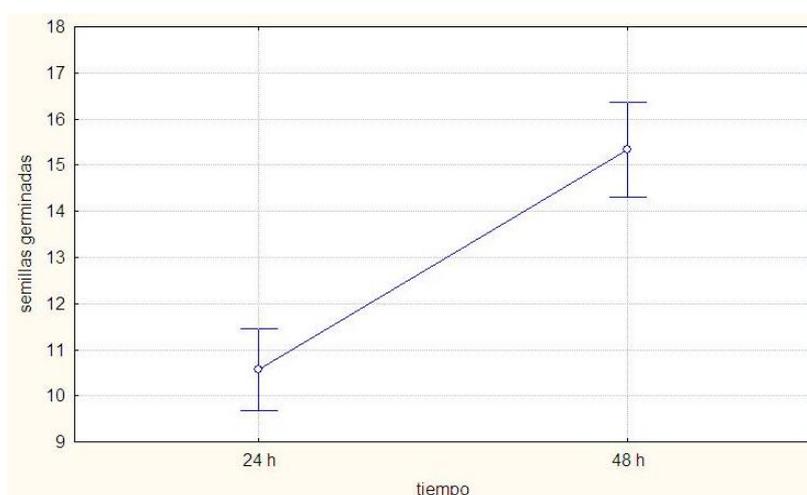
Figura 9. Efecto de los extractos orgánicos y acuosos sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* con ANOVA de una vía  $F(3, 371)=15.378, p < 0.05$ .

Así mismo el análisis estadístico aplicado permitió confirmar que para los extractos orgánicos y acuosos la concentración de 1000 ppm produce una inhibición significativa sobre la germinación, sin embargo debido al comportamiento de los datos para la concentración de 100 ppm se sugiere en futuros estudios considerar el análisis de la respuesta para diferentes dosis comprendidas en el intervalo entre 100 y 1000 ppm (Figura 10).



**Figura 10. Efecto de las tres concentraciones utilizadas en el bioensayo (10, 100 y 1000 ppm) sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* con ANOVA de una vía  $F(4, 370)=73.558, p < 0.05$ .**

En la figura 11, el estadístico reveló que existen diferencias significativas entre los tiempos de germinación, es decir, a 48 h disminuye el efecto inhibitorio, esto podría atribuirse a una degradación de los compuestos activos y a la respuesta fisiológica de la semilla debido al efecto retardante sobre la germinación. Por lo cual se sugiere en futuros estudios incluir el análisis de la velocidad de germinación, así como el crecimiento y vigor de las plántulas.

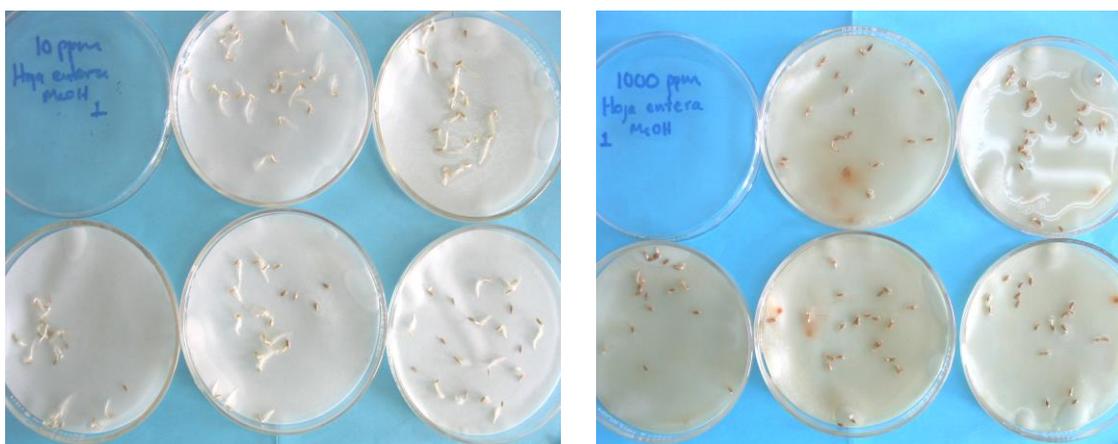


**Figura 11. Efecto del tiempo sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* con ANOVA de una vía  $F(1, 373)=47.327, p < 0.05$ .**

Al analizar los resultados es posible afirmar que existe una correlación entre la concentración de los extractos, la polaridad y la inhibición de la germinación, es decir, al incrementar la concentración y trabajar con los extractos de mayor polaridad se observó la inhibición gradual del porcentaje de germinación.

Se comprobó que los compuestos presentes en los extractos polares deben estar involucrados en el efecto alelopático que ha sido reportado para *D. viscosa* por Maraschin-Silva & Alves Aqûila (2005).

Es importante mencionar que la apariencia de las semillas de lechuga germinadas fue diferente para cada concentración utilizada, a 10 y 100 ppm en todos los extractos los cambios en la apariencia no fueron drásticos y la radícula presentó un tamaño y color similares a los controles, pero a 1000 ppm los cambios son notables, se observó una reducción en la elongación radicular así como un cambio de color, y en el caso de los extractos acuosos se formó un mucilago color café (Figura 16).



**Figura 16.** Semillas de lechuga germinadas a las 48 horas utilizando extracto metanólico de hojas de *Dodonaea viscosa* a dos concentraciones 10 ppm (imagen a la izquierda) y 1000 ppm (imagen a la derecha).

Cabe mencionar que las pruebas para identificación de metabolitos secundarios mostraron la presencia de glicósidos en los extractos acuosos tallos y frutos, lo cual sugiere que posiblemente este grupo se relacione con la inhibición de la germinación de las semillas de lechuga. Sin embargo, el efecto inhibitorio que producen los extractos acuosos no se debe únicamente a la presencia de glicósidos, ya que es muy probable que el efecto observado sea producto de la actividad de distintos compuestos que están presentes en los extractos obtenidos.

A pesar de que existen similitudes en el tipo de compuestos presentes en los extractos vegetales bajo estudio, cada órgano vegetal presenta una composición química propia que les

confiere una actividad biológica particular, lo cual se confirma con los perfiles cromatográficos obtenidos y los bioensayos de germinación.

Además como se ha reportado en la literatura, la síntesis de metabolitos secundarios está influenciada por diversos factores tanto bióticos como abióticos y que depende en gran medida de la formación de precursores primarios, en este sentido es posible que la planta “sea obligada” a elegir la forma en que debe invertir su energía, es decir, fotosintetizar o crear un complejo sistema de defensa física o química que le permita coexistir con otras especies y de esta manera incrementar su adecuación.

Visualizando este contexto, en el caso de *D. viscosa*, considerando que es una especie pionera y tolerante a medios estresantes gracias a sus características fisiológicas, se observa que en respuesta a las condiciones de su hábitat ha desarrollado diferentes estrategias para garantizar su supervivencia como especie y población, tales como la producción de metabolitos que le permitan evadir tanto la herbivoría como la defensa química contra otras especies vegetales.

Este efecto alelopático que se ha confirmado por medio de bioensayos de laboratorio para los extractos polares de tallos y frutos de *D. viscosa* aunado a la alta producción de frutos, puede relacionarse con el éxito de sus poblaciones en hábitats perturbados o donde otras especies no han conseguido éxito en su establecimiento y permanencia como lo ha logrado esta especie.

Estas cualidades pueden convertirla en una especie dominante y altamente resistente que podría afectar la diversidad y abundancia de otras especies.

Por lo anterior se recomienda realizar estudios alelopáticos en campo previos a la introducción de *D. viscosa* en ambientes perturbados con fines de restauración, ya que a largo plazo podría convertirse en una especie dominante que afecte el equilibrio del ecosistema.

### **5.7. Ensayos de supervivencia con *Artemia salina*.**

Debido a la naturaleza de la prueba (en solución salina), se decidió utilizar en este ensayo, únicamente los extractos de mayor polaridad, es decir, metanólicos y acuosos

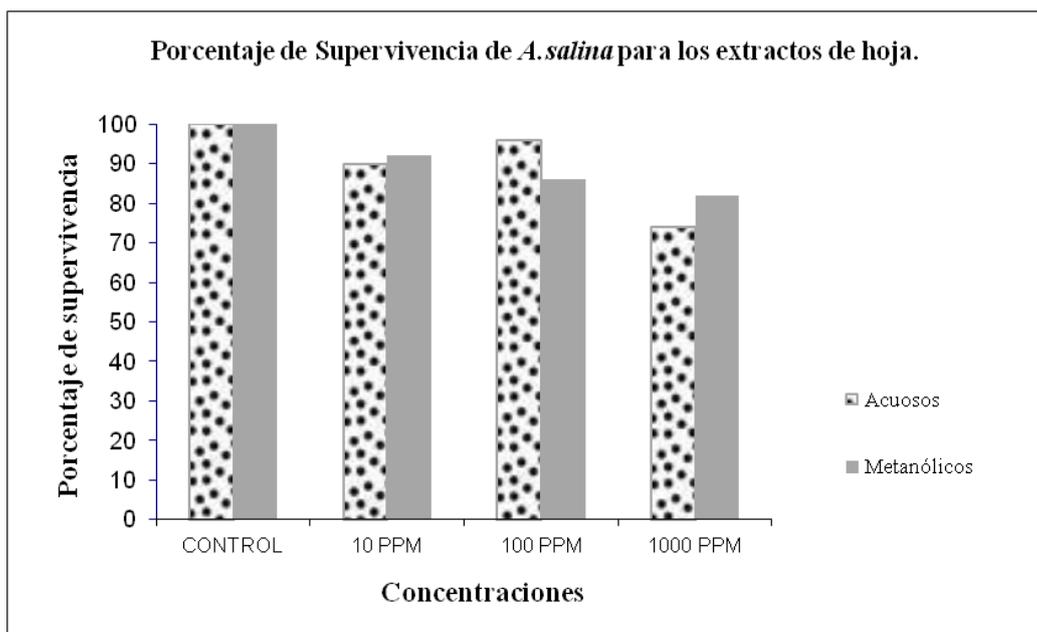
Para los extractos metanólicos se observó que el extracto de frutos presentó mayor toxicidad a partir de una concentración de 100 ppm., de la misma forma que en el extracto acuoso. Se observó que el número de artemias sobrevivientes fue menor para los extractos metanólicos

y acuosos de tallos y frutos a una concentración de 1000 ppm y además se detectó un efecto dosis- respuesta, como el descrito para los bioensayos de germinación.

**Tabla 5. Porcentajes de supervivencia de *Artemia salina* utilizando extractos metanólicos y acuosos de hojas, tallos y frutos de *D. viscosa*, a tres diferentes concentraciones.**

EXTRACTO	ÓRGANO	CONCENTRACIÓN			
		10 ppm	100 ppm	1000 ppm	CONTROL
MeOH	Hojas	92	86	82	100
	Tallos	86	0	96	100
	Frutos	100	100	42	98
AGUA	Hojas	90	96	74	100
	Tallos	98	100	0	100
	Frutos	100	100	48	100

Al analizar los resultados obtenidos por órgano, se observó que los extractos de hojas no modificaron la supervivencia de *A. salina* (Figura 17).



**Figura 17. Porcentajes de supervivencia de *A. salina* utilizando extractos acuosos y metanólicos de hojas.**

En el caso de los extractos de tallos y frutos se observó que únicamente para el extracto acuoso, se presentó una inhibición total sobre la supervivencia de *A. salina* a una concentración de 1000 ppm, a diferencia del extracto metanólico el cual mostró mayor actividad a partir de la concentración de 100 ppm (Figuras 18 y 19).

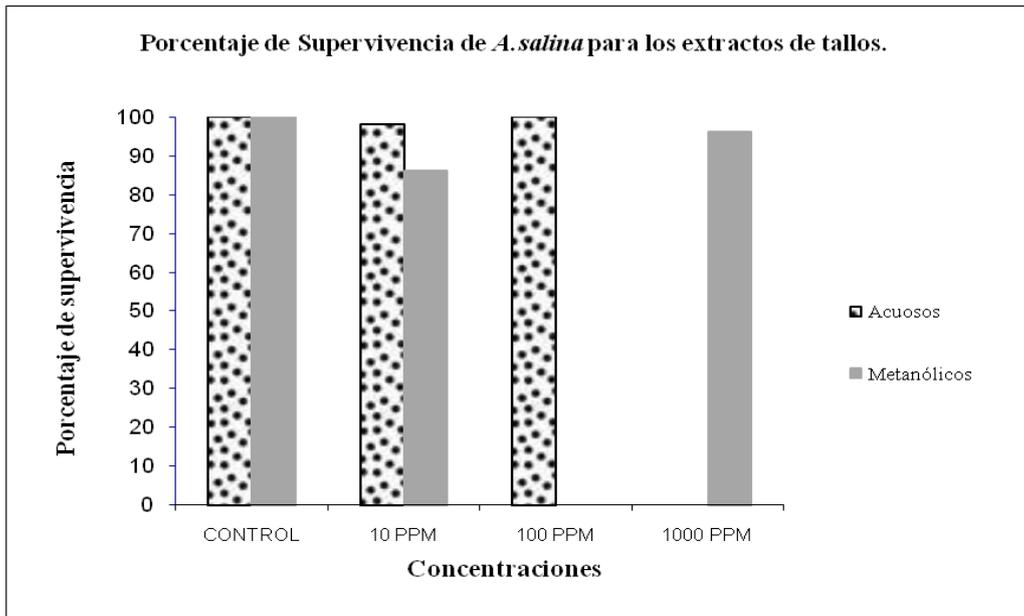


Figura 18. Porcentajes de supervivencia de *A. salina* utilizando extractos acuosos y metanólicos de tallos.

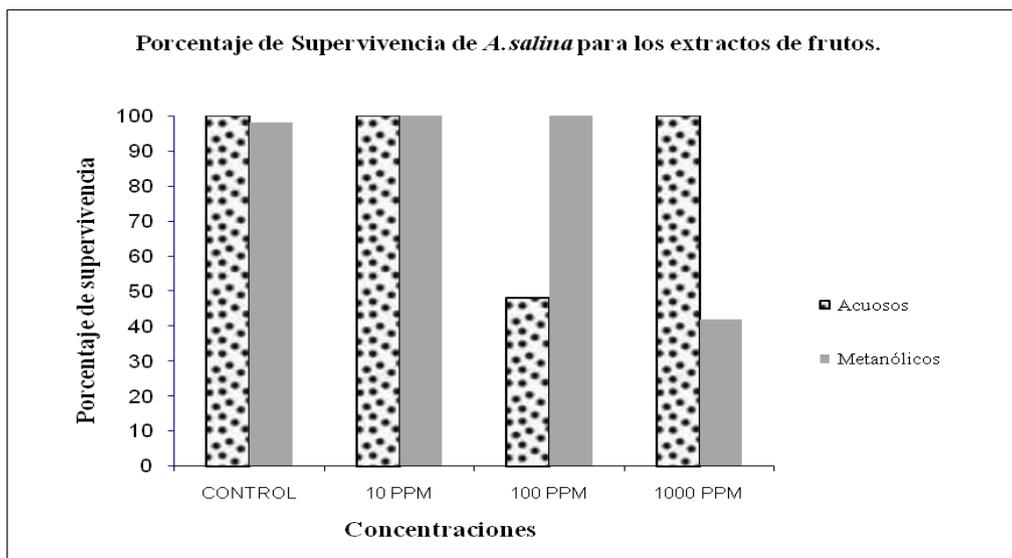


Figura 19. Porcentajes de supervivencia de *A. salina* utilizando extractos acuosos y metanólicos de frutos .

Es importante señalar que los resultados obtenidos en los bioensayos de germinación y en los ensayos de citotoxicidad con *Artemia salina* son muy similares, considerando que en ambos se detectó que los extractos acuosos de tallos y frutos presentaron una importante actividad citotóxica y posiblemente alelopática.

## 6. Conclusiones

---

- Se obtienen mayores rendimientos al utilizar extractos acuosos y metanólicos y se encontró que a nivel de órgano los extractos de hojas presentaron los mayores rendimientos.
- Con base en el análisis fitoquímico preliminar se confirma que *D. viscosa* es una especie con una compleja composición química caracterizada por la presencia de flavonoides, alcaloides, terpenos-esteroides y glicósidos, cuya concentración difiere a nivel de órgano y tipo de extracción.
- Los perfiles cromatográficos obtenidos mostraron que los extractos acuosos y metanólicos fueron los más complejos en cuanto a su composición química (número de bandas y presencia de metabolitos secundarios), y se asocia dicha complejidad con su actividad alelopática sobre la germinación de semillas de lechuga y su efecto citotóxico sobre *A. salina*.
- Con base en el análisis fitoquímico, los bioensayos de germinación y actividad biológica se confirma que los tres órganos analizados de *D. viscosa* presentan potencial alelopático y un efecto citotóxico asociado a compuestos secundarios principalmente de naturaleza terpenica, flavonoidica, alcaloidica y glicosidica..

Por lo tanto el presente estudio permite obtener un punto de partida para futuras investigaciones sobre el efecto alelopático de la especie en campo, ya que permitió identificar los extractos con mayor actividad biológica y alelopática, además de conocer los grupos de metabolitos secundarios que pueden estar involucrados con la toxicidad de la especie (terpenos-esteroides y flavonoides).

Es importante señalar que debido a que los extractos acuosos de tallos y frutos presentaron una mayor actividad biológica y alelopática durante los bioensayos de germinación y las pruebas con *A. salina*, se esperaría que en un medio natural dicho efecto pueda equipararse con un proceso de lixiviación por medio del cual *D. viscosa* libera sus metabolitos secundarios al ambiente.

Se recomienda continuar con trabajos a nivel de campo, en condiciones de invernadero utilizando extractos acuosos de tallos y frutos, considerando otras variables bióticas (herbivoría, interacción con otras especies vegetales, presencia de enfermedades) y algunos factores abióticos (estacionalidad, temperatura, humedad, características del suelo), que influyen sobre su efecto alelopático.

## 7. Bibliografía.

---

Anaya A.L. 1999. Metabolitos secundarios y conservación de recursos naturales. En: Orellana R., J.A. Escamilla, A. LarquéSaavedra (Eds.). 1999. Ecofisiología vegetal y conservación de recursos genéticos. Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Pp. 187-205.

Anilreddy B. 2009. Preparation, characterization and biological evaluation of some overview of *Dodonaea viscosa*.Linn. Journal of pharmaceutical science and technology 1(1): 1-9.

Arun M. y Asha V.V. 2008.Gastroprotective effect of *Dodonaea viscosa* on various experimental ulcer models.Journal of ethnopharmacology118(3): 460-465.

Ballester A. y Vieitez A.M. 1978.Estudio de potenciales alelopáticos en comunidades vegetales. Anales del Instituto Botánico A. J. Cavanilles 34(2): 715-722.

Begon M., Townsend C.R. y Harper J.L. 2006.Ecology: from individuals to ecosystems.4ª edición. Malden, Massachusetts: Blackwell. 752 p.

Comisión Nacional Forestal,*Dodonaea viscosa* L. Jacq. en:  
<http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/918Dodonaea%20viscosa%20.pdf>.  
Consultado el 23 de abril de 2013.

Crawley M.J. Editor. 1997. Plantecology. 2ª edición. Malden, Massachusets: Blackwell Science Ltd. 717 p.

Domínguez X.A. 1973.Métodos de investigación fitoquímica. D.F., México: Limusa. 281p.

Einhellig F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. Agronomy Journal 88(6):886-893.

Getie M., Gebre-Mariam T., Rietz R., Höhne C., Huschka C, Schmidtke M., Abate A. and Neubert R.H.H. 2003. Evaluation of antimicrobial and anti inflammatory activities if

medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia* 74 (1-2): 139-143.

Grime J.P. 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. New York, NY: Wiley. 222 p.

Inderjit y Del Moral R. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic?. *The Botanical review* 63(3): 221-230.

Khalil N.M., Sperotto J.S. and Manfron M.P. 2006. Antiinflammatory activity and acute toxicity of *Dodonaea viscosa*. *Fitoterapia* 77(6): 478-480.

Maraschin-Silva F. y Alves Aquila M.E. 2005. Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. *Iheringia* 60(1): 91-98.

Mata R., Contreras J.L., Crisanto D. Pereda-Miranda R. y Castañeda P. 1991. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XVIII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa*. *Journal of natural products* 54(3): 913-917.

Muller C.H. 1969. Allelopathy as a factor in ecological process. *Plant Ecology* 18(1):348-357.

Nugroho L. y Verpoorte R. 2002. Secondary metabolism in tobacco. *Plant cell, tissue and organ culture* 68(2):105-125.

Pengelly A. 2008. *Medicinal activity of Dodonaea viscosa- a preliminary study*. Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 32 p.

Reigosa M.J., Sánchez-Moreiras A. y González L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical reviews in plant sciences* 18(5):577-608.

Rice E.L. 1984. *Allelopathy*. 2ª edición. Orlando, FL: Academic Press Inc. 422 p.

Rizvi S.J.H. y Rizvi V. Eds. 1992. *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, UK: Chapman and Hall. 480 p.

Rojas A., Cruz S., Ponce-Monter H., Mata R. 1996. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. *PlantaMedica* 62: 154-159.

Sachdev K., & Kulshreshtha DK.1983. Flavonoids from *Dodonaea viscosa*.*Phytochemistry* 22: 1253-1256.

Teshome K., Gebre-Mariam T., Asres K. yEngidawork E. 2010. Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Dodonaea viscosa* used in Ethiopian traditional medicine. *Phytotherapy research* 24(1):60-69.

Wagner H., Ludwig C., Grotjahn L., y Khan M.S. 1987. Biologically active saponins from *Dodonaea viscosa*.*Phytochemistry* 26(3): 697-701.

Wardle D.A., Nilsson M.C.,Gallet C. y Zackrisson O. 1998. An ecosystem-level perspective of allelopathy. *Biological Reviews* 73(3):305-319.

Whittaker R.H. y Feeny P.P. 1971.Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* 171(3973): 757-770.