



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Biología.

Laboratorio de Química Vegetal y Biotransformaciones.

**Análisis fitoquímico de *Equisetum hyemale* L. y
evaluación de la actividad alelopática y bactericida de
sus extractos.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ANTONIO CHÁVEZ MONTERO.

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. F. LEONORA SÁNCHEZ

Y GARCÍA-FIGUEROA



México D.F., a 20 de Octubre de 2015.

PAPIME PE209015



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **CHÁVEZ MONTERO ANTONIO**, con número de cuenta **304115020**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **20 de octubre** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. ROSALVA GARCÍA SÁNCHEZ

VOCAL Dra. FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ Y GARCÍA FIGUEROA

SECRETARIO M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

SUPLENTE Biól. JUAN ROMERO ARREDONDO

SUPLENTE M. en C. VERÓNICA MITSUI SAÍTO QUEZADA

El título de la tesis que presenta es: **Análisis fitoquímico de *Equisetum hyemale* L. y evaluación de la actividad alelopática y bactericida de sus extractos.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 10 de septiembre de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

CULTURA Y ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN
V.O. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Química Vegetal y Biotransformaciones** de la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM** bajo la dirección de la **Dra. F. Leonora Sánchez y García-Figueroa** y fue financiado por la **DGAPA** a través del proyecto **PAPIME PE209015**.



Agradecimientos.

Gracias a Dios, por permitirme la dicha y gracia de poder vivir y realizar este sueño.

A mi madre Eloisa, a mi padre Constantino y a mi hermano Oscar, porque siempre están conmigo, por impulsarme cada día, porque gracias a ustedes soy el hombre que soy, por todo el cariño y apoyo prodigados y por todas los pequeños y grandes sucesos que hemos pasado y los que vendrán.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la cual agradezco pertenecer, en donde tuve la oportunidad de formarme como profesionista y ser humano. A mi Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la Carrera de Biología simplemente por ser las mejores.

A la DGAPA, por su apoyo económico a través del proyecto PAPIIME PE209015.

A la Dra. Leonora Sánchez y García Figueroa, por toda la confianza depositada en mí, por toda la paciencia y dedicación a la dirección de este trabajo, por permitirme trabajar con la planta de mi elección, por darme un "jalón de orejas" cuando fue necesario, por todo lo que he aprendido, por brindarme un espacio de trabajo y darme la oportunidad de estar frente a grupo. No tengo palabras suficientes para expresarle todo mi agradecimiento.

A tod@s mis profesoras y profesores que a lo largo de mi vida escolar han dejado en mí sus enseñanzas y consejos, los cuales han sido vitales para mi formación y la de muchos más.

A los sinodales por su valiosa contribución en la mejora y corrección de este escrito.

A Nicolás Lozano Jacinto "Chinto", por todos estos años de amistad y compañerismo, por hacerme reír, por escucharme y respetar mi punto de vista, por creer en mí cuando me faltaba confianza, por darme ánimos cuando más lo necesitaba; has sido como un hermano. Sigue esforzándote y serás el mejor profe' que exista.

A todos mis amigos y amigas de la facultad, a los que iniciamos juntos este camino, los que encontré en el transcurso del mismo, los que lo dejaron inconcluso y los que están por culminarlo. Gracias por todos esos momentos de compañerismo, risas, lágrimas y apoyo.

A mis compañer@s y amig@s del "Laboratorio de Química Vegetal y Biotransformaciones": Paty, Adán, Osvan, Luis Alberto, Vicky, Karla, Frank y Eli, por todos los momentos de trabajo y diversión compartidos, por aceptar mis consejos y orientación.

Agradecimiento especial a mi tío Domingo Montero Vega y a su familia por el apoyo prodigado.

Y por último a los "equisetos" (cola de caballo) sin los cuales esta investigación, en la que he puesto todo mi esfuerzo y corazón, carecería de inspiración y sentido. ☺ Con cariño:

Antonio.

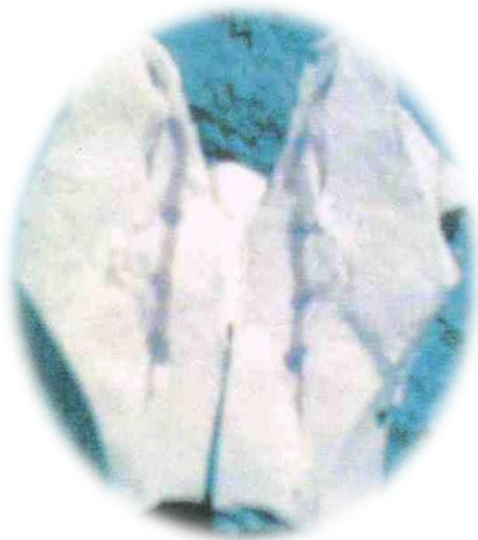
Dedicatoria.

Este trabajo de tesis está dedicado a:

Mi madre **Eloisa Montero Vega**. Por todo el amor y cariño incondicional hacia mi hermano y a mí. Por todos los sacrificios y trabajo realizados para sacarnos adelante, por cuidarnos de la mejor manera, por alentarnos siempre hacia la superación en lo personal y en lo profesional, porque siempre nos ha puesto antes que todo, por todo mami... un millón de gracias.

Mi padre **Constantino Chávez García**. Por todo su apoyo y cariño incondicional, por heredarme el amor por la música y el canto, por todos sus consejos y enseñanzas de vida.

Mi hermano **Oscar Chávez Montero**. Por ser el mejor hermano, por acompañarme siempre en las buenas y en las malas. Sigue adelante y serás uno de los mejores biólogos del mundo.



Impresión fósil del tallo de un Equiseto
Encontrado cerca del balneario los Ahuehuetes
en Puebla.



***Equisetum myriochaetum* Schltr & Cham.**
Fotografía tomada cerca del municipio de
Molango, estado de Hidalgo.

Los inicios de este sueño...

¿Has visto cuándo la luz del alba atraviesa sus tallos? Esos vivos fulgores esmeraldas y el suave matiz amarillo hacia sus nudos. Y cuando oscurece por la tarde, pareciera que guarda esa luz, la luz de la vida. Aún cuando anochece, representa el soplo de aliento que nos impulsa a continuar y el anhelo por vivir, por seguir sin importar los obstáculos y tristezas del camino. Se extiende y compite por su lugar en la Tierra. Se aferra a su existencia, al igual que el coraje, la furia, el valor, el cariño, el odio y el amor en los corazones de las personas. Nuestro amor, que al igual que los equisetos, se perfilará al infinito y se perpetuará en el tiempo... a través de los milenios.

Antonio.

Tomado de: "El rostro del anochecer";
De la serie: "El jardín de los helechos".



*No doy flores ni semillas
pero hervido en infusión
te quito las pesadillas
del problema del riñón.**

D. Benavides

*Para *Equisetum hyemale* L.

El presente trabajo fue presentado por partes en:

1st BIOTECHNOLOGY WORLD SYMPOSIUM

&

9º ENCUENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN.

Atlihuetzia Tlaxcala, México.

13-16 de Octubre de 2014.

Bajo el título: “Preliminary separation of allelochemicals and the allelopathic effect of *Equisetum hyemale* extracts on the germination of *Lactuca sativa* seeds”.

XIII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

FES ZARAGOZA, UNAM.

México D.F.

31 de Enero de 2014.

Bajo el título: “Análisis fitoquímico de *Equisetum hyemale* L y actividad alelopática de sus extractos”.

XV FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

FES ZARAGOZA, UNAM.

México D.F.

30 de Enero de 2015.

Bajo el título; “Actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de *Equisetum hyemale* L”.

ÍNDICE.

	Página
1 RESUMEN. -----	1
2 INTRODUCCIÓN. -----	2
3 MARCO TEÓRICO. -----	3
3.1 Etnobotánica de <i>Equisetum</i> sp.-----	4
3.2 Fitoquímica de <i>Equisetum</i> sp.-----	4
3.3 Actividad biológica de <i>Equisetum</i> sp.-----	9
3.4 Descripción botánica de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	11
3.5 Distribución de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	14
3.6 Alelopatía.-----	15
3.7 Antibiogramas.-----	16
3.7.1 Características de las bacterias empleadas.-----	17
4 JUSTIFICACIÓN. -----	19
5 OBJETIVOS. -----	20
6 HIPÓTESIS. -----	21
7 MATERIALES Y MÉTODO. -----	22
7.1 Obtención y determinación del material vegetal.-----	22
7.2 Obtención de los extractos orgánicos.-----	22
7.3 Fraccionamiento de los extractos orgánicos.-----	23
7.4 Obtención y saponificación del extracto CHCl ₃ .-----	23
7.5 Análisis por CG-masas de los extractos.-----	24
7.6 Evaluación de la actividad alelopática de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico.-----	25
7.7 Evaluación de la actividad bactericida de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico.-----	26
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN. -----	27
8.1 Rendimiento y fraccionamiento de los extractos orgánicos de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	27
8.2 Análisis mediante el sistema gases-masas.-----	29
8.2.1 Compuestos identificados por CG-M en el extracto hexánico de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	29
8.2.2 Compuestos identificados por CG-M de las fracciones 24-55 en el extracto de acetato de etilo de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	35
8.2.3 Compuestos identificados por CG-M de la fracción hexánica del extracto metanólico de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	40

	Página	
8.2.4	Compuestos identificados por CG-M de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	46
8.2.5	Compuestos identificados por CG-M de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	51
8.2.6	Análisis de espectroscopía en el infrarrojo del compuesto precipitado de la fracción metanólica del extracto metanólico.-----	57
8.3	Evaluación de la actividad alelopática de los extractos orgánicos de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	58
8.3.1	Porcentaje de inhibición y velocidad de crecimiento.-----	58
8.3.2	Compuestos con posible actividad alelopática (aleloquímicos).-----	59
8.3.3	Análisis estadístico entre las concentraciones.-----	61
8.4	Evaluación de la actividad bactericida de los extractos orgánicos de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	65
8.4.1	Inhibición del crecimiento bacteriano en <i>Escherichia coli</i> .-----	66
8.4.2	Inhibición del crecimiento bacteriano en <i>Bacillus cereus</i> .-----	68
8.4.3	Inhibición del crecimiento bacteriano en <i>Staphylococcus aureus</i> .-----	69
8.4.4	Inhibición del crecimiento bacteriano en <i>Staphylococcus epidermidis</i> .-----	71
8.4.5	Inhibición del crecimiento bacteriano en las bacterias Gram-negativas <i>Salmonella tiphy</i> y <i>Kleibsiella pneumoniae</i> .-----	73
8.4.6	Compuestos con posible actividad bactericida.-----	74
9	CONCLUSIONES -----	75
10	SUGERENCIAS .-----	76
11	BIBLIOGRAFÍA .-----	77
11.1	BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET .-----	87
12	ANEXOS .-----	88
12.1	Anexo I Ciclo de vida de los equisetos.-----	88
12.2	Anexo II Pruebas estadísticas.-----	89
12.3	Anexo III Cromatografía en capa fina (CCF) de las muestras analizadas mediante CG-masas, de los extractos de <i>E. hyemale</i> L.---	99
12.4	Anexo IV Dispersión de aleloquímicos en el ambiente.-----	100
12.5	Anexo V Pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.-----	100

ÍNDICE DE CUADROS.

	Página
Cuadro 1 Compuestos aislados en distintas especies del género <i>Equisetum</i> .-----	6
Cuadro 2 Clasificación taxonómica de <i>E. hyemale</i> .-----	11
Cuadro 3 Fórmulas para calcular velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición.-----	25
Cuadro 4 Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de 1 kg de <i>Equisetum hyemale</i> L. En el caso del extracto clorofórmico de 100g de planta.-----	27
Cuadro 5 Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo.-----	28
Cuadro 6 Fracciones obtenidas del extracto metanólico.-----	28
Cuadro 7 Compuestos identificados, mediante CG-M, del extracto hexánico de <i>Equisetum hyemale</i> L. -----	34
Cuadro 8 Compuestos identificados, mediante CG-M, de las fracciones 24-55 en el extracto de acetato de etilo de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	39
Cuadro 9 Compuestos identificados, mediante CG-M, de la fracción hexánica del extracto metanólico de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	45
Cuadro 10 Compuestos identificados, mediante CG-M, de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de <i>Equisetum hyemale</i> L.---	50
Cuadro 11 Compuestos identificados, mediante CG-M, de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico de <i>Equisetum hyemale</i> L.-	56
Cuadro 12 Compuestos con posible actividad alelopática identificados por el análisis de cromatografía de gases masas.-----	60
Cuadro 13 Resultados de la determinación de la actividad bactericida por el método de difusión de discos.-----	65
Cuadro 14 Compuestos con posible actividad bactericida, identificados por el análisis de cromatografía de gases masas.-----	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

	Página
Gráfica 1 Porcentaje de inhibición de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH), en concentraciones de 10, 50 y 100 mg/mL; en los días 1, 2, 7 y 8 sobre semillas de <i>Lactuca sativa</i> L.-----	58
Gráfica 2 Velocidad promedio de germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> L en los tratamientos de de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH), en concentraciones de 10, 50 y 100 mg/mL; en los días 1, 2, 7 y 8.-----	59
Gráfica 3 Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en <i>E. coli</i> por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH).-----	67
Gráfica 4 Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en <i>B. cereus</i> por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH).-----	68
Gráfica 5 Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en <i>S. aureus</i> por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH).-----	70
Gráfica 6 Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en <i>S. epidermidis</i> por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH).-----	72
Gráfica 7 Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en <i>S. tiphy</i> por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH).-----	73

ÍNDICE DE FIGURAS.

		Página
Figura 1	Morfología de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	12
Figura 2	Tallos estriados de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	13
Figura 3	Estróbilos de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	13
Figura 4	Mapa de distribución mundial de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	14
Figura 5	Mapa de distribución en México de <i>Equisetum hyemale</i> L.-----	14
Figura 6	Diagrama de extracción con disolventes de <i>E. hyemale</i> L.-----	22
Figura 7	Diagrama que muestra el acomodo de los discos en las pruebas de actividad bactericida. Concentración en mg/d (miligramos por disco).-----	26
Figura 8	Estructura química y espectro de masas del ácido n-hexadecanoico.-----	30
Figura 9	Estructura química y espectro de masas de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol.-----	30
Figura 10	Espectro de masas y estructura química de 11-deciltetracosano.-----	31
Figura 11	Estructura química y espectro de masas de 3,5-dieno-estigmastano.-----	32
Figura 12	Cromatograma del extracto hexánico.-----	33
Figura 13	Estructura química y espectro de masas de 2-dodecenal.-----	36
Figuras 14 y 15	Estructura química de 1,2-bencendicarboxilato de mono (2-etilhexilo) y 1,3-bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo).-----	36
Figura 16	Espectro de masas de 1,2-bencendicarboxilato de mono (2-etilhexilo).-----	36
Figura 17	Espectro de masas de 1,3-bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo).-----	36
Figura 18	Estructura química y espectro de masas de 2,4-bis-(1,1-dimetil-etil)-fenol.-----	37
Figura 19	Cromatograma de las fracciones 24-55 del extracto de acetato de etilo.-----	38
Figura 20	Estructura química y espectro de masas de (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrien-1-ol.---	40
Figura 21	Estructura química y espectro de masas de 1,14,17-eicosatrienoato de metilo.---	41
Figura 22	Estructura química y espectro de masas de tridecanoato de metilo.-----	42
Figura 23	Estructura química y espectro de masas de 1,6-anhidro- α -D-glucopiranososa (levoglucosan).-----	42
Figura 24	Estructura química y espectro de masas de fitol.-----	43
Figura 25	Cromatograma de la fracción extraída con hexano del extracto metanólico.-----	44
Figura 26	Estructura química y espectro de masas de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol.-----	46
Figura 27	Estructura química y espectro de masas de 1,2-bencendicarboxilato de mono(2-etilhexilo).-----	47
Figura 28	Estructura química y espectro de masas del ácido n-hexadecanoico.-----	47
Figura 29	Estructura química y estructura química y espectro de masas de 6,10-dimetil-2-undecanona.-----	48
Figura 30	Cromatograma de la fracción extraída con acetato de etilo del extracto metanólico.-----	49
Figura 31	Estructura química y espectro de masas de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.-----	51
Figura 32	Estructura química de 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido.-----	52
Figura 33	Espectro de masas de 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido.-----	53
Figura 34	Estructura química y espectro de masas de (Z)-9-octadecenamida.-----	53
Figura 35	Estructura química y espectro de masas de hentriacontano.-----	54

	Página
Figura 36	Estructura química y espectro de masas de 2-metilundecanal.----- 54
Figura 37	Cromatograma de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico.----- 55
Figura 38	Espectro de IR del precipitado del extracto metanólico.----- 57
Figura39	Bioensayo alelopático con el extracto hexánico de <i>E. hyemale</i> L.----- 62
Figura 40	Bioensayo alelopático con el extracto de acetato de etilo de <i>E. hyemale</i> L. 63
Figura 41	Bioensayo alelopático con el extracto metanólico de <i>E. hyemale</i> L.----- 64
Figura 42	Antibiograma de <i>E. coli</i> frente al extracto MeOH.----- 67
Figura 43	Antibiograma de <i>E. coli</i> frente al extracto AcOEt.----- 67
Figura 44	Antibiograma de <i>B. cereus</i> frente al extracto MeOH.----- 69
Figura 45	Antibiograma de <i>S. aureus</i> frente al extracto AcOEt.----- 70
Figura 46	Antibiograma de <i>S. aureus</i> frente al extracto Hex.----- 70
Figura 47	Antibiograma de <i>S. epidermidis</i> frente al extracto Hex.----- 72
Figura 48	Ciclo de vida de <i>Equisetum arvense</i> L.----- 88
Figura 49	CCF del extracto hexánico.----- 99
Figura 50	CCF de las fracciones 24 a 55 de la CCV del extracto AcOEt.----- 99
Figura 51	CCF de la fracción hexánica del extracto MeOH.----- 99
Figura 52	CCF de la fracción AcOEt del extracto MeOH.----- 99
Figura 53	CCF de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico.----- 99
Figura 54	Vías a través de las cuales se liberan los agentes aleloquímicos al entorno.----- 100
Figura 55	Esquema de las membranas celulares en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.----- 100

ABREVIATURAS.

AcOEt	Acetato de etilo.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CCV	Cromatografía en columna al vacío (flash).
CG-masas	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
CHCl₃	Cloroformo.
cm⁻¹	Centímetros a la inversa.
E.	<i>Equisetum</i> .
Fig.	Figura.
Hex	Hexano.
I.K.	Índice de Kovats.
IR	Espectroscopía en el infrarrojo.
KOH	Hidróxido de potasio (potasa).
L	Linneo.
MeOH	Metanol.
mg/d	Miligramos por disco de difusión.
mg/mL	Miligramos por mililitro.
T.R. (s)	Tiempo de retención en segundos.

**Análisis fitoquímico de *Equisetum hyemale* L. y
evaluación de la actividad alelopática y
bactericida de sus extractos.**

Antonio Chávez Montero.

1 RESUMEN

Equisetum hyemale L conocida como “cola de caballo”, es una planta que se reproduce mediante esporas y se encuentra ampliamente distribuida en México. Se comercializa en mercados y tiendas naturistas ya que tiene varias aplicaciones en medicina tradicional para tratar diversos malestares en el organismo (Gallardo, 2006).

En los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *Equisetum hyemale* L, por medio de la cromatografía de gases-masas se identificaron compuestos como ácido n-hexadecanoico; tridecanoato de metilo; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; (Z)-9-octadecenamida, entre otros.

Se evaluó el efecto alelopático y bactericida de los extractos de *Equisetum hyemale* L encontrando que inhibe la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L en concentraciones de 50 y 100 mg/mL y en concentración de 10 mg/mL, el desarrollo y crecimiento de las plántulas es raquítico. También presenta un efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* en concentraciones de 2, 10 y 20 mg/d.

2 INTRODUCCIÓN.

El género *Equisetum* conocido como cola de caballo, son plantas afines a las pteridophytas ampliamente distribuidas en el Hemisferio Norte. Se ha usado durante mucho tiempo en medicina tradicional en varios países.

Se ha reportado que *Equisetum arvense* L y *Equisetum variegatum* Schl. inhiben el desarrollo de gametofitos de otras especies del mismo género e impiden la germinación de semillas de otras plantas (Radulovic *et al.*, 2006; Husby, 2013).

Así mismo se ha demostrado que los metabolitos secundarios de *Equisetum arvense* L también ejercen efecto antibiótico contra bacterias y hongos, lo cual le ha proporcionado al género *Equisetum* una ventaja competitiva y la supervivencia de sus especies. (Radulovic *et al.*, 2006; García *et al.*, 2013).

En México *Equisetum hyemale* L es la especie más abundante y la población lo usa para contrarrestar enfermedades de los riñones y como antiinflamatorio.

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios de *Equisetum hyemale* L, que podrían ser responsables de las interacciones alelopática y bactericida, mediante el estudio de sus compuestos volátiles por cromatografía de gases, así como evaluar su efecto alelopático en semillas de *Lactuca sativa* L (lechuga) y su efecto bactericida en seis especies de bacterias.

3 MARCO TEÓRICO.

El género *Equisetum* comprende alrededor de 15 especies (Hauke, 1993), crecen en lugares fríos y húmedos. Se caracterizan por su tallo hueco y estriado con presencia de sílice en forma cristalina sobre la epidermis del mismo. Se les conoce como “cola de caballo”, en referencia a las raíces en su rizoma, que recuerdan a la cola de dicho animal (Hauke, 1993) otros nombres comunes que se le dan son: “equiseto”, “carricillo”, “yerba del platero”, “cola de rata”, “limpia plata”, “cien nudillos”, “candalilo”. Tienen un gran interés botánico, ya que está entre los géneros de plantas vasculares vivientes más antiguos del mundo (Hauke, 1963). Son plantas altas, perennes, de apariencia primitiva, que se extienden desde el centro de México hasta el centro de Argentina y Chile.

Una característica de las especies de *Equisetum* es la de absorber y acumular silicio en sus tejidos (5 - 10 % del peso seco de la planta), necesario para su crecimiento. El sílice (SiO_2) se acumula en la epidermis de la planta, dándole una textura áspera (Parsons y Cuthbertson, 1992). Esta característica es importante en la explicación de la no interacción entre insectos, hongos y especies del género *Equisetum* (Hauke, 1969). Otra ventaja es que el óxido de silicio toma formas orgánicas fácilmente metabolizables por la planta. Los cuerpos silíceos tienen gran aplicación en la nanotecnología para microencapsulación debido a sus propiedades ópticas (Neethirajan y Wang, 2009).

Las especies del género *Equisetum* están naturalmente distribuidas por casi todo el mundo, crecen en zonas húmedas, con baja incidencia en Australia y Nueva Zelanda donde son consideradas especies invasoras (Scagel *et al*, 1984).

3.1 Etnobotánica de *Equisetum* sp.

Esta planta tiene uso ornamental, como estropajo en las comunidades rurales, bioindicadores de contaminación y aplicaciones medicinales.

A manera de cocción se utiliza para aliviar daños renales y bajar de peso, lo que la ha llevado a su comercialización por diversas cadenas de productos naturistas, que lo ofrecen en cápsulas y comprimidos y en las yerberías, en las que se vende en trozos y seco (Gallardo, 2006).

Además tiene aplicaciones entre la población como diurético, para aliviar cáncer de estómago, hemorragias internas, desórdenes de vejiga, riñón y estómago. Contra la diarrea, cálculos renales, como cicatrizante para el tratamiento de heridas y úlceras, lavado de ojos y piel, con efecto antiinflamatorio, contra la fatiga y como relajante (Ramírez *et al.*, 2002; Gallardo 2006; Méndez *et al.*, 2009).

Diferentes estudios han demostrado algunas propiedades de esta planta. Como su efecto sedativo para sustituir ansiolíticos. También se encontró un efecto hipoglucemiante en ratas (Wiedelfeld *et al.*, 2000).

3.2 Fitoquímica de *Equisetum* sp.

Se le llama metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos de una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo. Los compuestos participantes en este metabolismo se denominan como metabolitos secundarios y su formación es a través del metabolismo primario. Son específicos según la especie y

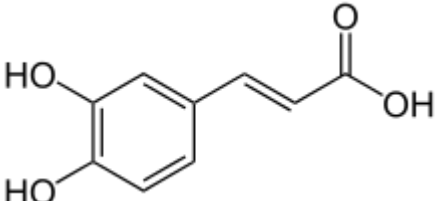
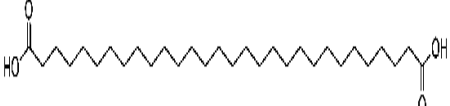
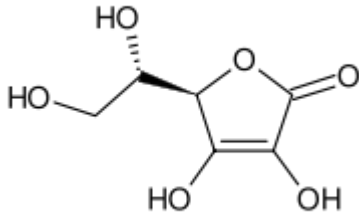
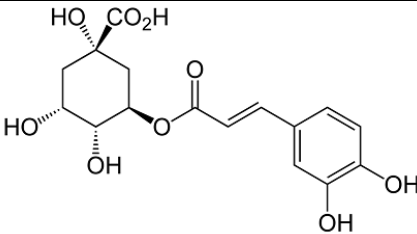
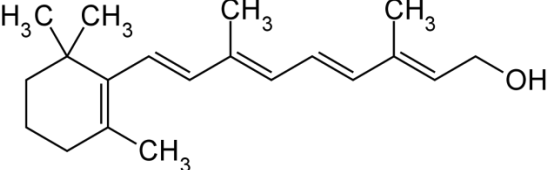
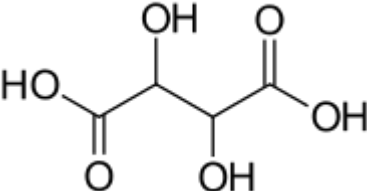
también se pueden definir como productos naturales. Los metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo para sobrevivir en un ecosistema particular (Ravelo y Braun, 2009).

Las características de los metabolitos secundarios son: no tener funciones directas con el desarrollo vegetativo de la planta. Presentar una distribución restringida y diferente en el reino vegetal. (Lock, 1994). Pueden ser divididos en tres grupos según la ruta biosintética que los origina: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (Kuklinski, 2000).

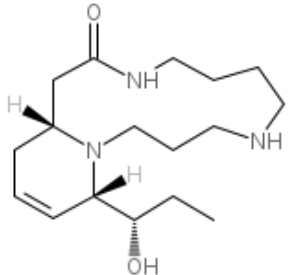
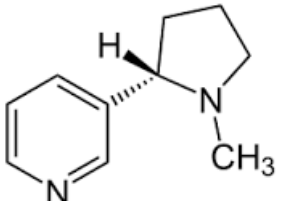
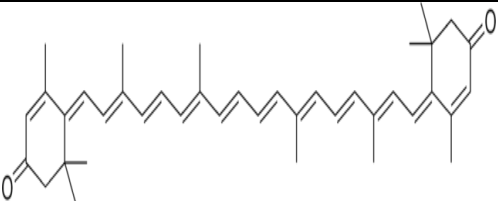
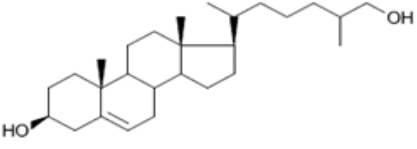
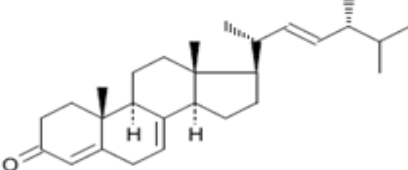
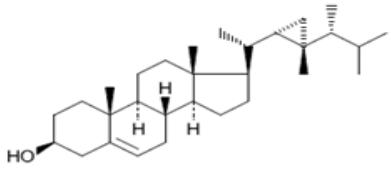
En los diferentes estudios fitoquímicos realizados en el género *Equisetum* se han encontrado alcaloides, fenoles, taninos, saponinas, terpenos, fitoesteroles y aminoácidos (Navdeep, 2010).

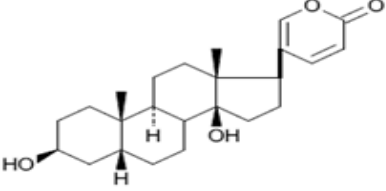
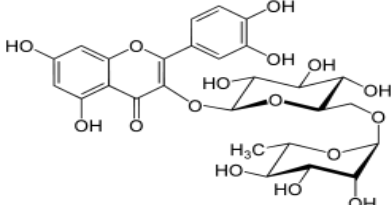
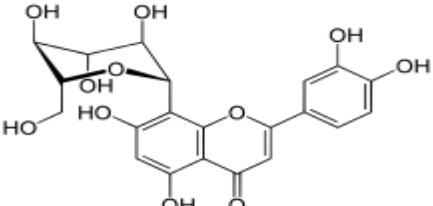
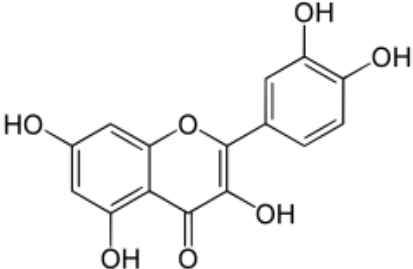
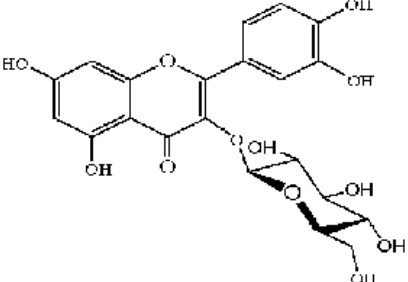
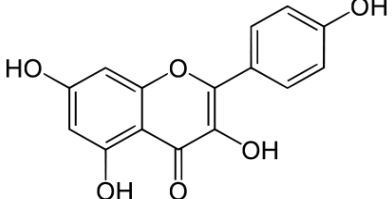
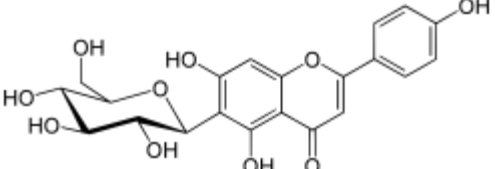
Entre los compuestos que se han identificado están: ácido cafeico, ácido tartárico, ácido poliénico (Neda, 2008), tiaminasa (Gallardo, 2006), colesterciferol, rutina, ácido clorogénico, isoquercitrina, isovitexina, orientina, homoorientina (Stoliar, 2009) y ácidos grasos de cadena larga (Lytle y Server, 1976; Rezanka, 1998). También está el ácido equisetólico, que se encuentra en los conos y esporas de la planta, incluso se ha extraído de los fósiles de estas plantas (Bonnet *et al*, 1972). En el cuadro 1 se muestran las estructuras de algunos compuestos identificados en diferentes especies del género.

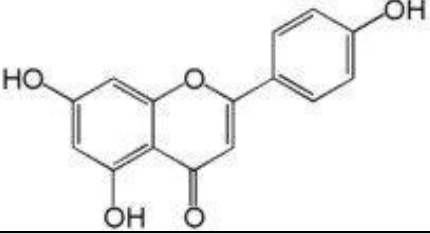
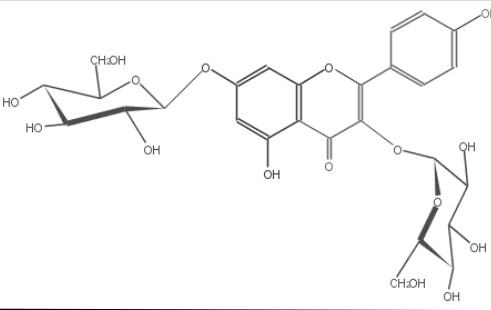
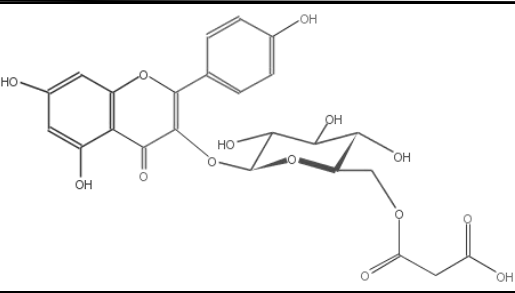
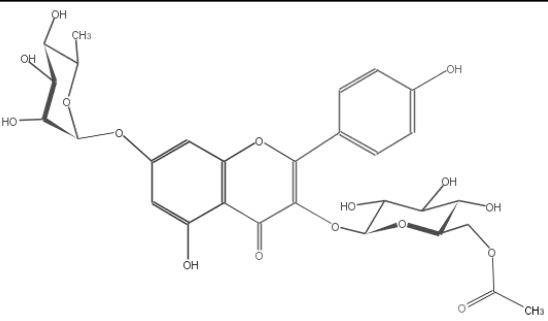
Cuadro 1. Compuestos aislados en distintas especies del género *Equisetum*.

Nombre del compuesto	Estructura química	Especie	Referencia
Ácido cafeíco		<i>E. arvense</i> <i>E. giganteum</i>	Canadanovic-Brunet et al., 2009 Stoliar, 2009
Ácido equisetólico		<i>E. arvense</i> <i>E. temalteia</i>	Bonnett et al., 1972
Ácido ascórbico		<i>E. arvense</i>	Mello y Budel, 2014
Ácido clorogénico		<i>E. giganteum</i>	Stoliar, 2009
Ácido poliénico		<i>E. giganteum</i>	Stoliar, 2009
Ácido tartárico		<i>E. giganteum</i>	Stoliar, 2009

Análisis fitoquímico de *Equisetum hyemale* L y evaluación de la actividad alelopática y bactericida de sus extractos.

Palustrina		<i>E. palustre</i>	Phillipson y Melville, 1960
Nicotina		<i>E. palustre</i> <i>E. arvense</i>	Phillipson y Melville, 1960
Rodoxantina		<i>E. hyemale</i> <i>E. arvense</i>	Cyronak et al, 1977
26-hidroxicolesterol		<i>E. giganteum</i>	Guerra et al., 2010
Ergosta-4,7,22-trien-3-ona		<i>E. giganteum</i>	Guerra et al., 2010
Gorgost-5-en-3β-ol		<i>E. giganteum</i>	Guerra et al., 2010

3,14-dihidroxi- bufa-20,22- dienolido		<i>E. giganteum</i>	Guerra <i>et al.</i> , 2010
Rutina		<i>E. giganteum</i>	Stoliar, 2009
Orientina		<i>E. giganteum</i>	Stoliar, 2009
Quercetina		<i>E. arvense</i>	Neda, 2008
Isoquercetina		<i>E. giganteum</i>	Stoliar, 2009
Kaemferol		<i>E. myriochaetum</i>	Wiedenfeld <i>et al.</i> , 2000
Isovitexina		<i>E. giganteum</i>	Stoliar, 2009

Apigenina		<i>E. giganteum</i>	Neda, 2008
3,7-diglucósido-kaemferol		<i>E. variegatum</i> <i>E. hyemale</i>	Saleh <i>et al</i> , 1972
3-O-(6''-O-malonilglucósido)-kaemferol		<i>E. fluviatile</i>	Veit <i>et al</i> , 1996
3-O-(6''-O-acetilglucósido)-7-O-rhamnósido-kaemferol		<i>E. temalteia</i>	Veit <i>et al</i> , 1996

3.3 Actividad biológica de *Equisetum* sp.

Existen numerosos ensayos sobre la actividad antibacteriana de *E. giganteum* L, se encontró sólo una débil actividad de sus extractos en las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Paz *et al.*, 1995).

El extracto acuoso de *E. giganteum* L registró una débil actividad antiviral contra el virus VIH (Abdel *et al.*, 1996). Los extractos de acetato de etilo y metanólicos de esta

misma especie mostraron actividad en el factor de crecimiento nervioso y actividad débil, en estudios utilizando cultivos de células (PC12) (Li y Ohizumi., 1999).

El aceite esencial de *Equisetum arvense* L mostró actividad bactericida sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. También presentó actividad antifúngica sobre *Candida albicans*, y *Aspergillus niger* (Radulovic *et al.*, 2006).

Los extractos hidroalcohólicos de *E. arvense* L, *E. sylvaticum* L, *E. fluviatile* L, *E. palustre* L, *E. temalteia* M. (Hau). Inhibieron el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Milovanović *et al.*, 2007). Los extractos butanólicos de *E. giganteum* L fueron muy activos como relajantes musculares suaves en pruebas realizadas en conejos y una actividad moderada con los extractos acuosos (Matsunaga *et al.*, 1997).

El extracto hexánico de *E. hyemale* L inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Canales *et al.*, 2005).

En cuanto a la alelopatía se ha demostrado que los esporofitos de *E. silvaticum* L inhiben el desarrollo de gametofitos de otras especies de *Equisetum* (Milton y Duckett, 1985). Los extractos acuosos impiden la germinación de semillas y desarrollo de las plántulas de pasto. *E. arvense* L y *E. palustre* L ejercieron efecto alelopático sobre *E. variegatum* Schl. (Husby, 2013).

Los extractos acuoso y butanólico de las partes aéreas de *Equisetum myriochaetum* Schltr & Cham tuvieron efecto hipoglucémico en ratas diabéticas (Andrade *et al.*, 2000).

3.4 Descripción botánica de *Equisetum hyemale* L.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *E. hyemale* (CONABIO,2005)

Reino	Plantae
División	Equisetophyta
Subdivisión	Sphenophyta
Clase	Equisetópsida
Orden	Equisetales
Familia	Equisetaceae
Género	<i>Equisetum</i>
Especie	<i>Equisetum hyemale</i>

Presenta tallos erectos en general no ramificados, 1.5 a 2 m de alto, 0.2 a 1.5 cm de diámetro, con 15 a 40 costillas, ligeramente rugosos (Fig. 1). Estomas dispuestos en una línea a cada lado de los surcos. Vainas desde la base del tallo hasta el ápice, casi tan largas como anchas, con 2 bandas pardo oscuras, una en el margen superior y la otra en la parte media, de color cenizo entre las dos bandas, dientes apiculados usualmente persistentes. Ramas de tallos viejos más delgadas que los tallos principales, con estróbilos, por lo demás similares (Fig. 2). Estróbilos ovoides, terminales en tallos y ramas, amarillos a negros, apículo prominente negro (Fig. 3). Esporas normales. Número cromosómico $2n = 216$. (Riba, 1996; Mickel y Smith, 2004)

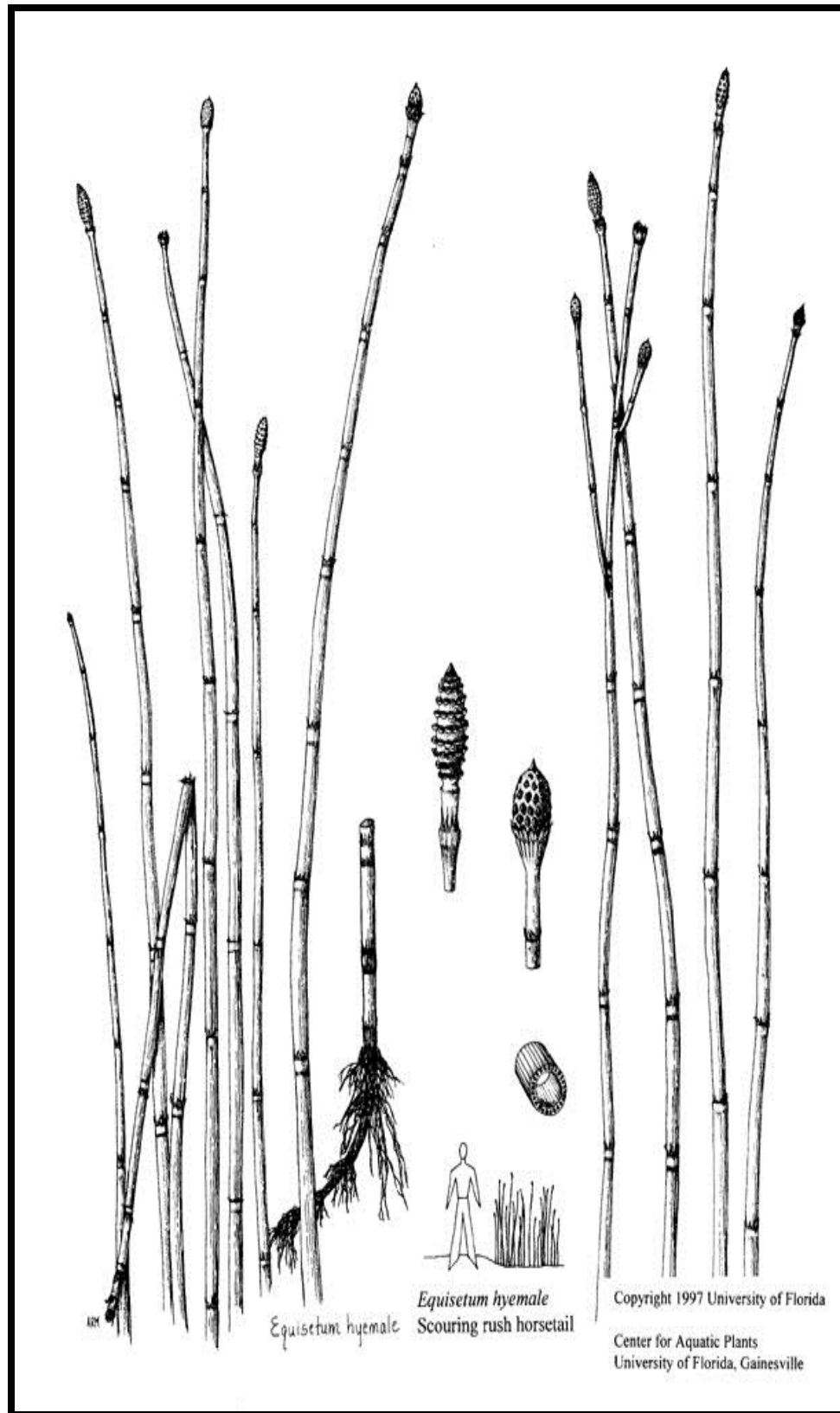


Fig. 1 Morfología de *Equisetum hyemale* L (Tomada de <http://plants.ifas.ufl.edu/node/153>)



Fig. 2 Tallos estriados de *Equisetum hyemale* L.
(Tomada de <http://brilliantbotany.com>)



Fig. 3 Estróbilos de *Equisetum hyemale* L.
(Tomada de <http://brilliantbotany.com>)

3.5 Distribución de *Equisetum hyemale* L.

Distribución: De Alaska a Guatemala en América, Europa y en el este de Asia (Fig. 4). En México se encuentra ampliamente distribuido por toda la república (Fig. 5). (Mickel y Smith, 2004). Hábitat: En sitios húmedos cerca de arroyos o filtraciones. En elevaciones de 1900-2000 msnm.



Fig. 4 Mapa de distribución mundial de *Equisetum hyemale* L. (Tomado de www.discoverlife.org)

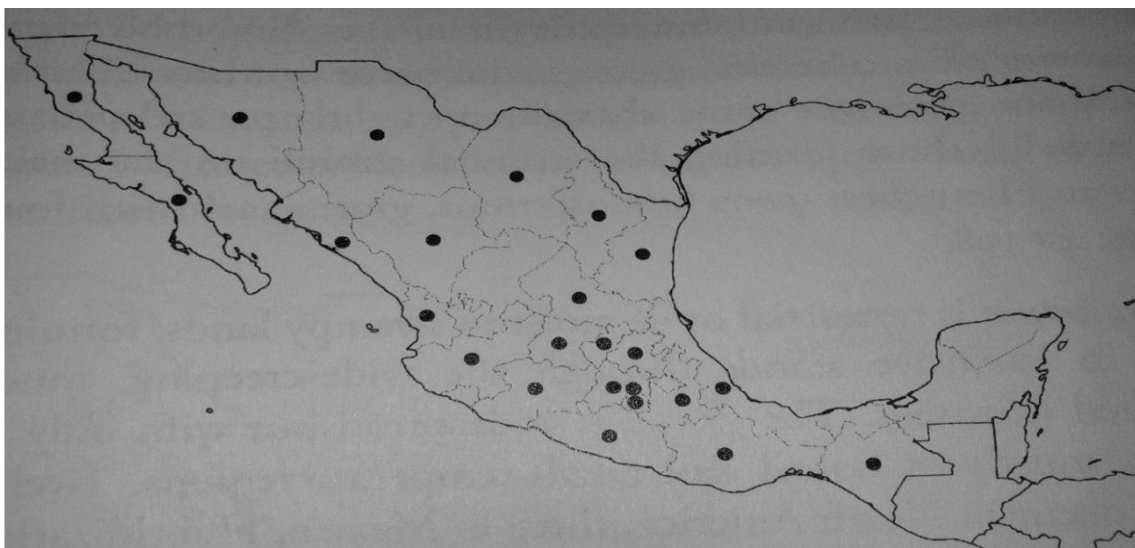


Fig. 5 Mapa de distribución en México de *Equisetum hyemale* L. (Tomado de Mickel y Smith, 2004).

3.6 Alelopatía.

La alelopatía es un proceso por el cual las plantas se proporcionan una ventaja competitiva a sí mismas. Consiste en la deposición de metabolitos secundarios que actúan como fitotoxinas. Se define como: “Cualquier efecto directo o indirecto dañino o beneficioso que ejerce una planta sobre otra a través de la producción de compuestos químicos que escapan al ambiente” (Birkett *et al.*, 2001).

La planta que tiene potencial alelopático se define como donadora, mientras que la planta receptora es la que resulta afectada por dichos compuestos los cuales se denominan aleloquímicos (Ver Anexo IV) (Bai *et al.*, 2012).

Los bioensayos en alelopatía evalúan la bioactividad por efecto en la germinación, crecimiento y posterior desarrollo de la plántula. Estos parámetros son aceptados como medidas indirectas de otros procesos fisiológicos afectados mediante la interacción química. De esta manera es posible seleccionar compuestos que se pueden evaluar en estudios posteriores (Zamorano, 2006).

Las semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L) son uno de los organismos más utilizados en la alelopatía, ya que presentan una germinación rápida y uniforme, presentan gran sensibilidad a gran variedad de aleloquímicos especialmente a bajas concentraciones de los mismos; son accesibles en cuanto a disponibilidad y costos (Sampietro, 2002).

3.6.1 *Lactuca sativa* L.

Es una hortaliza típica de climas frescos. Los rangos de temperatura donde la planta crece en forma óptima, están entre los 15 °C y 18° C, con temperatura máximas de 21°C -

24 °C y mínima de 7° C, es una planta anual. Las temperaturas altas aceleran el desarrollo del tallo floral y la calidad de la lechuga se deteriora rápidamente, debido a la acumulación de látex amargo en su sistema vascular. La raíz, que no sobrepasa los 25 cm de profundidad, es pivotante, corta y con ramificaciones (FAO, 2006).

3.7 Antibiogramas.

Un antibiograma es el resultado de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* llevadas a cabo para conocer el comportamiento de un microorganismo frente a determinados antibióticos o productos naturales, sus resultados se expresan en términos de sensibilidad y resistencia (Hernández, 2013).

Se dice que el microorganismo es sensible cuando su crecimiento es inhibido por una concentración de antimicrobiano y resistente cuando no hay inhibición en su crecimiento por el agente antimicrobiano (Cantón, 2010).

Su importancia radica en el hecho de poder llevar a cabo una terapia antibiótica correcta en pacientes con infecciones bacterianas (Sánchez y Feris, 1998).

No todas las bacterias tienen la misma sensibilidad a los principios activos, por lo que es importante realizar distintas determinaciones y buscar metabolitos secundarios que representen una alternativa donde los tratamientos con fármacos generaron resistencia bacteriana.

Según lo reportado en la literatura, los metabolitos secundarios que presentan un efecto bactericida son: terpenos (Meyer *et al.*, 2002; Radulovic *et al.*, 2006; Raman *et al.*, 1995),

ésteres (Agoramoorthy *et al.*, 2007), flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005; Shelef, 1984) y alcaloides (Reza y Abbas., 2007; Urban *et al.*, 1999).

3.7.1 Características de las bacterias empleadas.

3.7.2 *Escherichia coli.*

Bacilo Gram-positivo con forma de bastón, móvil, anaerobio, capaz de crecer a 44°C; pertenece a la familia de las enterobacteriaceas, habita comúnmente en el intestino de los mamíferos, aunque no siempre es inofensivo en este sitio pues puede producir gastroenteritis, además de infecciones en vías urinarias y es el principal patógeno de la diarrea del viajero (Stainer *et al.*, 1981; Duerden *et al.*, 1993; Koneman, 2003).

3.7.3 *Bacillus cereus.*

Prototipo de la familia bacillaceae, bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, generalmente son móviles con flagelos peritricos. Su temperatura de crecimiento se encuentra en un rango de 5°C a 55°C, el rango de pH va de 4.5 a 9.3. Produce dos tipos de infecciones alimentarias: la forma diarreica y la forma emética produce vómitos y náuseas (Koneman *et al.*, 1992).

3.7.4 *Staphylococcus aureus.*

Microorganismos Gram-positivos de forma esférica con diámetro de 0.7 a 1µm, que se disponen en racimos; localizados en la mucosa nasal anterior, en la garganta del 40 al 50%; en las heces están en un 20% y en la piel de un 5 al 10% de los adultos sanos. Destruye las

células fagocíticas, constriñe los músculos lisos, paraliza las paredes de los vasos sanguíneos, y es dermonecrótica (Carpenter, 1979; Duerden *et al.*, 1993)

3.7.5 *Staphylococcus epidermis.*

Especie del género *Staphylococcus*, consistente en bacterias con forma de cocos, Gram positivos, arreglados en grupos. Es la causa más frecuente de infecciones en cuerpos extraños implantados (catéteres intravasculares, catéter de la diálisis peritoneal ambulatoria). Ocasiona las siguientes infecciones: cistitis, septicemia, endocarditis, endoftalmitis (Granados y Villa Verde, 1996; Koneman *et al.*, 1992).

3.7.6 *Salmonella tiphy.*

Son Gram negativas, de forma bacilar. Puede causar infecciones con carácter entérico, tipo fiebres tifoideas o paratifoideas que pueden originar en casos más graves septicemias, además de infecciones tipo gastroenteritis o enterocolitis, además de la muy conocida fiebre tifoidea, transmitida al hombre vía oral por alimentos crudos, mal conservados que llevan mucho tiempo preparados, así como aguas que contengan a dicho patógeno (Granados y Villa Verde, 1996).

3.7.7 *Klebsiella pneumoniae.*

Bacilo Gram-negativo, es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos y pacientes con diabetes mellitus o alcohólicos. Causa

alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales en pacientes debilitados que puede terminar con la vida del paciente. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema (Orrego *et al.*, 2007).

4 JUSTIFICACIÓN.

Equisetum hyemale L conocida como “cola de caballo” es la especie predominante en México y la población la utiliza con fines medicinales. La especie comercial a nivel mundial es *Equisetum arvense* L. de la cual existen numerosos estudios biológicos y fitoquímicos. En este trabajo se pretende contribuir al conocimiento de *Equisetum hyemale* L con la identificación de los compuestos volátiles y la actividad alelopática y bactericida de sus extractos.

5 OBJETIVOS.

5.1 Objetivos generales.

-Separar e identificar por cromatografía de gases-masas los compuestos presentes en los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *Equisetum hyemale* L.

-Evaluar la actividad alelopática y bactericida de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *Equisetum hyemale* L.

5.2 Objetivos particulares.

-Obtener los extractos orgánicos de *Equisetum hyemale* L, así como su rendimiento.

-Evaluar el efecto alelopático de los extractos crudos de *Equisetum hyemale* L sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L.

-Evaluar el efecto antimicrobiano de sus extractos crudos hexánico, de acetato de etilo y metanólico frente a las bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella tiphy* y *Klebsiella pneumoniae*.

6 HIPÓTESIS.

En especies del género *Equisetum* se han identificado metabolitos secundarios (ácidos grasos, alcanos, alcaloides, fitoesteroles, flavonoides y saponinas); algunos de ellos presentan actividad alelopática y bactericida, por lo tanto se espera que algunos de estos metabolitos estén presentes en *Equisetum hyemale* L y tengan los mismos efectos biológicos.

7 MATERIALES Y MÉTODO.

7.1 Obtención y determinación del material vegetal.

Se compró 1 kg de planta seca en el mercado Sonora del D.F. y se separaron las estructuras adecuadas para su determinación taxonómica (tallos, estróbilos y rizoma) la cual estuvo a cargo del Dr. Eloy Solano Camacho del herbario FEZA de la FES Zaragoza.

7.2 Obtención de los extractos orgánicos.

1 kg de tallos aéreos de la planta se molió en un molino de aspas y se maceró en disolventes orgánicos: hexano, acetato de etilo y metanol, por espacio de tres semanas en cada uno. Los extractos hexánico y metanólico fueron concentrados en un rotavapor Yamato 3000, el extracto metanólico se concentró en rotavapor Büchi RII. Los extractos se pesaron para calcular el rendimiento de cada uno.

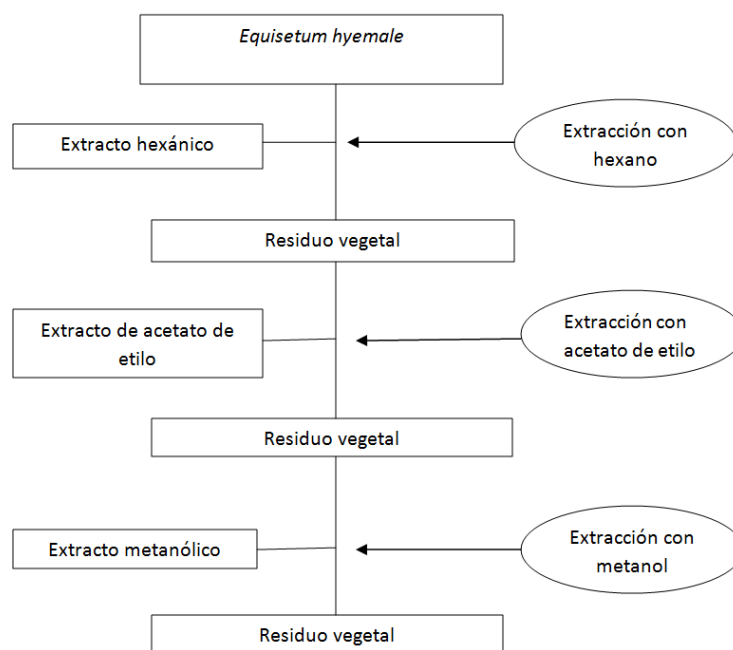


Fig. 6 Diagrama de extracción con disolventes de *E. hyemale* L.

7.3 Fraccionamiento de los extractos orgánicos.

Los extractos hexánico y de acetato de etilo fueron empacados en una columna para cromatografía, con sílica gel para capa fina G-60. Se realizó la cromatografía en columna al vacío (CCV). Las fracciones se evaluaron por cromatografía de capa fina (CCF) y se recrystalizaron mediante par de disolventes.

7.3.1 Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo.

Del extracto de acetato de etilo se tomaron 8 g, los cuales fueron separados por cromatografía en columna al vacío en una columna empacada con 48 g de gel de sílice y eluída con mezclas de disolventes de polaridad creciente. Se obtuvieron un total de 182 fracciones de 50 mL cada una.

7.3.2 Fraccionamiento del extracto metanólico.

25 g del extracto metanólico se extrajeron con hexano, luego con acetato de etilo. El resto del extracto, al disolverse en metanol, dio un precipitado de color blanco, el cual se lavó con isopropanol y después con butanol, el compuesto es soluble en agua y se analizó por espectroscopía de infrarrojo (IR).

7.4 Obtención y saponificación del extracto clorofórmico (CHCl₃).

100 g de planta seca se maceraron en CHCl₃, el extracto se concentró en rotavapor Büchi R II. El extracto crudo se disolvió en KOH en MeOH 0.5 N y se calentó a reflujo durante 2 horas. La fracción insaponificable se obtuvo mediante extracción líquido-líquido con hexano y se concentró en el rotavapor.

7.5 Análisis por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-masas) de los extractos.

Las muestras analizadas mediante CG-masas fueron: extracto crudo hexánico, fracciones 24-55 de la columna cromatográfica del extracto AcOEt, fracción hexánica del extracto MeOH, fracción AcOEt del extracto MeOH y la fracción insaponificable del extracto clorofórmico.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N con un detector de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, con analizador tiempo de vuelo. Con gas acarreador helio, Praxair, grado 5.0 (ultra alta pureza). Tipo de inyección split con división de flujo 1:20. La temperatura del inyector fue de 300° C. El programa de temperatura del horno fue de 40° C durante 3 minutos, luego una rampa de 20° C/min hasta 300 °C en una columna capilar HP-5MS (DB5) de 10 m x 0.18 mm x 0.18 µm.

Los compuestos se identificaron comparando los espectros obtenidos con los datos espectrales de la biblioteca NIST del detector de masas. Se tomaron los tiempos de retención de los compuestos y se calcularon los índices Kovats para cada uno de ellos.

7.6 Evaluación de la actividad alelopática de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico.

Los bioensayos se realizaron sobre semillas de *Lactuca sativa* L las cuáles se adquirieron en la tienda “Semillas Tinajero” en la delegación Xochimilco.

Se prepararon tres disoluciones en agua de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico, en concentraciones distintas (10, 50 y 100 mg/mL).

En cajas Petri con papel filtro en el fondo, se adicionaron 5 mL de disolución para los tratamientos y 5 mL de agua para el blanco. Se colocaron 15 semillas de *Lactuca sativa* en cada caja Petri y fueron incubadas a temperatura ambiente en la oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado

Durante 8 días, se contó el número de semillas germinadas. Para el análisis estadístico se empleó el análisis de varianza, usando el programa Excel 2010 y la prueba de Tukey en el programa SPSS Statistics Version 2, también se calculó el porcentaje de inhibición y la velocidad de germinación de acuerdo al trabajo de Bai *et al.*, 2012.

Cuadro 3. Fórmulas para calcular velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición (Bai *et al.*, 2012).

Porcentaje de inhibición.	Velocidad de germinación.
<p>% de inhibición= (100-(muestra extracto/control) 100)</p> <p>En donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Muestra extracto: semillas germinadas en los extractos ❖ Control: semillas germinadas en el testigo. 	<p>(n/d)= $\Sigma Nt / Dt$</p> <p>En donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Nt = semillas germinadas en el día t ❖ Dt = Número de día correspondiente ❖ (n/d) = semillas germinadas por día

7.7 Evaluación de la actividad bactericida de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico.

Los extractos se probaron sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella tiphy* y *Klebsiella pneumoniae*, las cuales se obtuvieron del cepario de *Campus* I de la FES Zaragoza.

Se prepararon tres disoluciones de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico, en tres concentraciones: 10, 50 y 100 mg/mL en agua y se impregnaron en discos de papel filtro de 5 mm de diámetro en volúmenes de 20 μ L, quedando las concentraciones finales de 2, 10 y 20 mg/disco.

En medio de cultivo agar Mueller-Hinton se inocularon las bacterias, en volumen de 250 μ L a una concentración de 0.5 de la escala de Mc Farland. Se colocaron tres discos, con cada una de las concentraciones, más un control positivo con ciprofloxacina a una concentración de 5 mg/disco y un control negativo con agua estéril. Se incubaron a 35° C por 24 horas y se midieron los halos de inhibición. Para el análisis estadístico se usó el análisis de varianza en Excel 2010 y prueba de Tukey en SPSS Statistics Version 2.

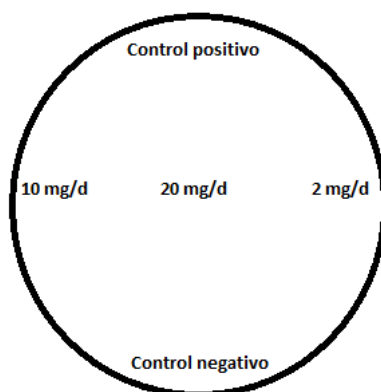


Fig. 7 Diagrama que muestra el acomodo de los discos en las pruebas de actividad bactericida. Concentración en mg/d (miligramos por disco).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 Rendimiento y fraccionamiento de los extractos orgánicos de *Equisetum hyemale*

L.

El porcentaje del extracto permite conocer la cantidad de material vegetal necesaria a macerar para obtener la cantidad de extracto deseado en peso seco. Los rendimientos de los extractos hexánico, de acetato de etilo, metanólico y clorofórmico de los tallos aéreos de la planta se muestran en el Cuadro 4. En el Cuadro 5 se muestran el número de fracciones obtenidas de la columna cromatográfica del extracto AcOEt, así como los disolventes utilizados para su elución. Y en el cuadro 6 se muestran los rendimientos de los fraccionamientos del extracto metanólico.

Cuadro 4. Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de 1 kg de *Equisetum hyemale* L. En el caso del extracto clorofórmico se obtuvo a partir de de 100 g de planta.

Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	15.5	1.55
Acetato de Etilo (AcOEt)	12.5	1.25
Metanólico (MeOH)	25	2.1
Clorofórmico (CHCl ₃)	3.4	0.34

Cuadro 5. Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo.

Fracciones	Disolvente
1 – 8	Hexano
9 – 49	Hexano-AcOEt 9:1
50 – 81	Hexano-AcOEt 8:2
82 – 95	Hexano-AcOEt 7:3
96 – 103	Hexano-AcOEt 6:4
104 – 118	Hexano-AcOEt 1:1
119 – 126	Hexano- AcOEt 4:6
127 – 132	Hexano-AcOEt 3:7
133 – 139	Hexano-AcOEt 2:8
140 – 143	Hexano-AcOEt 1:9
144 – 150	AcOEt
151 – 157	AcOEt-MeOH 9:1
158 – 162	AcOEt-MeOH 8:2
163 – 169	AcOEt-MeOH 7:3
170 – 174	AcOEt-MeOH 6:4
175 – 177	AcOEt-MeOH 1:1
178 – 182	MeOH

En la columna cromatográfica, al recrystalizar las fracciones por par de disolvente no se obtuvieron suficientes rendimientos en cuanto a los compuestos precipitados para analizar mediante espectroscopía. Esto posiblemente se debe a la cantidad de ceras presentes en los extractos, las cuales dificultan la purificación de los compuestos (Brune y Haas, 2011).

Cuadro 6. Fracciones obtenidas del extracto metanólico.

	Peso (g)	Rendimiento (%)
Extracto metanólico	21	2.1
Fracción hexánica	5.12	24.38
Fracción AcOEt	0.56	2.66
Sólido precipitado	0.72	3.42
Fracción MeOH	14.59	69.47

8.2 Análisis mediante el sistema gases-masas (CG-masas).

Se analizaron, mediante esta técnica, el extracto hexánico, las fracciones 24 a 55 de la columna del extracto de acetato de etilo, la fracción hexánica del extracto metanólico, la fracción de acetato de etilo de etilo del extracto metanólico y la fracción insaponificable del extracto clorofórmico. Se tomaron los tiempos de retención y se calcularon los índices de Kovats.

Los espectros de masas y cromatogramas mostrados de la figura 8 a la figura 36 se obtuvieron a partir de las muestras anteriormente mencionadas, las estructuras químicas de las mismas figuras se tomaron de la biblioteca NIST (webbooknist).

8.2.1 Compuestos identificados por CG-masas en el extracto hexánico de *Equisetum hyemale* L.

En el Cuadro 7 se muestran los compuestos identificados en el extracto hexánico de los tallos de *Equisetum hyemale* L. Los 22 componentes principales representan el 76.85% del extracto (Fig. 12).

El componente mayoritario es el ácido n-hexadecanoico (ácido palmítico) con un 23.787% del área (Fig. 8), es un ácido graso el cual ha sido anteriormente reportado como componente del aceite esencial del helecho *Adiantum flabellulatum* (Kang y Wang, 2009), en tres especies del género *Phylanthus* (Xiangrong *et al.*, 2008), en el extracto hexánico y aceite esencial de *Citrus sinensis* L (Benelli *et al.*, 2010), en el extracto etanólico de *Buchanania axillaries* (Sakthivel *et al.*, 2010); formando parte de los compuestos volátiles de tres especies de *Pholmis sp* (Zhang y Wang, 2008) y en los componentes volátiles de la miel de las regiones de Kenia en África (Ng'ang'a *et al.*, 2012).

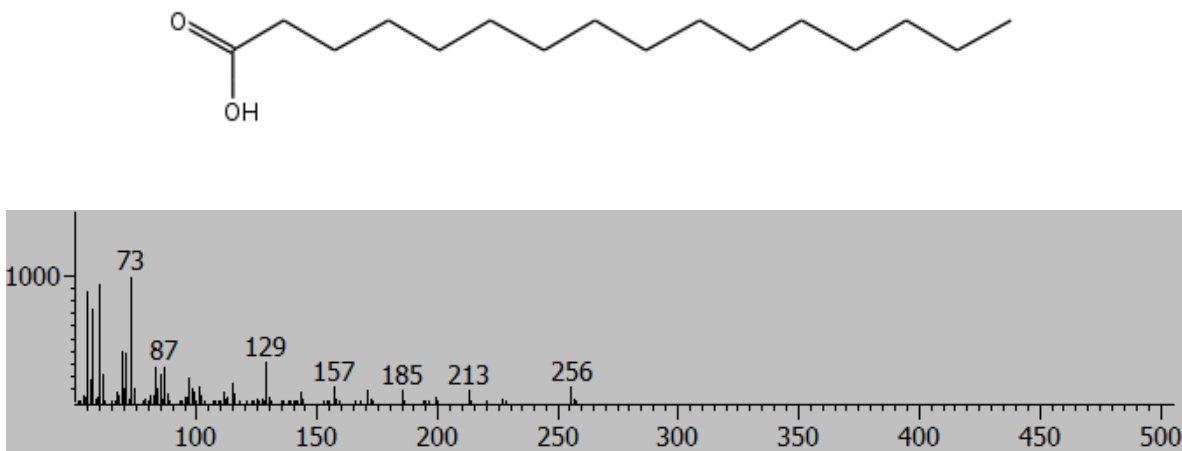


Fig. 8 Estructura química y espectro de masas del ácido n-hexadecanoico.

El segundo compuesto mayoritario del extracto hexánico, con un porcentaje de área de 10.719, es el terpeno 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol, un estereoisómero del fitol (Fig. 9). Se ha reportado como parte de los compuestos volátiles de los extractos hexánico, de acetato de etilo y clorofórmico de *Azadiracta indica*, una planta de India conocida como neem (Hossain *et al.*, 2013). Se encontró también en el extracto etanólico de *Buchanania axillaries* (Sakthivel *et al.*, 2010), así como en el aceite esencial *Phlomis umbrosa*, *P. meglantha* y *P. szechuanensis* (Zhang y Wang, 2008).

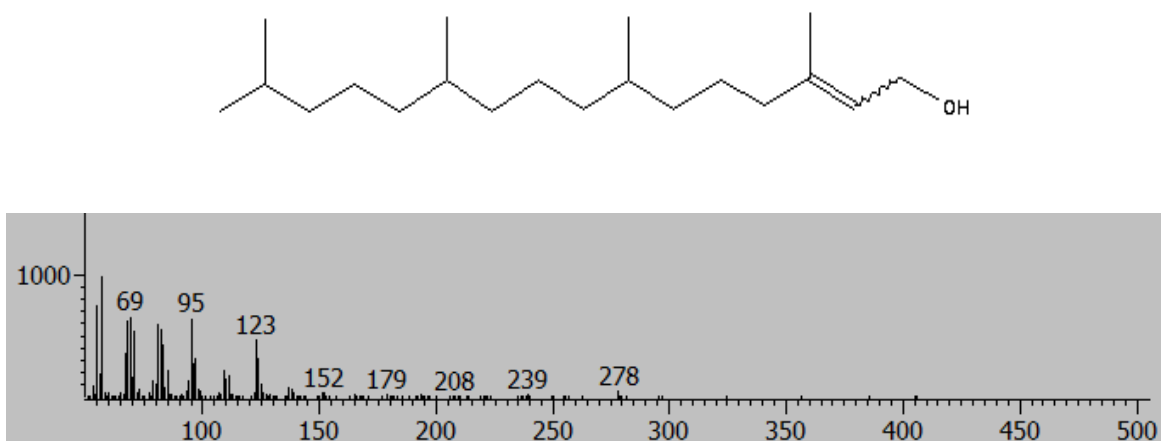


Fig. 9 Estructura química y espectro de masas de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol.

Con un 6.58% del área se encuentra el 11-deciltetracosano (Fig. 10), que se ha reportado en los aceites esenciales de *Cedrus atlántica* (Boudarene *et al.*, 2004) y *Ornithogalum cuspidatum* (Nazifi *et al.*, 2010) y en el extracto hexánico de *Gongronema latifolium* (Ezekwe *et al.*, 2014).

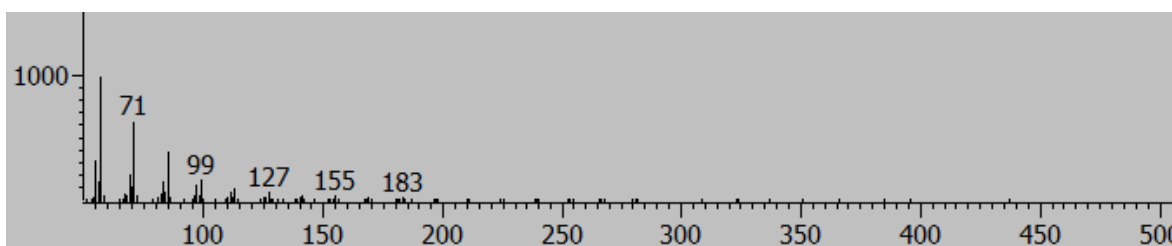
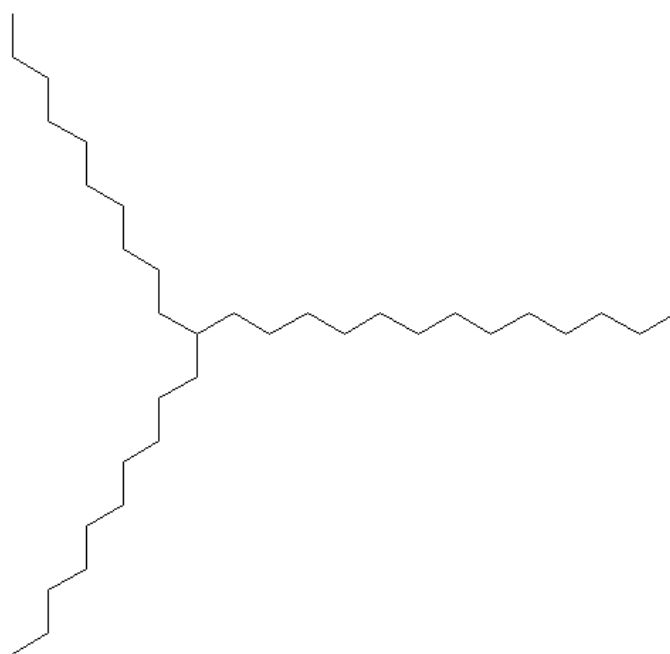


Fig. 10 Estructura química y espectro de masas de 11-deciltetracosano

El 3,5-dieno-estigmastano (Fig. 11) con un 4.20% del área se ha reportado como uno de los esteroides de *Eucalyptus globulus* (del Río *et al.*, 1998) y en el aceite de oliva (Leon-Camacho *et al.*, 2004). También ha sido encontrado en la pulpa de la fibra de lino *Linum usitatissimum* (Gutiérrez y del Río, 2003) y fue extraído de las raíces de aguacate *Persea americana* donde ha mostrado actividad inhibitoria frente al oomiceto *P. cinnamomi* (Sánchez, 2007). En las oleorresinas de *Equisetum giganteum* se reportó un compuesto de estructura similar, el 4,22-dieno-estigmastano (Michielin *et al.*, 2005).

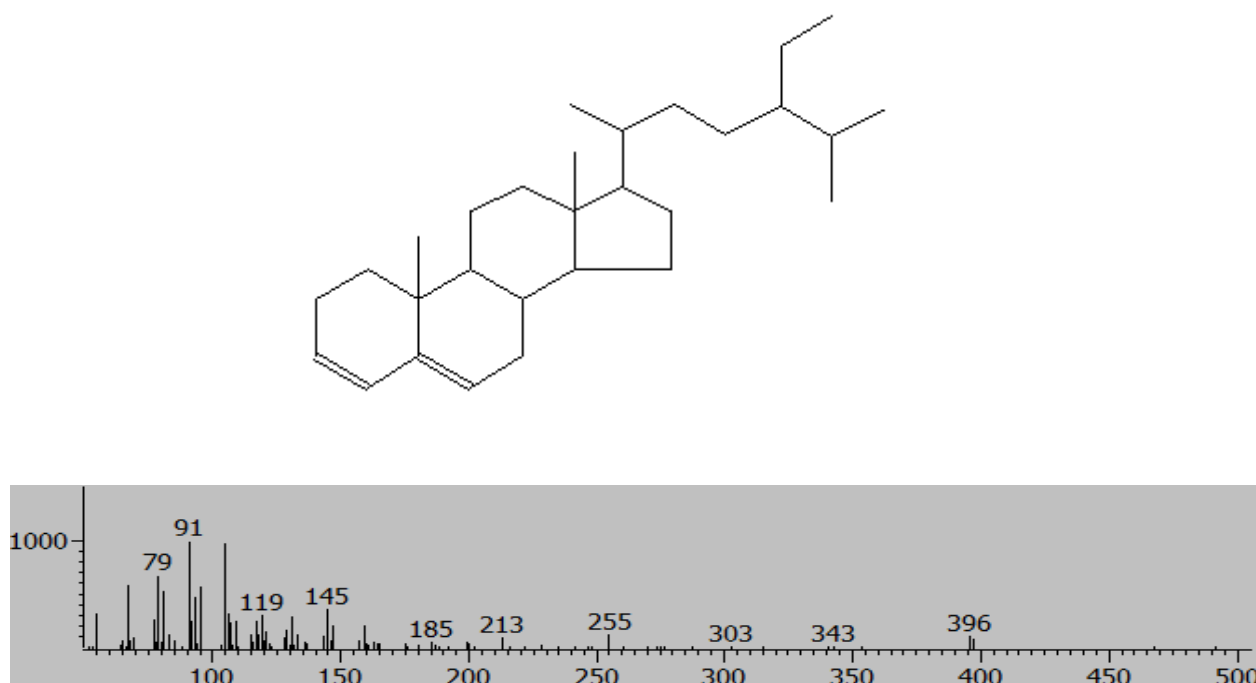


Fig. 11 Estructura química y espectro de masas de 3,5-dieno estigmastano.

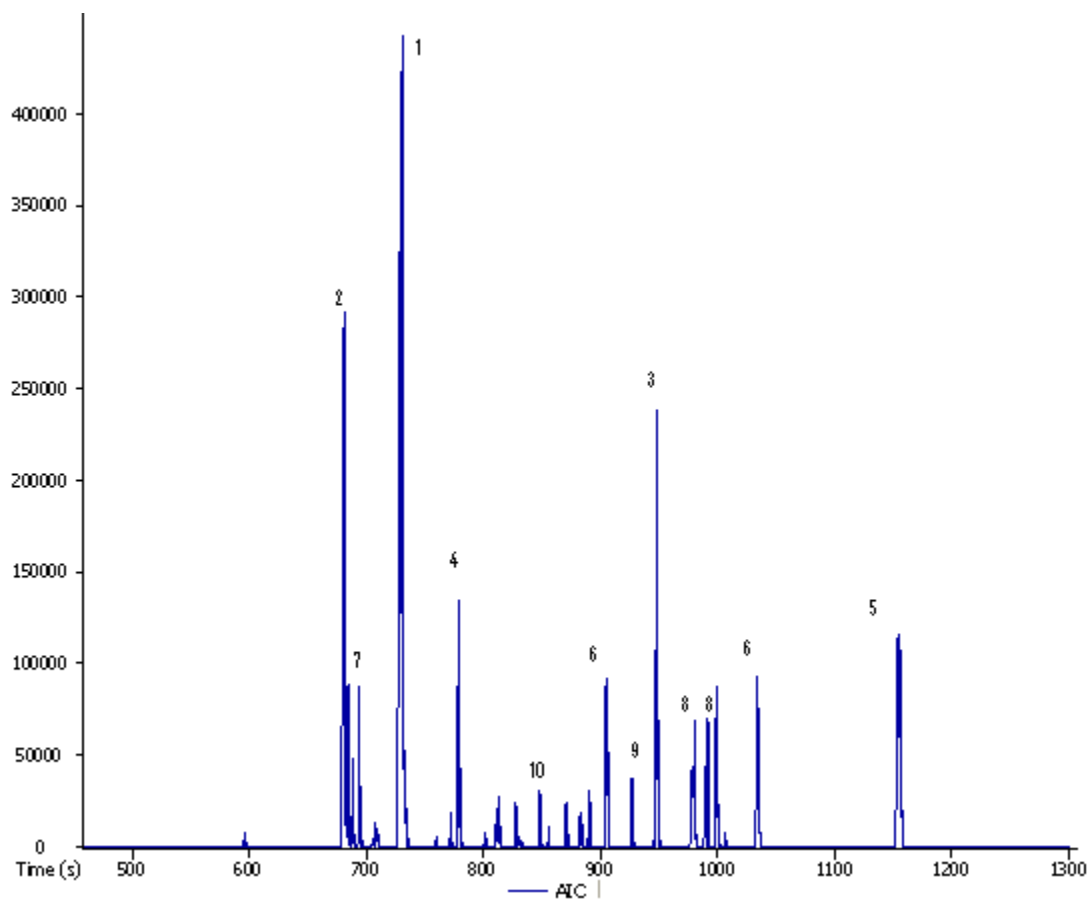


Fig. 12 Cromatograma del extracto hexánico. 1) Ácido n-hexadecanoico; 2) 3,7,11,16-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; 3) Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico; 4) 11-decil-tetracosano; 5) 3,5-dieno-estigmastano; 6) 7-hexil-eicosano; 7) 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; 8) Octadecanal; 9) Tetracosano; 10) Tridecanoato de metilo.

Cuadro 7. Compuestos identificados, mediante CG-M, del extracto hexánico de *Equisetum hyemale* L.

T.R. (S) tiempo de retención en segundos. I.K. índice de Kovats.

Pico	Nombre del compuesto	Fórmula	Fragmentos	Área %	T.R. (s)	I.K.
	Aldehídos					
6	2-metilundecanal (787)	C ₁₂ H ₂₄ O	58, 71, 95, 126	0.25381	706.147	2066.6
24	Cis, cis, cis-7,10,13-hexadecatrienal (848)	C ₁₆ H ₂₆ O	79, 91, 149, 191	1.2044	891.047	2781.7
31	Octadecanal (918)	C ₁₈ H ₃₆ O	82, 152, 194, 222, 250	6.1349	980.497	3133.2
	Cetonas					
1	5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimetil-2(4H)benzofuranona (907)	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	67, 95, 111, 137, 152, 180	1.0135	596.597	1703.1
3	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (925)	C ₁₈ H ₃₆ O	43, 71, 95, 124, 165, 210, 250	3.1078	684.897	1990.6
11	2(2-octenil)-ciclopentanona (783)	C ₁₃ H ₂₂ O	67, 84, 110, 152, 194	0.26289	772.497	2315.9
	Alcanos					
23	Tetracosano (726)	C ₂₄ H ₅₀	57, 71, 99, 133, 191, 221, 387	1.2652	883.547	2752.3
25	7-hexileicosano (923)	C ₂₆ H ₅₄	43, 57, 71, 99, 127, 155, 183	3.9913	905.997	2840.5
27	Pentadecano (927)	C ₁₅ H ₃₂	57, 71, 99, 127, 155	1.2951	927.347	2924.4
29	11-deciltetracosano (951)	C ₃₄ H ₇₀	57, 71, 99, 127, 155, 183	3.5149	978.747	3176.8
	Ésteres					
8	Tridecanoato de metilo (900)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	67, 74, 82, 95, 183	0.010437	833.347	2555
17	Dodecanoato de 2-butoxietilo (788)	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	71, 79, 85, 100, 160, 239	1.136	848.597	2614.9
	Alcoholes					
10	3,6,6-trimetil-2-norpinanol (775)	C ₁₀ H ₁₈ O	71, 85, 95	0.88024	760.597	2269.2
26	1-hexadecanol (769)	C ₁₆ H ₃₄ O	66, 69, 97, 111, 139	1.2951	927.097	2923.4
38	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (899)	C ₂₀ H ₄₀ O	68, 81, 95, 123, 179, 278	10.719	1155.55	3821
	Ácidos orgánicos					
9	Ácido n-hexadecanoico (916)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	43, 73, 87, 129, 157, 185, 213, 256	23.787	730.547	2154.9
12	Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico (930)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	67, 79, 93, 135, 222	9.4157	779.747	2344.4
	Esteroles					
30	Acetato de ergost-5-en-3-ol, (835)	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	81, 105, 147, 213, 255, 293, 382	1.6943	978.747	3126.3
34	3,5-dieno-estigmastano (802)	C ₂₉ H ₄₈	43, 79, 91, 119, 145, 185, 213, 255, 303, 343, 396	4.2055	999.297	3207.1
	Lactonas					
16	4,8,12,16,-tetrametilheptadecan-4-ólido (894)	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	71, 99, 114, 151, 184	1.0771	828.347	2535.4
	Otros					
35	Vitamina E (890)	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	107, 136, 165, 205, 430	0.58567	1007.25	3238.3

(#): Similitud del espectro de masas en relación con la biblioteca NIST.

8.2.2 Compuestos identificados por CG-masas de las fracciones 24-55 en el extracto de acetato de etilo de *Equisetum hyemale* L.

En el Cuadro 8 se muestran los compuestos identificados en las fracciones 24-55 de la columna cromatográfica del extracto de acetato de etilo de los tallos de *Equisetum hyemale* L. Los 13 compuestos reportados comprenden el 99.06% del extracto (Fig. 19).

El compuesto mayoritario en esta porción del extracto fue el 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fig. 13) con un 51.70% del área total, que aparece en varios picos en distintos porcentajes de área con índices de retención muy cercanos entre sí. Este compuesto es soluble en acetato de etilo, pues fue reportado en el extracto de éste disolvente de las semillas de *Azadiracta indica* (Hossain *et al.*, 2013). También fue identificado en el extracto hexánico de *Equisetum hyemale* L.

El aldehído 2-dodecenal con un 5.05% de área ha sido reportado en el aceite esencial de *Eryngium foetidum* (Martins *et al.*, 2003) y *Coriandrum sativum* (Msaada *et al.*, 2007). Está presente en los compuestos responsables del sabor de la soya (Gremli, 1974).

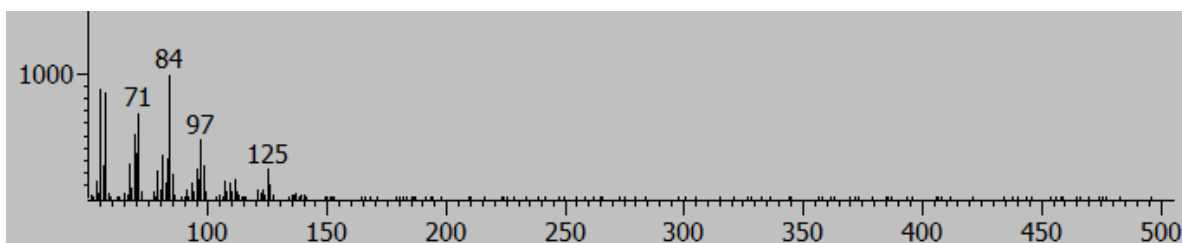
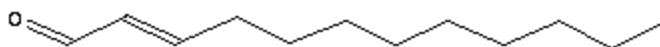
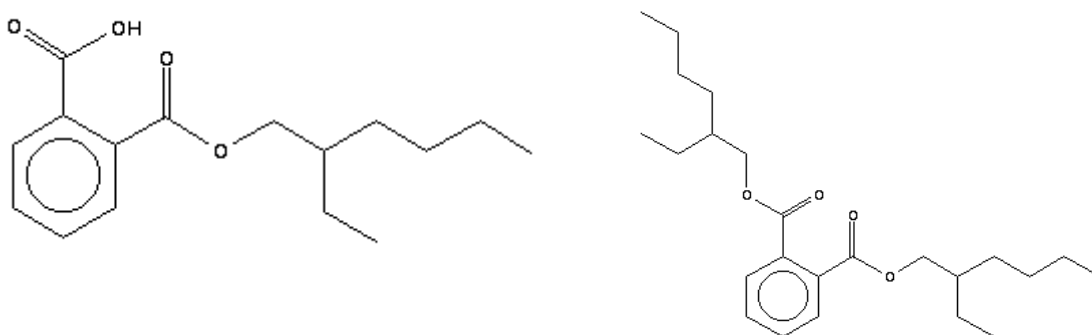


Fig. 13 Estructura química y espectro de masas de 2-dodecenal.

Los compuestos 1,2-bencendicarboxilato de mono (2-etilhexilo) (Fig. 14) con un 5.43% y 1,3-bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo) (Fig. 15) con 1.96 % del área son ftalatos, compuestos sintéticos que se encuentran en el ambiente como contaminantes; los cuales pueden ser dañinos para la salud humana (Latini, 2005). En algunos trabajos han sido reportados como componentes del aceite esencial de *Limonium aureum* (Yu *et al.*, 2007) y en los extractos de *Triticum durum* L (Bai *et al.*, 2012).



Figs. 14 y 15 Estructura química de 1,2-bencendicarboxilato de mono(2-etilhexilo) y 1,3-bencendicarboxilato de bis(2-etilhexilo).

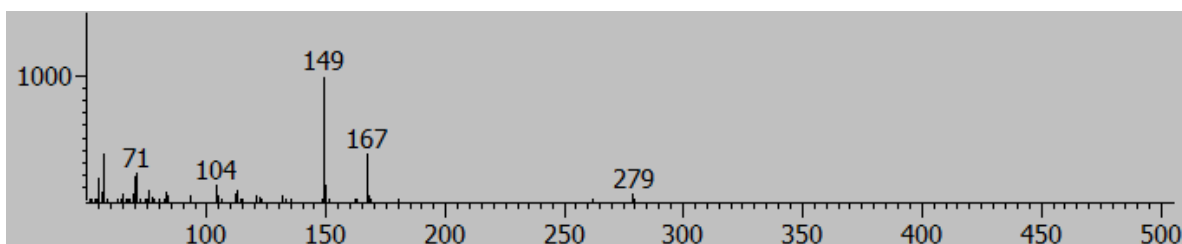


Fig. 16 Espectro de masas de 1,2-bencendicarboxilato de mono(2-etilhexilo).

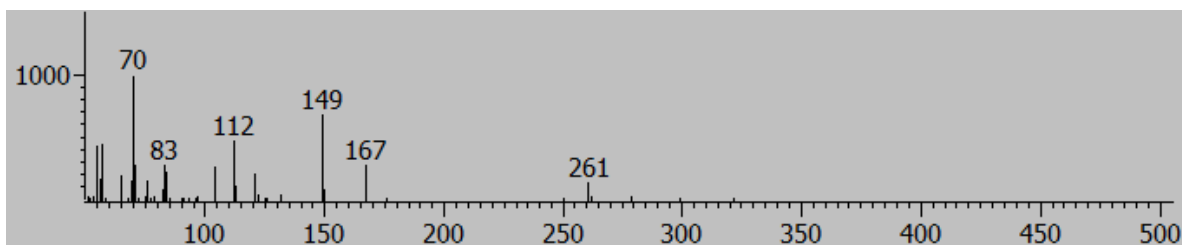


Fig. 17 Espectro de masas de 1,3-bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo).

Otro compuesto presente es el 2,4-bis (1,1-dimetiletil)-fenol (Fig. 18) con un 1.78% del área. Se caracteriza por ser contaminante de cuerpos de agua al provenir de productos de limpieza y detergentes (Davi y Gnudi, 1999). La presencia de estos químicos se debe, principalmente a la capacidad de absorción y de retención en los tallos de *Equisetum sp* lo cual hace práctico su uso en humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales (Neralla *et al.*, 1999).

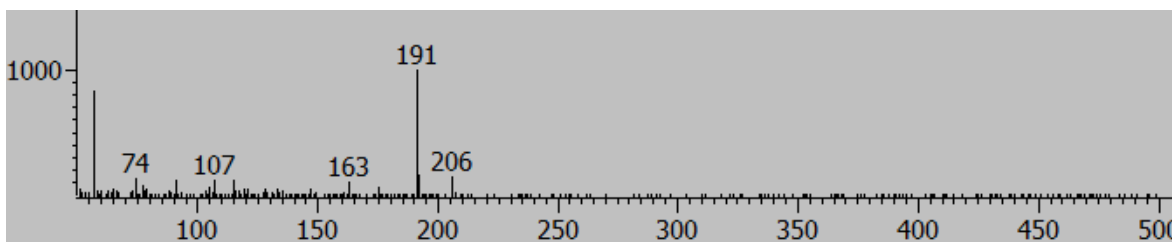
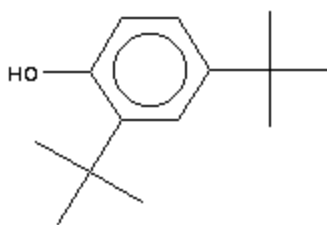


Fig. 18 Estructura química y espectro de masas de 2,4-bis (1,1-dimetiletil)-fenol.

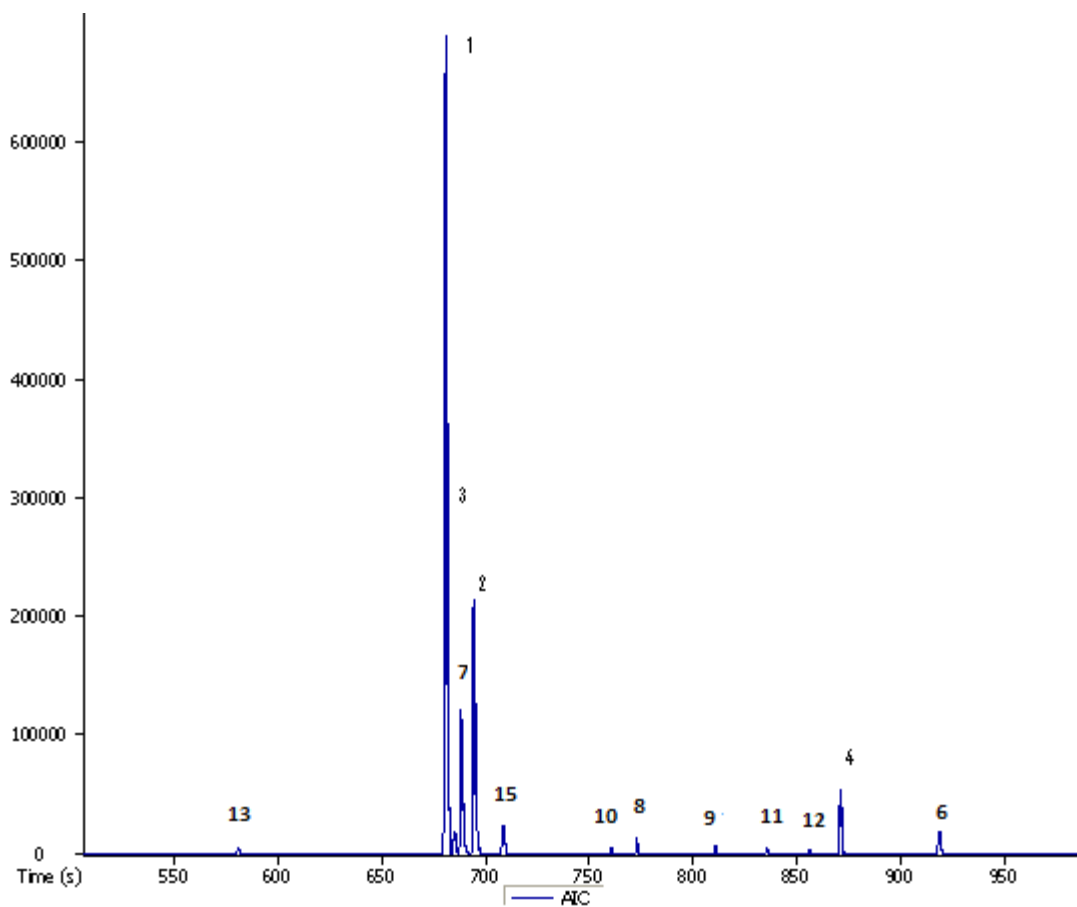


Fig. 19 Cromatograma de las fracciones 24-55 del extracto de acetato de etilo. **1)** 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; **2)** 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; **3)** 1,2-bencenodicarboxilato de bis (2-etilhexilo); **4)** 1,2-bencenodicarboxilato de mono (2-etilhexilo); **5)** 2-dodecenal; **6)** 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecin-3-ol; **7)** 2,4-bis (1,1-dimetil)-fenol; **8)** 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; **9)** Clorohidrato de o-bencilhidroxiamina; **10)** 1,2-bencendicarboxilato de butil-2-metilpropilo; **11)** Eicosano; **12)** Eicosano; **13)** Tetrahidropiraniol éter de citronelol.

Cuadro 8. Compuestos identificados, mediante CG-M, de las fracciones 24-55 en el extracto de acetato de etilo de *Equisetum hyemale* L. T.R. (S) tiempo de retención en segundos. I.K. índice de Kovats.

Pico	Nombre del compuesto	Fórmula	Fragmentos	Área %	T.R. (s)	I.K.
7	Aldehídos 2-dodecenal (790)	C ₁₂ H ₂₂ O	71, <u>84</u> , 97, 125	5.0599	708.647	2075.7
3	Cetonas 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (907)	C ₁₈ H ₃₆ O	<u>43</u> , 71, 85, 109, 165	1.4611	685.147	1991.4
10	Alcanos Eicosano (918)	C ₂₀ H ₄₂	<u>57</u> , 71, 85, 113, 144, 221	0.4819	811.047	2467.4
11	Eicosano (931)	C ₂₀ H ₄₂	<u>57</u> , 71, 85, 113, 147, 221	0.55205	835.997	2565.4
2	Terpenos 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (898)	C ₂₀ H ₄₀ O	<u>68</u> , 95, 123, 151, 179	51.702	680.847	1977.2
4	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (894)	C ₂₀ H ₄₀ O	68, <u>81</u> , 95, 127, 151, 179, 278	10.206	688.447	2002.5
5	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (895)	C ₂₀ H ₄₀ O	68, <u>81</u> , 95, 127, 151, 179, 278	17.37	694.347	2023.9
9	3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecin-3-ol (794)	C ₂₀ H ₃₈ O	71, <u>84</u> , 89, 97, 140	2.0559	772.997	2317.9
1	Otros 2,4-bis (1,1-dimetil)-fenol (926)	C ₁₄ H ₂₂ O	74, 107, 163, <u>191</u> , 206	1.7833	580.947	1653.7
6	1,2-bencendicarboxilato de butil-2-metilpropilo (865)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	76, 104, <u>149</u> , 167, 223	0.86809	696.59	2032
8	Tetrahidropiranil éter de citronelol (800)	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	75, <u>85</u> , 95	0.12437	760.847	2270.1
12	Clorohidrato de o-bencilhidroxiamina (787)	C ₇ H ₉ NOCl	65, <u>91</u> , 107	0.94407	856.497	2646
13	1,2-Bencendicarboxilato de mono (2-etilhexilo) (940)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	71, 104, <u>149</u> , 167, 279	5.4318	871.297	2704.1
14	1,3-Bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo) (719)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	<u>70</u> , .83, 112, 149, 167, 261	1.96	918.997	2891.6

(#): Similitud del espectro de masas en relación con la biblioteca NIST.

8.2.3 Compuestos identificados por CG-masas de la fracción hexánica del extracto metanólico de *Equisetum hyemale* L.

En el Cuadro 9 se muestran los compuestos identificados en la fracción hexánica del extracto metanólico de los tallos de *Equisetum hyemale* L. Los 19 componentes aquí reportados representan el 86.77% de la fracción del extracto (Fig. 25).

En esta fracción del extracto metanólico el compuesto mayoritario, con un 32.60% de área, fue el ácido n-hexadecanoico, el cual también fue el compuesto mayoritario en el extracto hexánico.

Con un 27.25% del área, el segundo compuesto mayoritario es el (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrien-1-ol (Fig. 20) que ha sido reportado como constituyente en los aceites esenciales de *Phlomis umbrosa*, *P. meglanta*, *P. szchuanensis* (Zhang y Wang, 2008), *Tussilago fárfara* (Liu *et al.*, 2006) y en el extracto metanólico de *Labisia pumila* (Karimi y Jaafar, 2011).

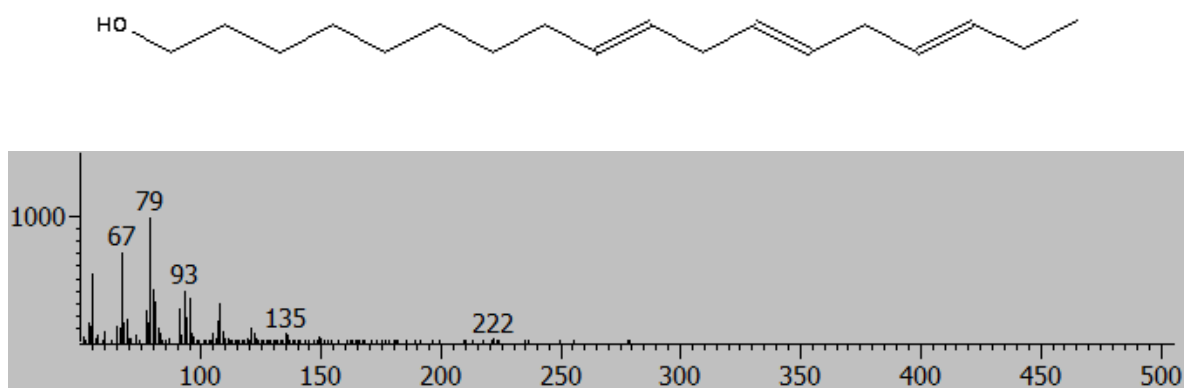


Fig. 20 Estructura química y espectro de masas de (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrien-1-ol.

El siguiente compuesto, el 11,14,17-icosatrienoato de metilo (Fig. 21) abarca un 6.82% del área y ha sido reportado anteriormente como compuesto de los aceites esenciales de *Melissa officinalis* de la República de Eslovaquia (Hollá *et al.*, 1997), *Clematis obscura* (Tao *et al.*, 2005) y *Osmanthus fragans* (Hu *et al.*, 2010).

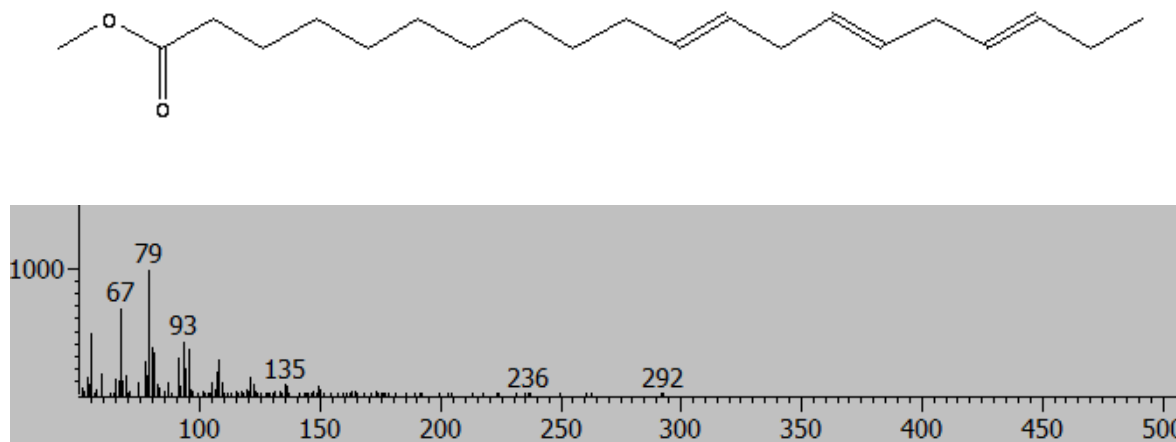


Fig. 21 Estructura química y espectro de masas de 11,14,17-icosatrienoato de metilo.

Otro éster metílico identificado es el tridecanoato de metilo (Fig. 22) con un 6.09% de área, el cual no se encuentra reportado en la bibliografía de componentes volátiles de aroma y aceites esenciales en plantas. Este compuesto por primera vez se reporta como componente volátil en plantas, en este caso en *Equisetum hyemale* L.

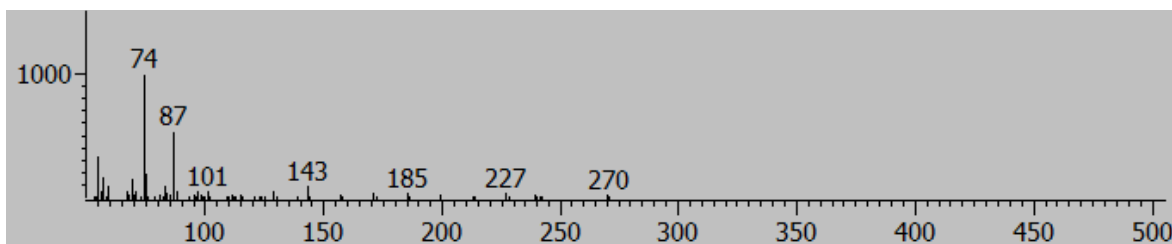
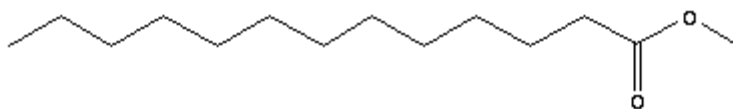


Fig. 22 Estructura química y espectro de masas de tridecanoato de metilo.

El azúcar 1,6-anhidro- α -D-glucopiranososa (levoglucosan) (Fig. 23) se identificó con 3.374% del área. Ha sido reportado anteriormente en el extracto etanólico de *Delonix regia* (Jancy *et al.*, 2011), en la fracción fenólica de *Cynodon dactylon* en donde presenta un efecto antioxidante (Shabi *et al.*, 2010).

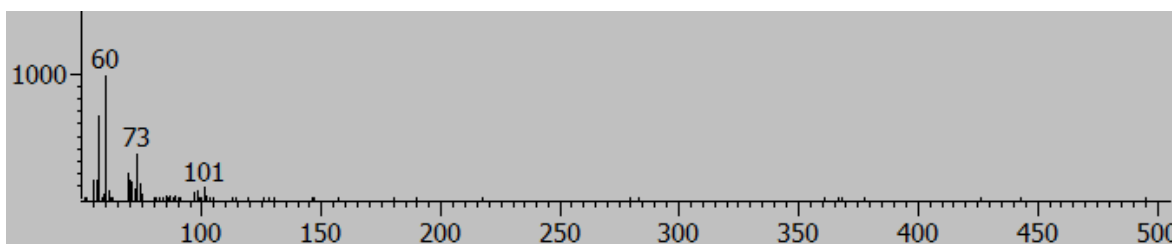
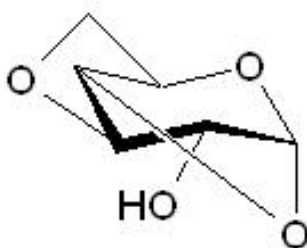


Fig. 23 Estructura química y espectro de masas de 1,6-anhidro- α -D-glucopiranososa (levoglucosan).

El terpeno fitol (Fig. 24) aparece con un área de 1.18%, menor que su estereoisómero 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol que aparece en los demás extractos y en esta misma fracción del extracto metanólico con amplios porcentajes de área. Este compuesto tiene aplicaciones en la industria cosmetológica (McGynty *et al.*, 2012). Se ha encontrado en el aceite esencial del pasto *Antoxanthum odoratum* (Tava, 2001). Ha sido reportado en su forma trans en el aceite esencial de *Equisetum arvense* (Radulovic *et al.*, 2006). Se reportó su presencia en los extractos hexánico, de acetato de etilo y clorofórmico de *Azadiracta indica* (Hossain *et al.*, 2013), así como en el extracto metanólico de *Labisia pumila* (Karimi y Jaafar, 2011) y en el aceite obtenido con éter de petróleo de las semillas de *Camptotheca acuminata* (Wang *et al.*, 2011), en el extracto hidroalcohólico de *Cynodon dactylon* (Shabi *et al.*, 2010) y en el extracto etanólico de *Delonix regia* (Jancy *et al.*, 2011), entre otras.

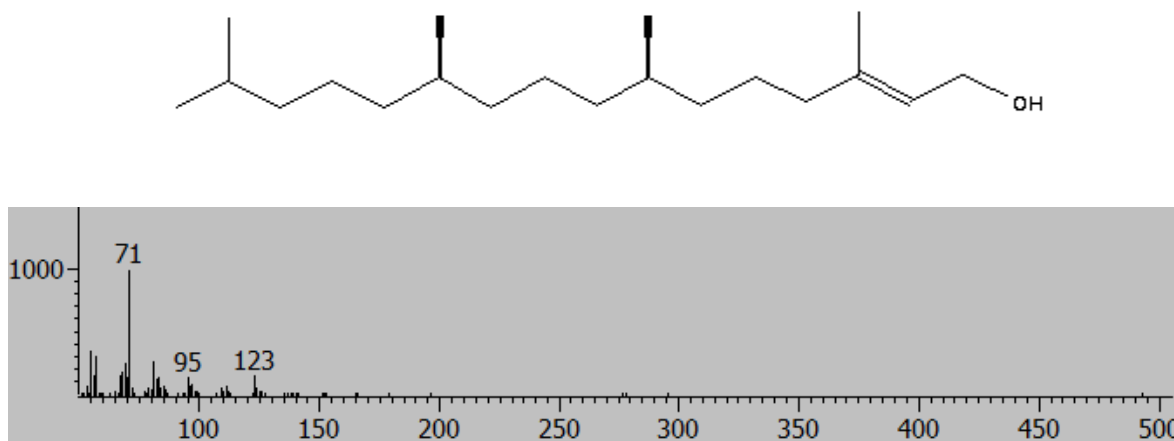


Fig. 24 Estructura química y espectro de masas de fitol.

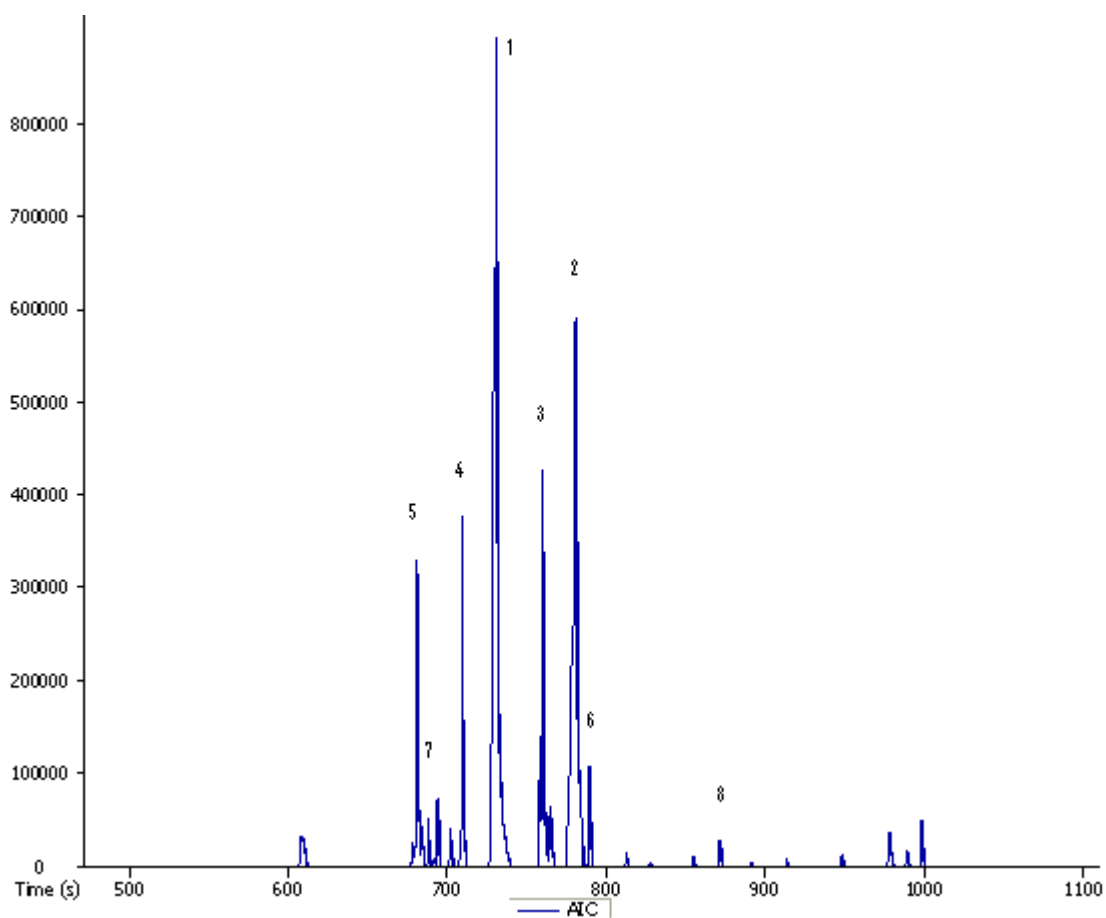


Fig. 25 Cromatograma de la fracción extraída con hexano del extracto metanólico. **1)** Ácido n-hexadecanoico; **2)** Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoico; **3)** 11,14,17-eicosatrienoato de metilo; **4)** Tridecanoato de metilo; **5)** 3,7,11,16-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; **6)** 1,6-anhidro- α -D-glucopiranos (levoglucosan); **7)** 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; **8)** (Z)-7-hexadecenoato de metilo.

Cuadro 9. Compuestos identificados, mediante CG-M, de la fracción hexánica del extracto metanólico de *Equisetum hyemale* L. T.R. (S) tiempo de retención en segundos. I.K. índice de Kovats.

Pico	Nombre del compuesto	Fórmula	Fragmentos	Área %	T.R. (s)	I.K.
	Terpenos					
4	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (892)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	68, 71, 81, 123, 151, 179, 278	5.5076	680.612	1977.1
17	Fitol (908)	C ₂₀ H ₄₀ O	71, 95, 123	1.1868	764.512	2284.5
19	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrien-1-ol (936)	C ₁₈ H ₃₂ O	67, 79, 93, 135, 222	27.253	781.312	2350.6
27	Alcanos 11-decil-tetracosano (926)	C ₃₄ H ₇₀	57, 71, 85, 99, 127, 169, 197, 261	0.38744	948.412	3007.1
	Alquenos					
2	3,7,11,tetrametil-2-hexadeceno, (827)	C ₂₀ H ₄₀	70, 83, 125, 280	0.2644	678.012	1967.8
16	1-cloro-7-heptadeceno(824)	C ₁₇ H ₃₃ Cl	69, 111, 140, 174	0.505669	762.016	2274.7
	Cetonas					
5	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (904)	C ₁₈ H ₃₆ O	43, 71, 95, 124, 179, 250	0.82099	648.262	1988.5
21	2-dodecilciclobutanona (705)	C ₁₆ H ₃₀ O	84, 98, 143, 185, 239	0.27373	813.162	2475.7
	Ésteres					
3	Heptadecanoato de metilo (715)	C ₈ H ₁₆ O ₂	74, 87, 103, 143, 213, 256, 347	0.22	678.912	1970.8
9	11,14,17-eicosatrienoato de metilo (894)	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	67, 79, 93, 135, 264	1.2267	701.912	2051,3
10	Tridecanoato de metilo (938)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	74, 87, 101, 143, 185, 227, 270	6.0946	709.312	2078.1
13	9,12-octadecadienoato de metilo (935)	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	67, 81, 95, 150, 178, 263, 294	1.7983	758.112	2259.4
14	(Z)-7-hexadecenoato de metilo (888)	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	74, 97, 180, 222, 264	1.6239	759.712	2265.7
26	Tridecanoato de metilo (916)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	74, 87, 101, 143, 199, 255	0.38083	766.562	2292.6
	Esteroides					
28	Acetato de ergost-5-en-3-ol (822)	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	67, 81, 105, 147, 213, 255, 340, 382	1.0908	978.512	3125.4
30	3,5-dieno-estigmastano (833)	C ₂₉ H ₄₈	81, 105, 147, 213, 255, 288, 354, 396	1.364	998.912	3205.6
	Ácidos orgánicos					
11	Ácido n-hexadecanoico (909)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	73, 87, 129, 157, 185, 213, 256	32.608	731.212	2157.3
	Otros					
1	1,6-Anhidro-α-D-glucopiranososa (levoglucosan) (873)	C ₆ H ₁₀ O ₅	60, 73, 101	3.374	608.812	1741.6
23	3-bencil-5-cloro-1,2,3-triazo-1-óxido (733)	C ₉ H ₈ ClN ₃ O	65, 91, 130, 209	0.78598	855.062	2640.3

(#): Similitud del espectro de masas en relación con la biblioteca NIST.

8.2.4 Compuestos identificados por CG-masas de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *Equisetum hyemale* L.

En el Cuadro 10 se muestran los compuestos identificados en la fracción soluble en acetato de etilo del extracto metanólico de los tallos de *Equisetum hyemale* L. Los 12 componentes aquí reportados representan el 99.9% de la fracción del extracto (Fig. 30).

El compuesto mayoritario en esta fracción del extracto metanólico es el 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fig. 26) con 30.54% del área, el cual también fue identificado en el extracto hexánico, en las fracciones del extracto de acetato de etilo y en la fracción hexánica del extracto metanólico.

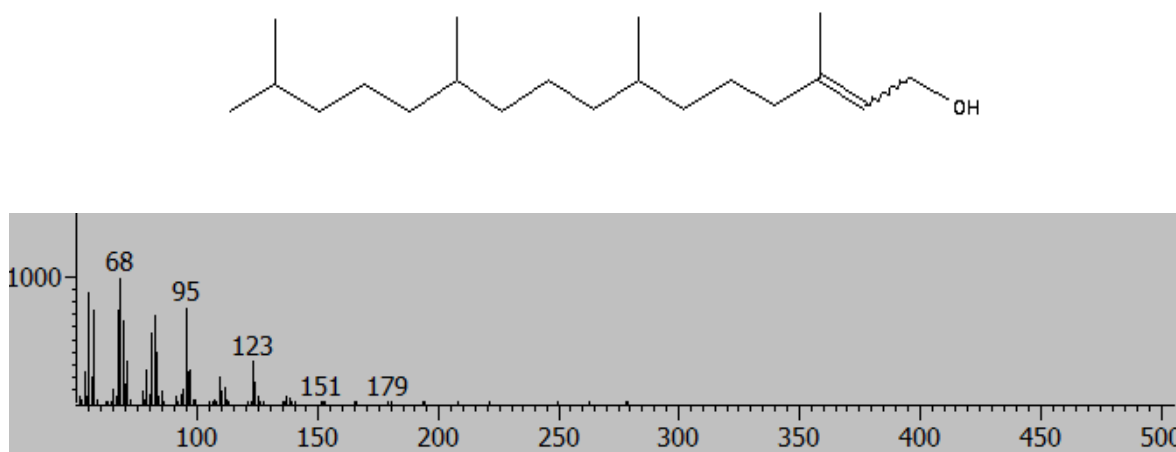


Fig. 26 Estructura química y espectro de masas de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol.

El segundo compuesto mayoritario es el 1,2-bencendicarboxilato de mono(2-etilhexilo) (Fig. 27) con un 26.33% del área, el cual puede ser una impureza, debido a su origen

sintético, que ya venía en el disolvente o un compuesto que la planta absorbió y retuvo en sus tejidos, ya que los ftalatos son compuestos persistentes en el ambiente (Latini, 2005).

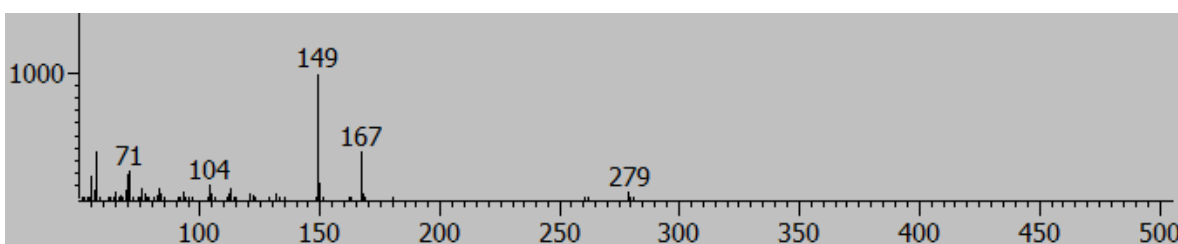
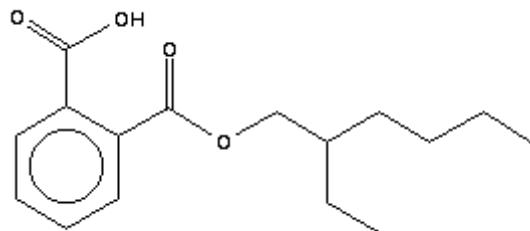


Fig. 27 Estructura química y espectro de masas de 1,2-bencendicarboxilato de mono (2-etilhexilo).

Se vuelve a identificar el ácido n-hexadecanoico (Fig. 28) con un 8.14% del área, el cual también se encontró en el extracto hexánico y la fracción hexánica del extracto metanólico de *Equisetum hyemale* L.

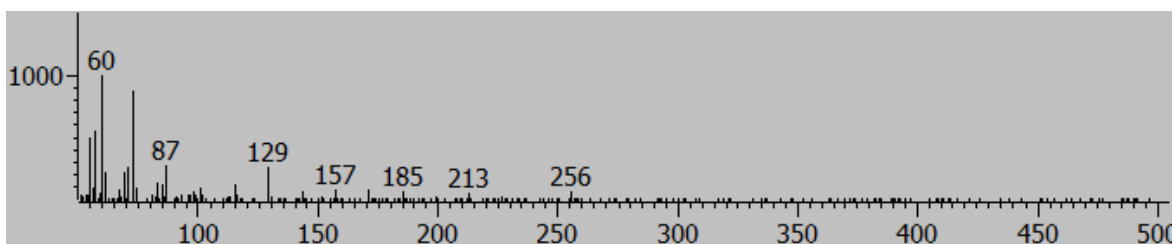
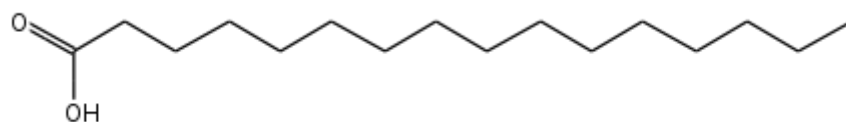


Fig. 28 Estructura química y espectro de masas del ácido n-hexadecanoico.

La 6,10-dimetil-2-undecanona (Fig.29) se identificó con un 3.6% del área y anteriormente ha sido reportada entre los compuestos volátiles que le dan sabor al arroz glutinoso durante su cocción (Zeng *et al.*, 2009), en su aceite esencial (Miyazawa *et al.*, 2008) y en el aceite del arroz rojo (Sukhonthara *et al.*, 2009). Fue identificado como compuesto volátil de *Brachystegia eurycoma* (Ogunbinu *et al.*, 2006) y se encontró en el extracto de diclorometano del té de rooibos *Aspalathus linearis* (Kawakami *et al.*, 1993).

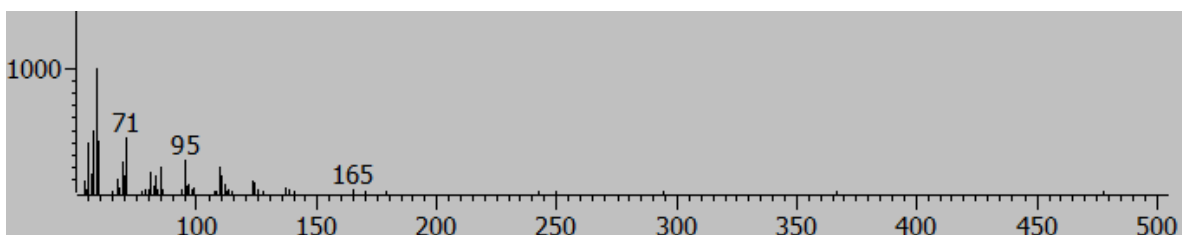
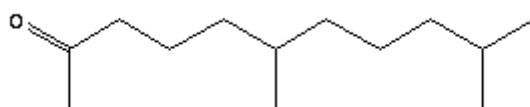


Fig. 29 Estructura química y espectro de masas de 6,10-dimetil-2-undecanona.

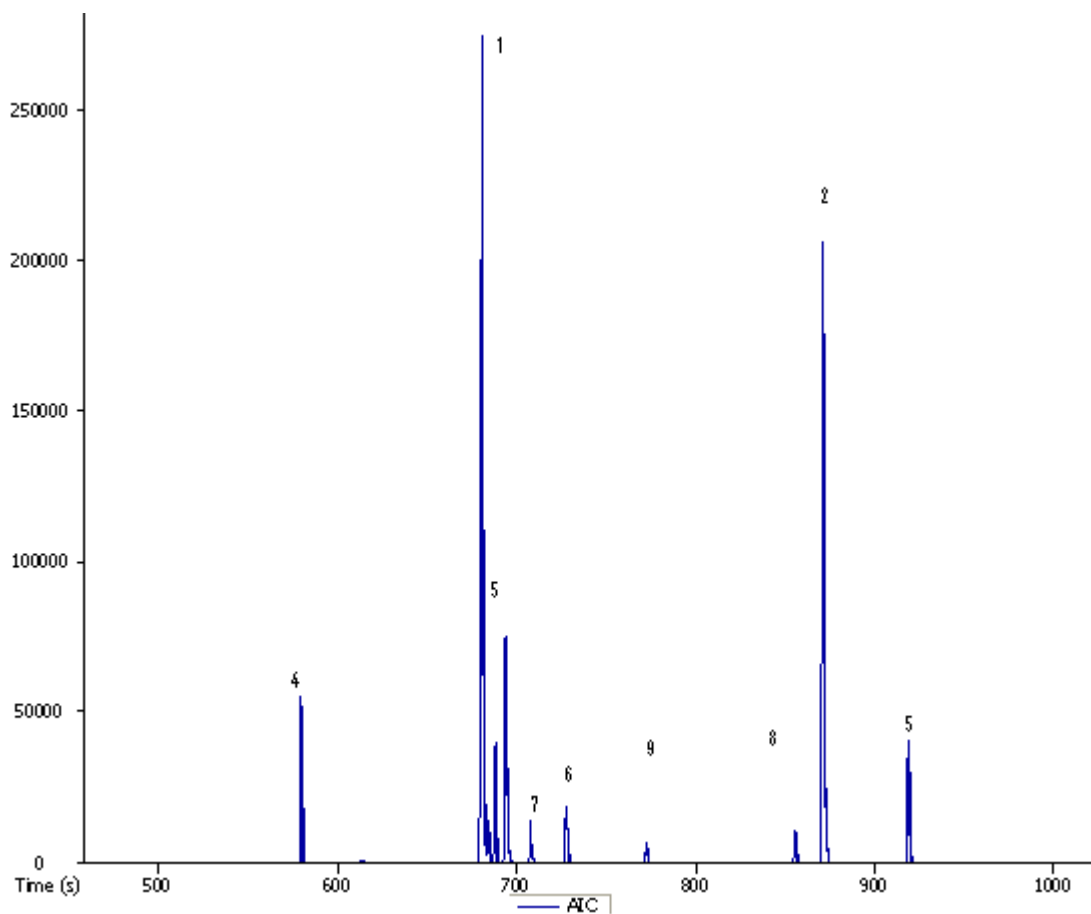


Fig. 30 Cromatograma de la fracción extraída con acetato de etilo del extracto metanólico. **1)** 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; **2)** 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; **3)** 1,2-bencenodicarboxilato de mono (2-etilhexilo); **4)** Ácido n-hexadecanoico; **5)** 2,4-bis-(1,1-dimetil)-fenol; **6)** 9-eicosino; **7)** 6,10-dimetil-2-undecanona; **8)** 1,2-bencenodicarboxilato de bis (2-etilhexilo); **9)** 1-mercapto-2-propanol acetato.

Cuadro 10. Compuestos identificados, mediante CG-M, de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *Equisetum hyemale* L. T.R. (s) tiempo de retención en segundos. I.K. índice de Kovats.

Pico	Nombre del compuesto	Fórmula	Fragmentos	Área %	T.R. (s)	I.K.
	Cetonas					
4	6,10-dimetil-2-undecanona (846)	C ₁₃ H ₂₆ O	58, 71, 95, 165	3.6201	684.712	1990
9	2-(1-metilpropil)-ciclopentanona (712)	C ₉ H ₁₆ O	71, 84, 95, 139, 231	2.3621	772.862	2317.3
5	Alquinos 9-eicosino (854)	C ₂₀ H ₃₈	81, 95, 123, 179,	3.7972	688.462	2002.6
	Terpenos					
3	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (890)	C ₂₀ H ₄₀ O	68, 81, 95, 123, 152, 179, 278	30.547	680.812	1977.1
6	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (896)	C ₂₀ H ₄₀ O	71, 81, 95, 123, 152, 179, 278	11.504	694.362	2023.9
7	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecin-1-ol (764)	C ₂₀ H ₃₈ O	71, 84, 95, 121, 149	1.2175	708.412	2074.84
8	Ácidos orgánicos Ácido n-hexadecanoico (851)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	60,87,129,157,185,213,256	8.1417	727.862	2145.2
	Otros					
1	2,4-bis (1,1-dimetil)-fenol, (918)	C ₁₄ H ₂₂ O	91, 163, 191, 206	5.8798	579.912	1650.4
2	1-mercapto-2-propanol, acetato (705)	C ₅ H ₁₀ O ₂ S	74, 101, 117	2.4099	614.562	1759.8
10	2-Tropilpropanal tosilhidrazona (816)	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂ S	65, 91, 117, 156	0.84671	855.962	2643.9
11	1,2-Benzenedicarboxilato de mono(2-etilhexilo) (924)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	71, 104, 149, 167, 279	26.337	871.362	2704.4
12	1,3-Benzenedicarboxilato de bis (2-etilhexilo) (757)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	70, 83, 112, 149, 167, 279, 390	3.3369	919.112	2892

(#): Similitud del espectro de masas en relación con la biblioteca NIST.

8.2.5 Compuestos identificados por CG-masas de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico de *Equisetum hyemale* L.

En el Cuadro 11 se muestran los compuestos identificados en la fracción soluble en acetato de etilo del extracto metanólico de los tallos de *Equisetum hyemale* L. Los 12 componentes aquí reportados representan el 87.29% de la fracción del extracto (Fig. 37).

El primer compuesto mayoritario es 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (Fig. 31) con un 21.86%. este compuesto ha sido reportado en los aceites esenciales de *Centaurea sessilis*, *Centaurea armena* (Yayli y Yasar, 2005), *Euphorbia hirta* (Ogulensi *et al.*, 2009), *Phlomis persica*, *Phlomis chorassanica* (Sarkhail *et al.*, 2004), *Anthoxanthum odoratum* (Tava, 2001), *Melissa officinalis* (Holla *et al.*, 1997), *Limonium aureum* (Yu *et al.*, 2007), *Aspalathus linearis* (Kawakami *et al.*, 1993), semillas de *Camptotheca acuminata* (Wang *et al.*, 2011) y como componente volátil que le da propiedades al sabor del té verde (Yamanishi *et al.*, 1970).

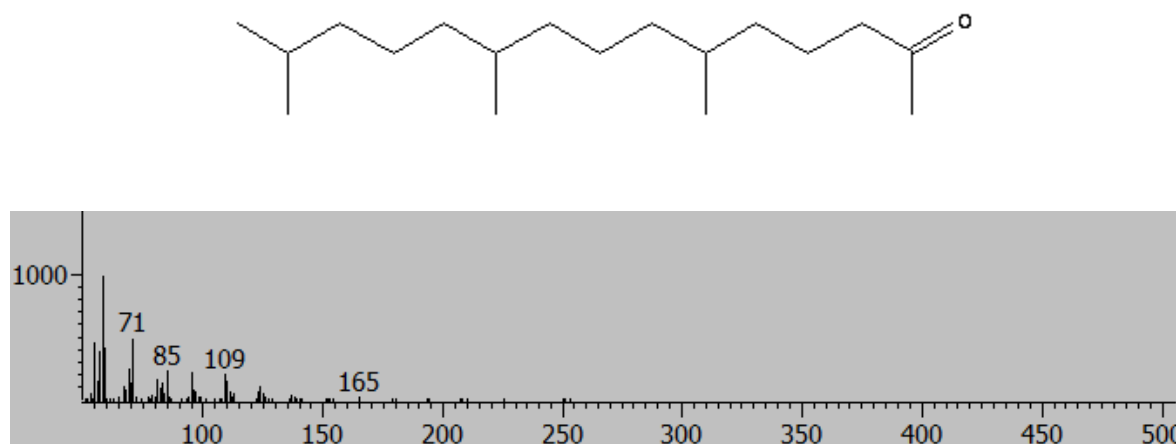


Fig. 31 Estructura química y espectro de masas de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

El segundo compuesto mayoritario identificado es la lactona 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido (Figs. 32 y 33) con un 10.24% del área, que también fue identificada en el extracto hexánico de *Equisetum hyemale* L con menor porcentaje de área (1.07). Este compuesto se forma como resultado de la fotooxidación de la vitamina E (Rontani *et al.*, 2007), por lo que suponemos que en la planta había una mayor concentración de vitamina E, que por factores externos, como exposición a la luz y temperatura, se oxidó formando la lactona.

El 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido ha sido identificado en el extracto etanólico de *Buchanania axillaris* (Sakthivel *et al.*, 2010), en el aceite esencial de *Melissa officinalis* (Holla *et al.*, 1997), *Aquilaria sinensis* (Yufeng *et al.*, 2007), *Oryza sativa* (Miyazawa *et al.*, 2008) y en el extracto metanólico de *Melia azedarach* (Sen y Batra, 2012).

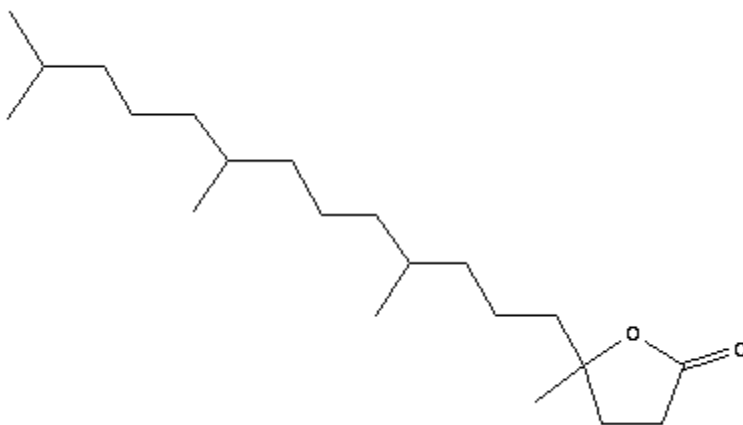


Fig. 32 Estructura química de 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido.

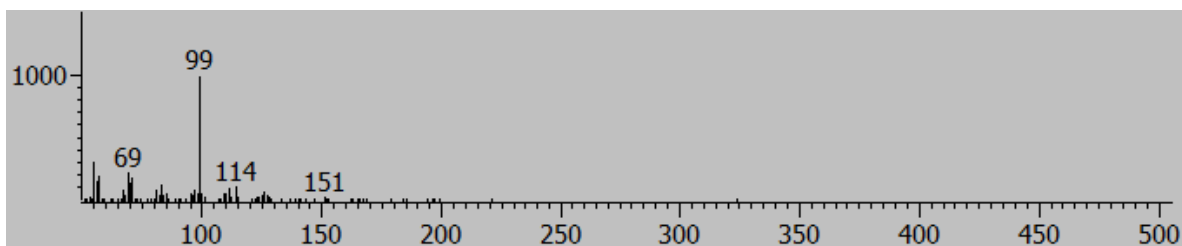


Fig. 33 Espectro de masas de 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido.

Con un 10.11% del área, se identificó la (Z)-9-octadecenamida (Fig. 34), la cual se ha reportado con actividad antiinflamatoria en el líquen *Stereocaulum alpinum* (Ingólfssdóttir *et al.*, 1997). Esta oleamida está implicada como una molécula de señalización del sueño en humanos (Nichols *et al.*, 2007). Lo anterior justifica los usos de *Equisetum hyemale* L como antiinflamatorio e inductor del sueño (relajante).

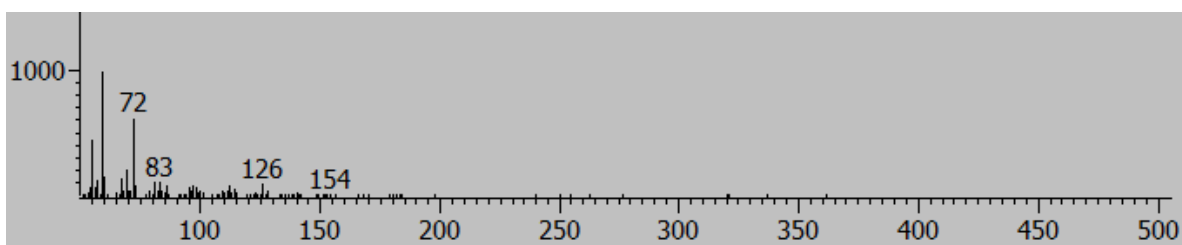
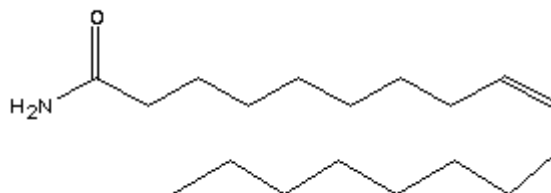


Fig. 34 Estructura química y espectro de masas de (Z)-9-octadecenamida.

El hentriacontano (Fig. 35) con 9.51% de área, es una parafina común de los tallos y hojas verdes (Lichtfouse, 1995; Cameron *et al.*, 2006).

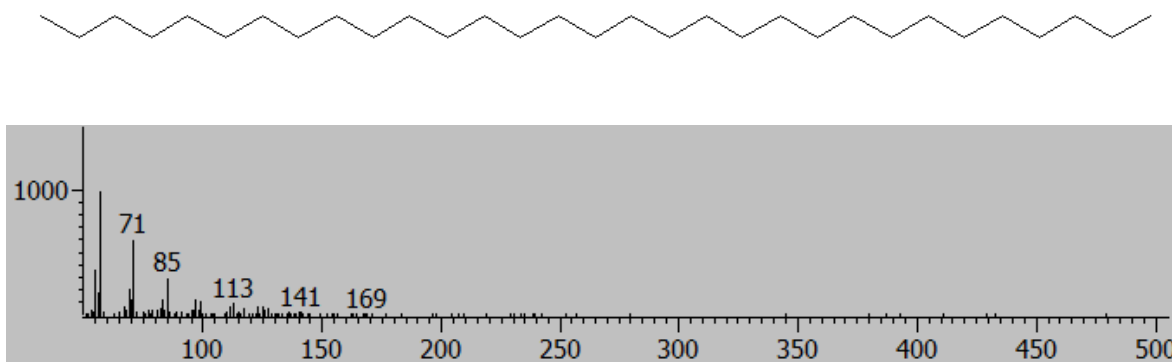


Fig. 35 Estructura química y espectro de masas de hentriacontano.

El 2-metilundecanal (Fig. 36) que se identificó con un 7.43% del área, es un aldehído usado en la encapsulación de sabores y fragancias (Agyemang y Boden, 2005).

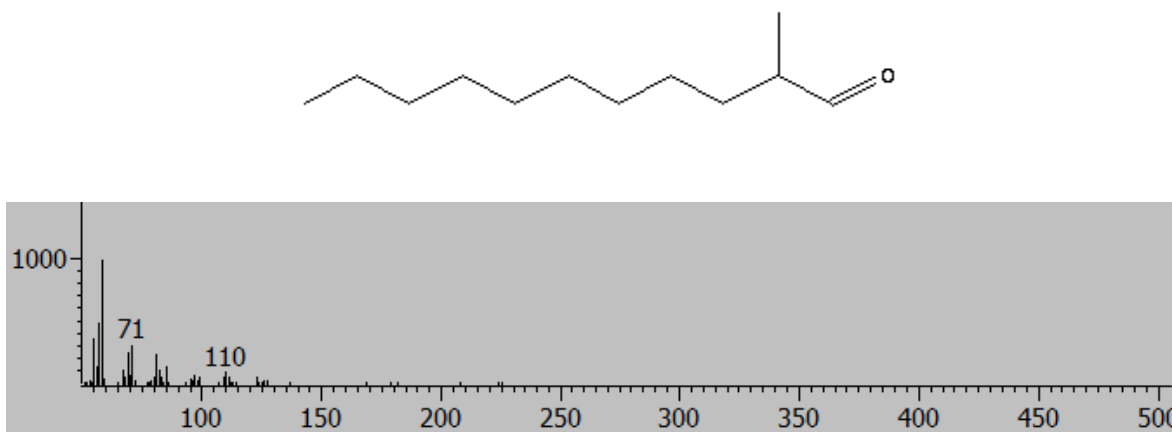


Fig. 36 Estructura química y espectro de masas de 2-metilundecanal.

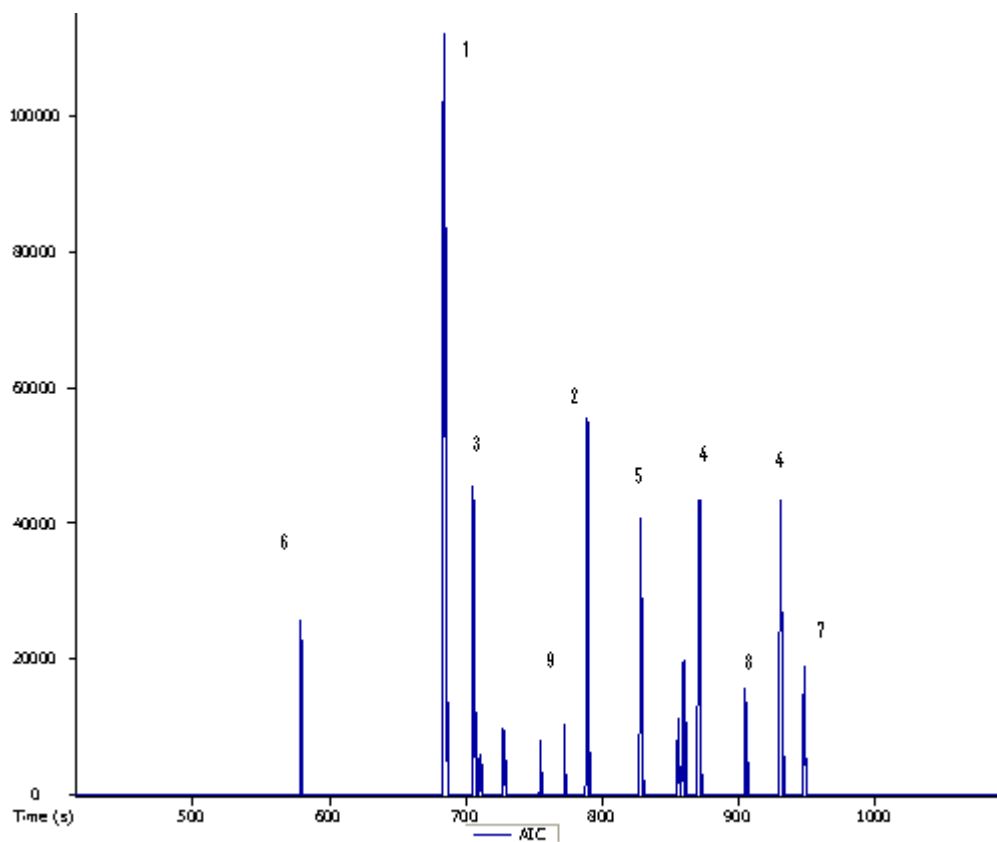


Fig. 37 Cromatograma de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico. **1)** 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; **2)** 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido; **3)** Hentriacontano; **4)** 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; **5)** 2-metilundecanal; **6)** 1,2-bencenodicarboxilato de mono (2-etilhexilo); **7)** 2,4-bis-(1,1-dimetil-1-etil)-fenol; **8)** Ácido nonanoico; **9)** 7-hexileicosano.

Cuadro 11. Compuestos identificados, mediante CG-M, de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico de *Equisetum hyemale* L. T.R. (s) tiempo de retención en segundos. I.K. índice de Kovats.

Pico	Nombre del compuesto	Fórmula	Fragmentos	Área %	T.R. (s)	I.K.
3	Aldehídos 2-metilundecanal (813)	C ₁₂ H ₂₄ O	<u>58</u> , 71, 110	7.4342	705.728	2065.1
2	Cetonas 6,10,14-trimetil-2-pendecanona (909)	C ₁₈ H ₃₆ O	71, 85, 109, 165	21.869	684.478	1989.2
6	1-(3-butiloxiranil)-etanona (795)	C ₈ H ₁₄ O ₂	71, <u>85</u> , 95	2.3236	754.678	2245.9
11	Alcanos Hentriacontano (848)	C ₃₁ H ₆₄	<u>57</u> , 71, 85, 113, 141, 169	9.5181	859.828	2659.1
13	7-hexil-eicosano (916)	C ₂₆ H ₅₄	<u>57</u> , 68, 81, 123, 152, 179, 278	8.8544	905.278	2380.3
15	7-hexil-eicosano (916)	C ₂₆ H ₅₄	<u>57</u> , 71, 85, 113, 141, 169	3.3973	947.778	3004.6
8	Alcoholes 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (894)	C ₂₆ H ₅₄	<u>68</u> , 71, 99, 127, 155, 183	3.5954	788.878	2837.6
4	Ésteres Tridecanoato de metilo (926)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	<u>74</u> , 87, 101, 143, 171, 199, 227, 270	3.4606	710.428	2082.1
5	Ácidos orgánicos Ácido nonanoico (772)	C ₉ H ₁₈ O ₂	<u>60</u> , 87, 129, 157, 185, 213	4.9686	727.628	2144.4
9	Lactonas 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido (941)	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	69, <u>99</u> , 114, 151	10.24	828.078	2534.3
14	Amidas (Z)-9-octadecenamida (858)	C ₁₈ H ₃₅ NO	<u>59</u> , 72, 83, 126, 154	10.113	930.628	2937.3
10	Otros 5-yodopentil-benceno	C ₁₁ H ₁₅ I	65, <u>91</u> , 117, 207	1.5147	855.578	2642.4

(#): Similitud del espectro de masas en relación con la biblioteca NIST.

8.2.6 Análisis de espectroscopía en el infrarrojo (IR) del compuesto precipitado de la fracción metanólica del extracto metanólico.

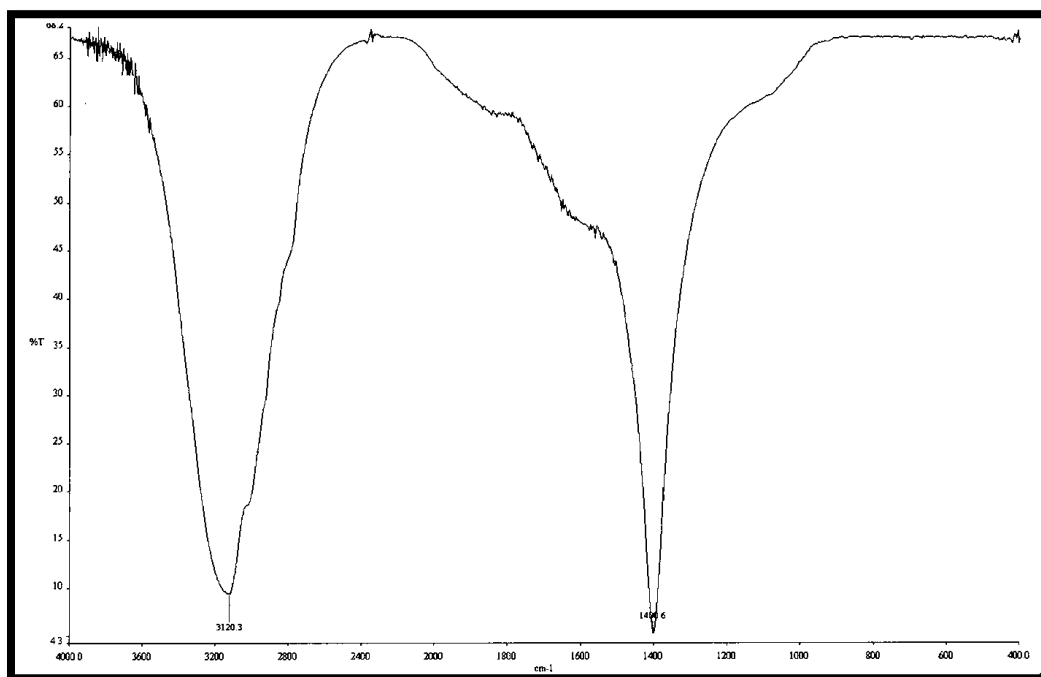


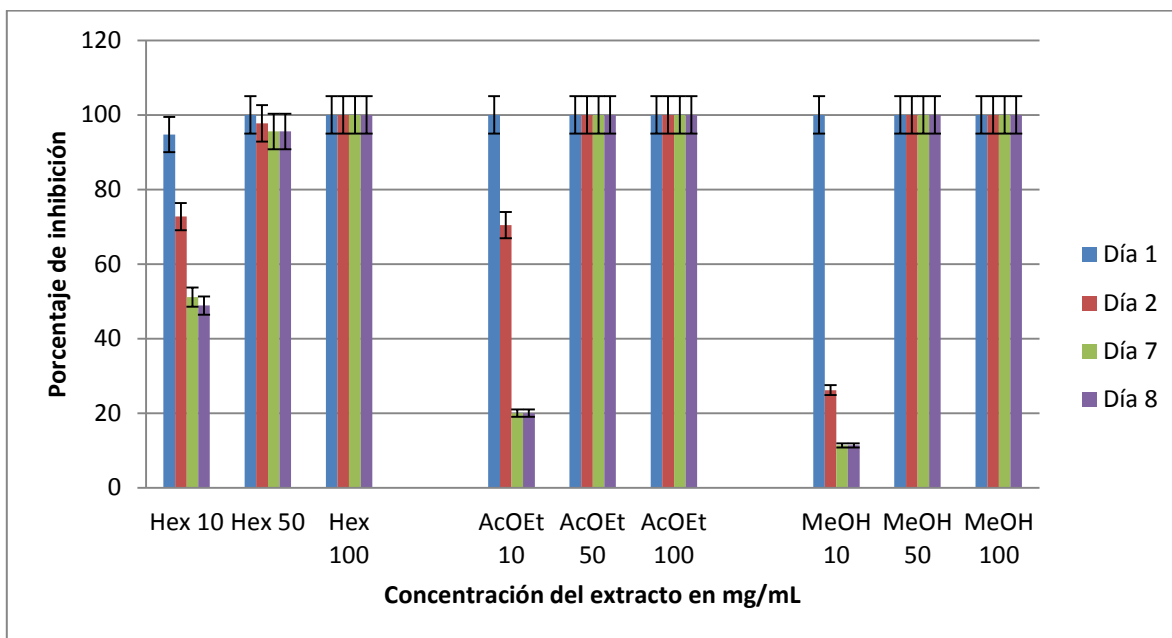
Fig. 38 Espectro de IR del precipitado del extracto metanólico.

El espectro de infrarrojo (Fig. 38) muestra en la región fundamental, una señal ancha en 3120 cm^{-1} , lo cual representa la vibración de alargamiento de un hidroxilo (-O-H) enlazado. En la región de las huellas digitales aparece una señal en 1400 cm^{-1} , la cual señala la deformación -O-H y el alargamiento C-O para alcoholes primarios. Según la bibliografía el espectro corresponde a una pectina (Vasquez *et al.*, 2008).

8.3 Evaluación de la actividad alelopática de los extractos orgánicos de *Equisetum hyemale* L.

8.3.1 Porcentaje de inhibición y velocidad de germinación.

La actividad inhibidora de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *Equisetum hyemale* L sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L se muestra en la gráfica 1. La concentración más baja (10 mg/mL) muestra un porcentaje de inhibición más bajo con respecto a las concentraciones más altas (50 y 100 mg/mL), sin embargo el crecimiento de las radículas y posterior desarrollo de las plántulas fue raquítico en comparación con los controles (Zamorano, 2006). En las concentraciones de 50 y 100 mg/mL de los extractos, a excepción del extracto hexánico donde germinaron 2 semillas, la inhibición fue del 100% (Figs. 39, 40 y 41).

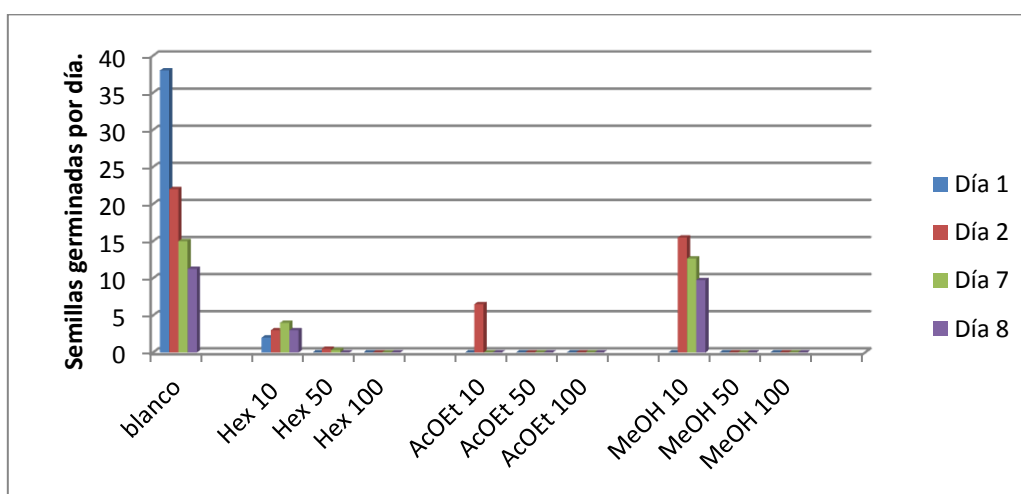


Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH), en concentraciones de 10, 50 y 100 mg/mL; en los días 1, 2, 7 y 8 sobre semillas de *Lactuca sativa* L. El control positivo no se muestra por tener 0% de inhibición. Nivel de significancia de 0.5 para ANDEVA seguido de la prueba de Tukey.

Franco *et al.* (2014) mostraron que el extracto acuoso (1 g de planta en 10 mL de agua) de *Equisetum giganteum* aunque no inhibe la germinación de semillas de lechuga y pepino, si afecta el desarrollo de las estructuras primarias de la plántula (radícula e hipocótilo) y que la velocidad de germinación se retrasa gradualmente al incrementar la concentración del extracto.

Las diferencias entre el trabajo de Franco *et al.* (2014) y el presente se deben a que se trata de dos especies distintas de *Equisetum* por lo que los compuestos aleloquímicos pueden diferir. Los extractos empleados fueron distintos y la cantidad de metabolitos secundarios varían de acuerdo al tipo de suelo y al clima donde crecen.

La gráfica 2 muestra que la velocidad promedio de germinación de las semillas disminuye posiblemente debido a la presencia de compuestos aleloquímicos en los extractos de *Equisetum hyemale* L (Franco *et al.*, 2014). La velocidad de germinación fue nula en las concentraciones más altas (50 y 100 mg/mL) de los extractos de acetato de etilo y metanólico.



Gráfica 2. Velocidad promedio de germinación de semillas de *Lactuca sativa* L en los tratamientos de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH), en concentraciones de 10, 50 y 100 mg/mL; en los días 1, 2, 7 y 8

8.3.2 Compuestos con posible actividad alelopática (aleloquímicos).

Los fenoles, aminas, piperazinas, alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres y cetonas son considerados como aleloquímicos (Bai *et al.*, 2012). Según lo reportado por el análisis gases masas en este trabajo, se tienen compuestos con los grupos funcionales mencionados en los tres extractos (Cuadro 12), hecho que justifica la actividad alelopática de *Equisetum hyemale* L; lo cual le brinda una ventaja competitiva a la planta haciéndola uno de los géneros más longevos del planeta (Husby, 2013).

Cuadro 12. Compuestos con posible actividad alelopática identificados por el análisis de cromatografía de gases-masas.

Compuestos aleloquímicos.	% de área	Extracto
Ácido n-hexadecanoico	23.787	Hex
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	10.79	Hex
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	9.41	Hex
Tridecanoato de metilo	0.298	Hex
2-(2-octenil)-ciclopentanona	0.26	Hex
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	51.7	AcOEt
1,2-bencendicarboxilato de mono (2-etilhexilo)	5.43	AcOEt
1,3-bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo)	1.96	AcOEt
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1.46	AcOEt
Heptadecanoato de metilo	0.22	MeOH
Fitol	1.18	MeOH
Ácido n-hexadecanoico	32.6	MeOH
9,12,15-octadecatrien-1-ol	27.25	MeOH
Tridecanoato de metilo	6.09	MeOH
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	30.54	MeOH
6,10-dimetil-2-undecanona	3.6	MeOH
1,3-bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo)	26.33	MeOH

8.3.3 Análisis estadístico entre las concentraciones.

Con un 95% de confianza la prueba de Tukey, comparando los porcentajes de inhibición de los tres extractos al octavo día, demuestra que no hay diferencias significativas entre 50 y 100 mg/mL, en 10 mg/mL si hay diferencia significativa al compararla con las anteriores. Las semillas de las cajas testigo presentaron diferencias significativas al compararlas con los tratamientos debido a que presentaron germinación del 100% (Anexo II).

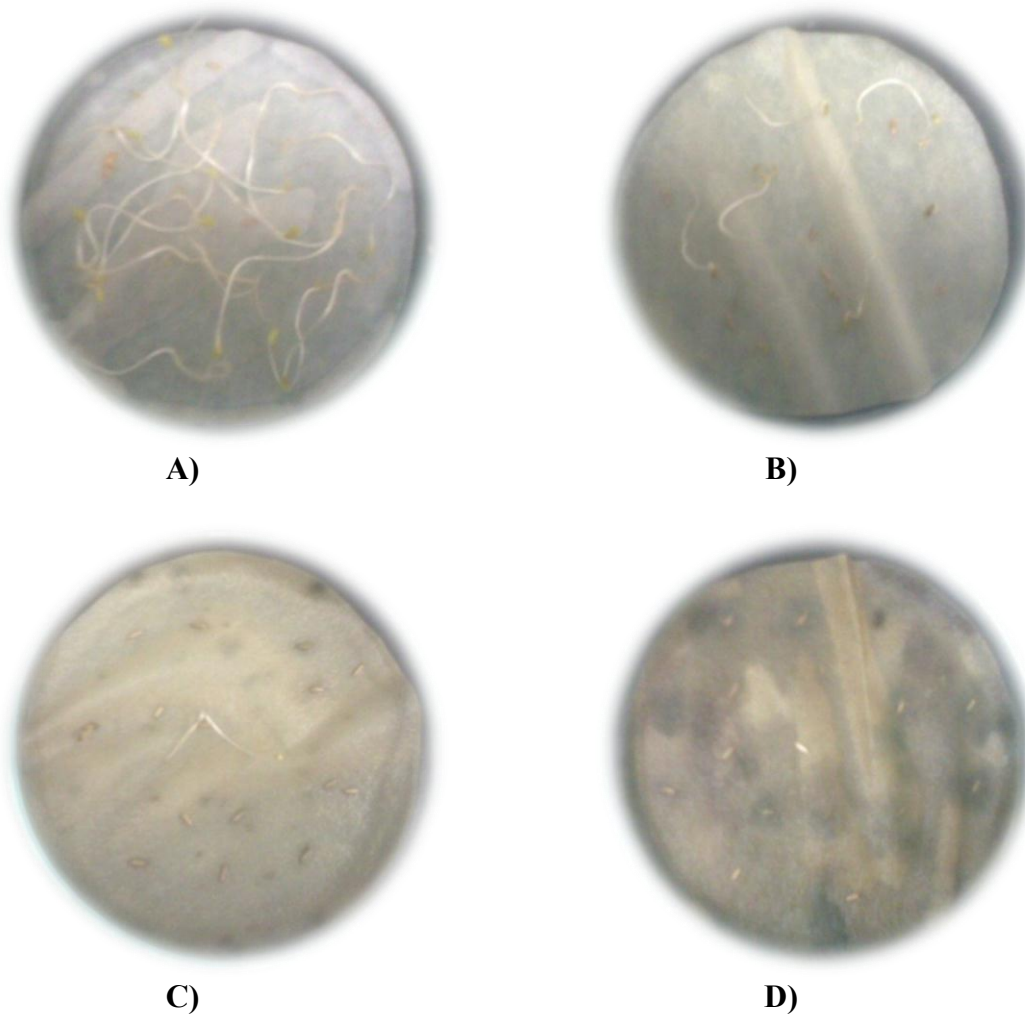


Fig. 39 Bioensayo alelopático con el extracto hexánico de *E. hyemale* L. A) Grupo control de semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. B) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto hexánico 10 mg/mL. C) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto hexánico 50 mg/mL. D) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto hexánico 100 mg/mL.

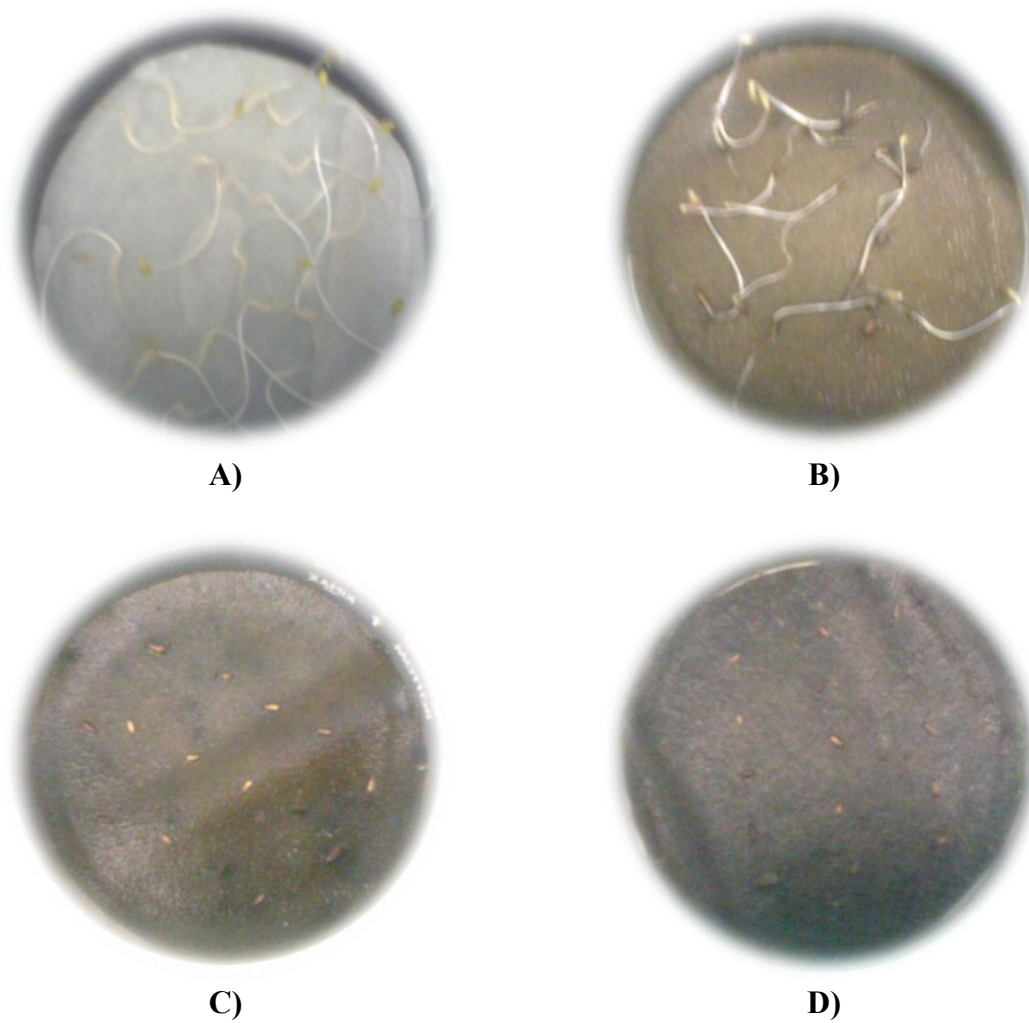


Fig. 40 Bioensayo alelopático con el extracto de acetato de etilo de *E. hyemale* L. A) Grupo control de semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. B) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto AcOEt 10 mg/mL. C) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto AcOEt 50 mg/mL. D) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto AcOEt 100 mg/mL.

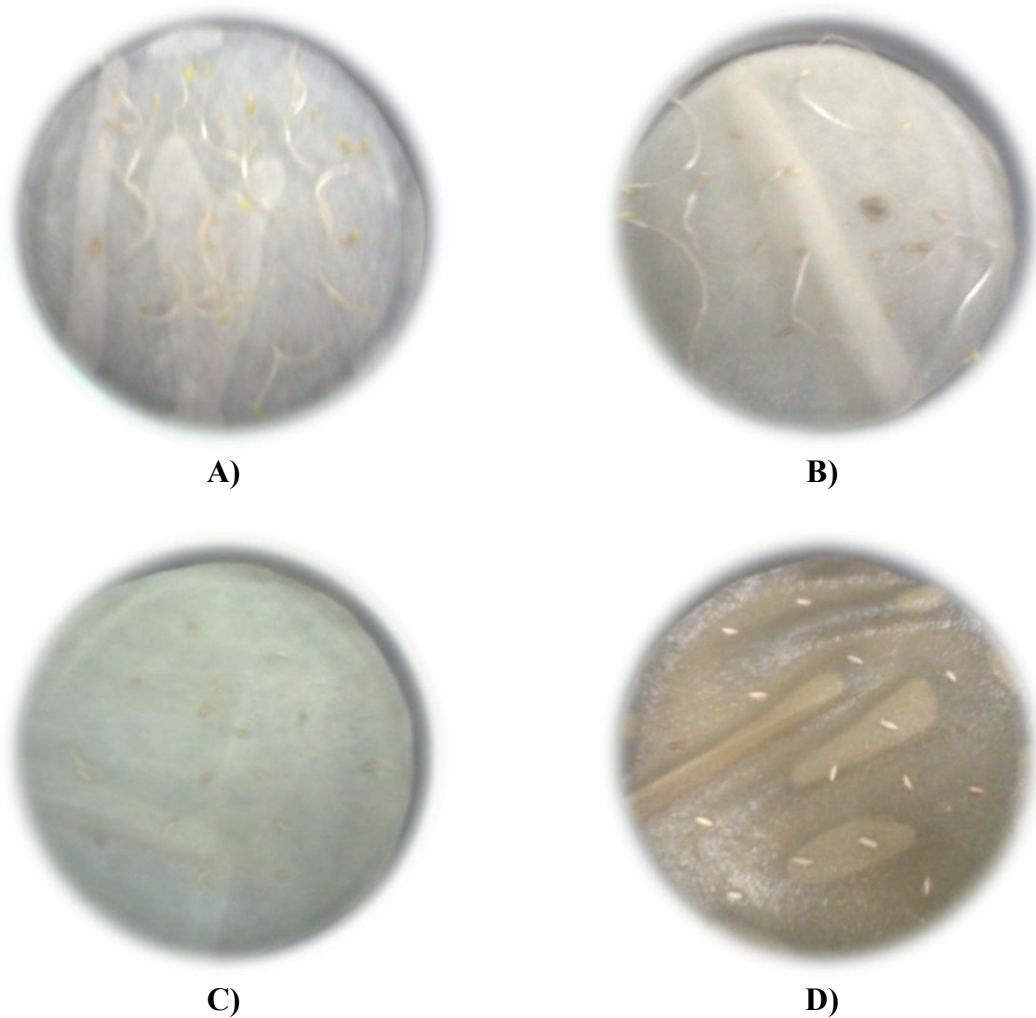


Fig. 41 Bioensayo alelopático con el extracto metanólico de *E. hyemale* L. A) Grupo control de semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. B) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto MeOH 10 mg/mL. C) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto MeOH 50 mg/mL. D) Semillas de *Lactuca sativa* L al 8° día. Concentración del extracto MeOH 100 mg/mL.

8.4 Evaluación de la actividad bactericida de los extractos orgánicos de *Equisetum hyemale* L.

En el cuadro 13 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de actividad antimicrobiana por difusión de discos de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Equisetum hyemale* L, para cada uno de los microorganismos.

Cuadro 13. Resultados de la determinación de la actividad bactericida por el método de difusión de discos.

Bacterias \ [Extracto]	Hex [2]	Hex [10]	Hex [20]	AcOEt [2]	AcOEt [10]	AcOEt [20]	MeOH [2]	MeOH [10]	MeOH [20]
Gram positivas									
<i>Escherichia coli</i>	-	4	7	-	4	7	-	-	4
<i>Bacillus cereus</i>	6.3	6	6.3	6.7	6	-	6.7	4.3	6.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.3	8.7	13.3	9.0	9.3	10.0	9.3	9.0	10.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15.7	11.7	20	-	-	8.7	4.7	6.3	6.7
Gram negativas									
<i>Salmonella tiphy</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- No presentó inhibición

Se muestran los promedios en mm de los diámetros de los distintos halos de inhibición, las concentraciones mostradas corresponden a mg de extracto por disco.

Las bacterias más susceptibles a los extractos fueron las Gram-positivas *Staphylococcus aureus* que presentan inhibición de su crecimiento en las tres concentraciones, *Bacillus cereus* que no mostró actividad en 20 mg/disco del extracto de acetato de etilo; y *Staphylococcus epidermidis* que también presenta inhibición en todas las concentraciones excepto en 2 y 10 mg/disco del extracto de acetato de etilo. Todos los controles positivos presentaron diferencias significativas al compararlos con los tratamientos.

En las bacterias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* no se presentó inhibición alguna en las distintas concentraciones y en *Salmonella typhi* sólo hubo actividad bactericida con el extracto metanólico a la concentración más alta de 20 mg/disco.

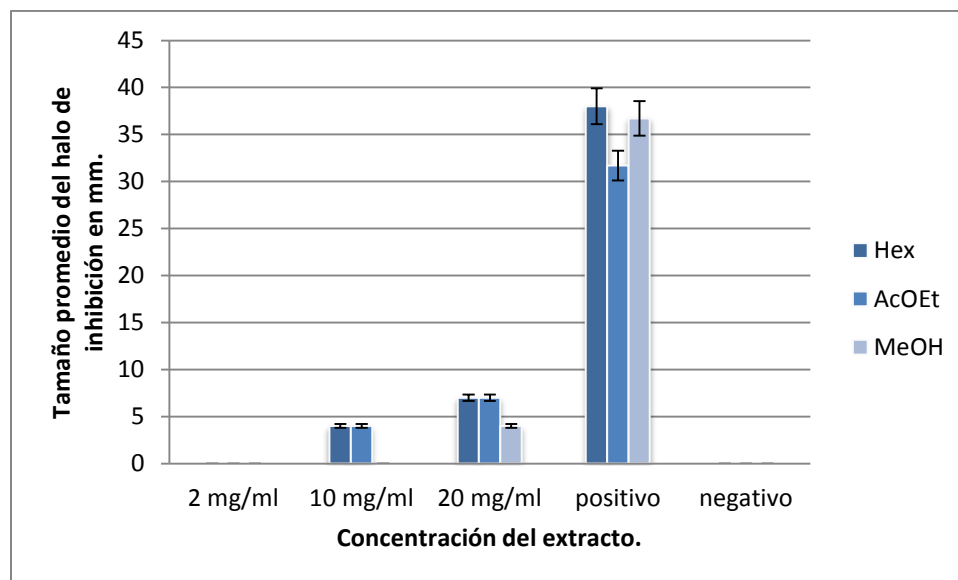
Dados los anteriores resultados se puede decir que los tres extractos de *Equisetum hyemale* L son más activos sobre bacterias Gram-positivas ya que suponemos los compuestos pueden fácilmente penetrar a través de su pared celular e inhibir la mureína constituyente de la membrana de estas bacterias (Schaeter *et al.*, 1994).

8.4.1 Inhibición del crecimiento bacteriano en *Escherichia coli* (Gram +).

En *Escherichia coli* los halos de inhibición van desde los 4 hasta los 7 mm de diámetro (Figs. 42 y 43), los extractos aquí empleados no tienen el mismo efecto que reportan Milovanovic *et al.*, en 2007 donde se probaron los extractos hidroalcohólicos de cuatro especies de *Equisetum* obteniendo halos de inhibición de entre 12 y 17 mm de diámetro. Esto se puede deber al sinergismo entre los compuestos que puede presentar el extracto hidroalcohólico al tener componentes que son solubles en agua y que los extractos empleados en esta investigación no presentan.

Ningún extracto presentó inhibición del crecimiento bacteriano en 2 mg/disco. En la concentración de 10 mg/disco son activos el extracto hexánico y el de acetato de etilo, presentando halos de inhibición de 4 mm de diámetro (Gráfica 3), tamaño promedio, que no presenta diferencia significativa, con un $\alpha = 0.5$, entre los dos extractos. En la concentración más alta de 20 mg/disco los extractos anteriores presentan halos de inhibición de 7 mm de diámetro, el extracto metanólico presenta actividad inhibitoria con

un promedio de halo de 4 mm de diámetro; lo cual marca una diferencia significativa al compararlo con el hexánico y el de acetato de etilo (Anexo II).



Gráfica 3. Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en *E. coli* por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH). Nivel de significancia de 0.5 para ANDEVA seguido de la prueba de Tukey.



Fig. 42 Antibiograma de *E. coli* frente al extracto MeOH

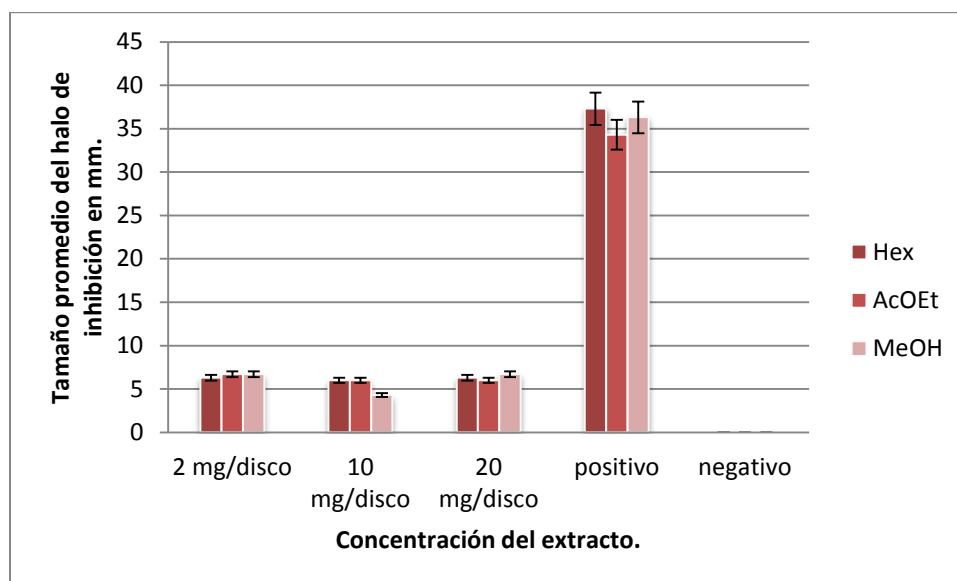


Fig. 43 Antibiograma de *E. coli* frente al extracto AcOEt.

8.4.2 Inhibición del crecimiento bacteriano en *Bacillus cereus* (Gram +).

Los tres extractos en sus tres concentraciones distintas presentaron actividad bactericida. Los halos de inhibición tienen un promedio de 6 mm de diámetro (Gráfica 4). No muestran diferencias significativas, con un $\alpha = 0.5$, entre los tratamientos (Anexo II), a excepción del extracto metanólico en 10 mg/disco que presentó un halo de 4 mm de diámetro, el cual según la prueba de Tukey no es significativamente diferente (Fig. 44).

Los halos de inhibición obtenidos fueron menores a los reportados por Canadanovic-Brunet *et al.* en el 2009 en Serbia, donde la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *Equisetum arvense* L en concentración 1 mg/disco produjo halos de inhibición de 8.7 mm de diámetro. En contraposición Lotfipour *et al.*, 2008, en Irán, usando extractos de acetato de etilo y clorofórmico de *Equisetum arvense* L no obtuvieron inhibición sobre *Bacillus cereus*.



Gráfica 4. Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en *B. cereus* por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH). Nivel de significancia de 0.5 para ANDEVA seguido de la prueba de Tukey.



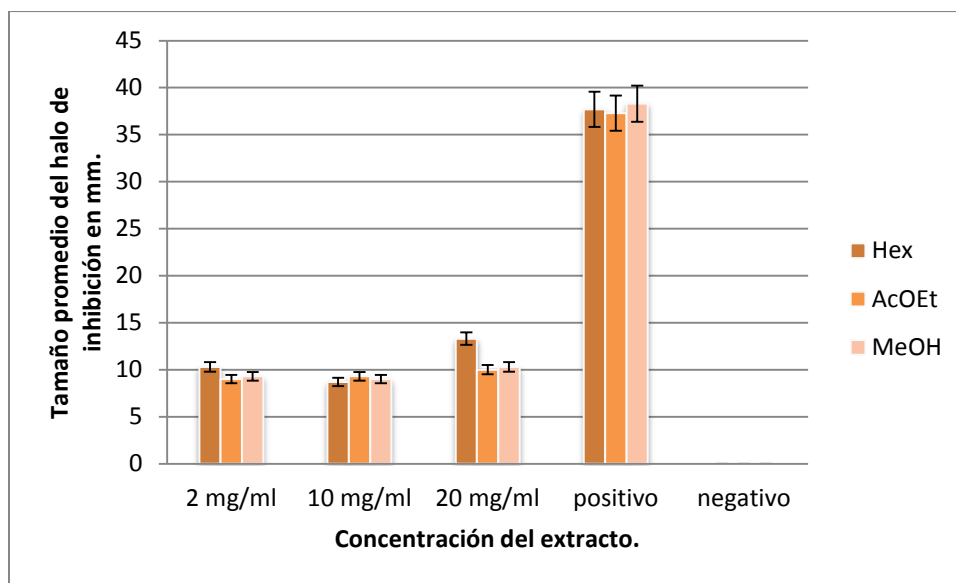
Fig. 44 Antibiograma de *B. cereus* frente al extracto MeOH

8.4.3 Inhibición del crecimiento bacteriano en *Staphylococcus aureus* (Gram +).

La mayor actividad bactericida se presentó en *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición que superan los 10 mm de diámetro (Figs. 45 y 46). Con 95% de confianza se demuestra que no hay diferencias significativas entre los extractos en las concentraciones de 2 y 10 mg/disco. El extracto hexánico en 20 mg/disco si muestra diferencia significativa respecto al extracto de acetato de etilo y metanólico (Gráfica 5) (Anexo II).

Staphylococcus aureus es causante de fuertes infecciones al entrar al organismo a través de las heridas en la piel humana (Carpenter, 1979; Duerden *et al.*, 1993) y uno de los usos de *Equisetum hyemale* es como cicatrizante de la misma, por lo tanto se puede decir que al presentar dicha actividad evita la infección bacteriana de las heridas, acelerando con esto el proceso de cicatrización.

Canales *et al*, 2005 en su trabajo reportan actividad bactericida del extracto hexánico de *Equisetum hyemale* en concentración de 2mg/disco frente a *Staphylococcus aureus*, presentando halos de inhibición de 10 mm \pm 6 diámetro, lo cual coincide con el resultado obtenido en la presente investigación.



Gráfica 5. Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en *S. aureus* por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH). Nivel de significancia de 0.5 para ANDEVA seguido de la prueba de Tukey.



Fig. 45 Antibiograma de *S. aureus* frente al extracto AcOEt.

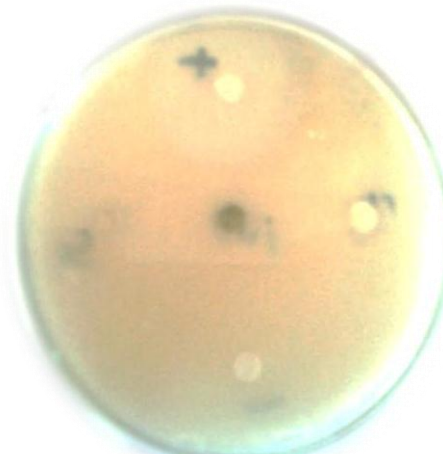


Fig. 46 Antibiograma de *S. aureus* frente al extracto Hex.

8.4.4 Inhibición del crecimiento bacteriano en *Staphylococcus epidermidis*

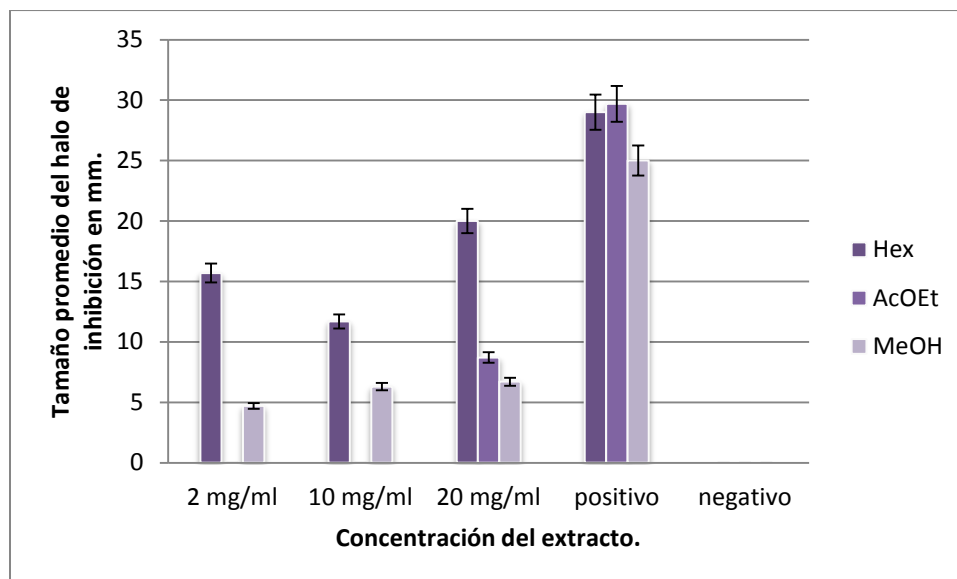
(Gram +).

Esta fue la bacteria más susceptible al extracto hexánico, que resulta ser el más activo frente a este microorganismo, presentó el mayor promedio de diámetro de halos de inhibición de 20 mm en la concentración de 20 mg/disco (Fig. 47). Mostró una diferencia significativa, con 95% de confianza, al compararlo con los otros extractos (Gráfica 6).

El extracto metanólico presentó actividad bactericida con halos desde los 4 hasta los 6 mm, lo cual muestra una diferencia significativa al compararlo con la actividad del extracto hexánico (Anexo II).

El extracto de acetato de etilo no fue activo en las concentraciones de 2 y 10 mg/disco. Presentó actividad inhibitoria hasta 20 mg/disco, con un promedio de diámetro de halo de inhibición de 8.7 mm, aunque no muestra diferencia significativa, según la prueba de Tukey, al compararlo con la actividad del extracto metanólico en la misma concentración.

Lotfipour *et al*, en 2008 obtuvieron halos de inhibición de 10 mm de diámetro, sobre *Staphylococcus epidermidis*, empleando 10 µl de extracto de acetato de etilo de *Equisetum arvense* L. Por otra parte, Uslu *et al.*, en 2013 reportaron que al usar el extracto etanólico en concentración de 3 mg/disco de *Equisetum arvense* L se presentaron halos de inhibición de 10 mm de diámetro. Ambos casos son diámetros de halo de inhibición mayores a los presentados, en este trabajo, por los extractos de acetato de etilo y metanólico de *Equisetum hyemale* L.



Gráfica 6. Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en *S. epidermidis* por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH). Nivel de significancia de 0.5 para ANDEVA seguido de la prueba de Tukey.

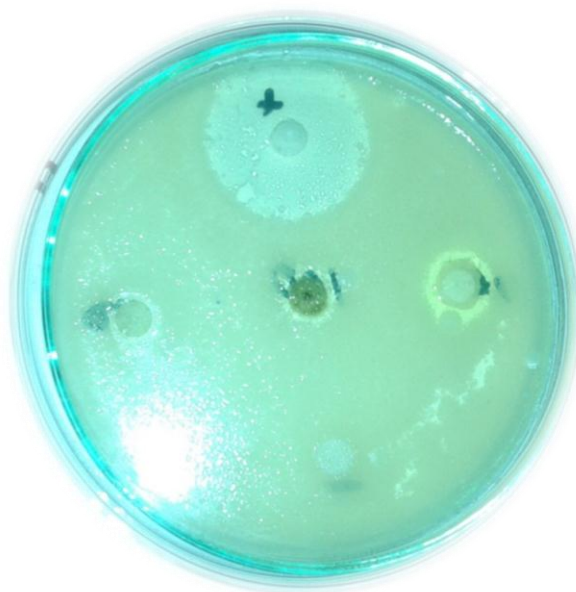
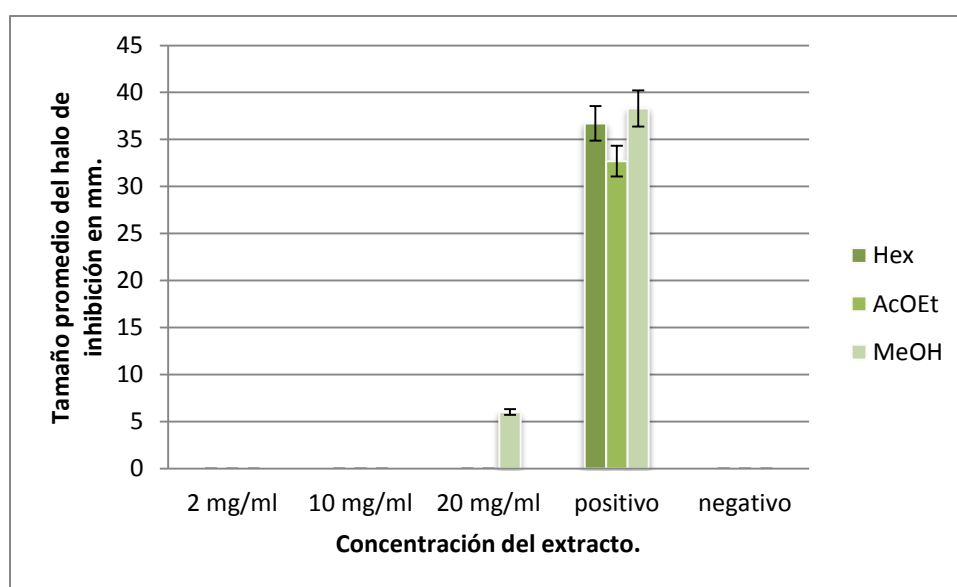


Fig. 47 Antibiograma de *S. epidermidis* frente al extracto Hex.

8.4.5 Inhibición del crecimiento bacteriano en las bacterias Gram-negativas *Salmonella tiphy* y *Kleibsiella pneumoniae*.

En *Salmonella tiphy* sólo el extracto metanólico, en la concentración de 20 mg/disco, presentó actividad inhibitoria con halos de inhibición, con promedio de tamaño de diámetro, de 5 mm (Gráfica 7). Ninguno de los tres extractos, en sus tres concentraciones presentó actividad inhibitoria frente a *Kleibsiella pneumoniae*.



Gráfica 7. Tamaño promedio de los halos de inhibición (mm) en *S. tiphy* por difusión de disco de los extractos hexánico (Hex), de acetato de etilo (AcOEt) y metanólico (MeOH).

La nula inhibición se debe a que las bacterias Gram-negativas tienen en su membrana un lipopolisacárido bacteriano (LPS) que no se encuentra en otros sitios en la naturaleza, es una molécula compleja de naturaleza lipídica que no es atravesada por compuestos hidrófilos. Aunada a la capa de mureína que presentan todas las bacterias que impide el paso de compuestos hidrófobos e hidrófilos, hacen que las Gram-negativas presenten una resistencia mayor que las Gram-positivas (Schaeter *et al.*, 1994) (Ver Anexo V).

8.4.7 Compuestos con posible actividad bactericida.

En el cuadro 14 se muestran 9 compuestos identificados en los tres extractos, mediante cromatografía de gases acoplada a masas. Corresponden a terpenos y ésteres ya que al ser de naturaleza volátil fue posible encontrarlos por este análisis. No se identificaron alcaloides ni flavonoides (que se reportan con actividad bactericida), ya que esta técnica no es la adecuada para identificar estos compuestos.

No se encontró reporte alguno, en las bases de datos consultadas, de que alguno de estos compuestos aquí mencionados presentara propiamente actividad bactericida, para saber si tienen dicho efecto habría que aislarlos y probarlos individualmente frente a las cepas bacterianas usadas en esta investigación o en otras pertenecientes a los mismos géneros empleados en este trabajo.

Cuadro 14. Compuestos con posible actividad bactericida, identificados por el análisis de cromatografía de gases masas.

Compuesto.	% de área	Extracto
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	10.719	Hex
3,6,6-trimetil-2-norpinanol	0.88024	Hex
Tridecanoato de metilo	0.298	Hex
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	51.702	AcOEt
Tetrahidropiraniol éter de citronelol	0.12473	AcOEt
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecin-3-ol	2.0559	AcOEt
Heptadecanoato de metilo	0.22	MeOH
Tridecanoato de metilo	6.09	MeOH
11,14,17-eicosatrienoato de metilo	1.2267	MeOH
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	5.5076	MeOH
Fitol	1.1868	MeOH
9,12,15-octadecatrien-1-ol	27.25	MeOH

9 CONCLUSIONES.

-Por primera vez se reporta la presencia de los siguientes compuestos en el género *Equisetum*: Ácido hexadecanoico; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; tridecanoato de metilo, heptadecanoato de metilo, 9,12-octadecadienoato de metilo; (Z)-9-octadecenamida; tocoferol y su producto de fotooxidación: 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-ólido,

-Los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *Equisetum hyemale* L en concentración de 10 mg/ml, permiten la germinación de *Lactuca sativa* L pero limitan el desarrollo de las plántulas, el cuál es raquítrico.

-Los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico a 50 y 100 mg/ml de *Equisetum hyemale* L impiden la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L.

-Se identificaron 12 compuestos que posiblemente sean responsables de la actividad alelopática de *Equisetum hyemale* L: ácido n-hexadecanoico; 3,7,11,15-tetrametil-hexadecen-1-ol; ácido 9,12,15-octadecatrienoico; tridecanoato de metilo; 2-(2-octenil)-ciclopentanona; 1,2-bencendicarboxilato de mono (2-etilhexilo); 1,3-bencendicarboxilato de bis (2-etilhexilo); 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; heptadecanoato de metilo; fitol; 9,12,15-octadecetrien-1-ol y 6,10-dimetil-2-undecanona.

-Los extractos de *Equisetum hyemale* L mostraron efecto antimicrobiano frente a las bacterias Gram-positivas *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

-En la bacteria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* los extractos no presentaron actividad antimicrobiana. El efecto inhibitorio en *Salmonella tify* se presentó con el extracto metanólico a 20 mg/d con halos de inhibición de 5 mm.

-Las bacterias más susceptibles fueron las del género *Staphylococcus*; *Staphylococcus epidermidis* fue la que presentó mayor inhibición con el extracto hexánico con halos de inhibición de 20 mm.

-Se encontraron 9 compuestos químicos que posiblemente sean los responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Equisetum hyemale* L: 3,7,11,15-tetrametil-hexadecen-1-ol; 3,6,6-trimetil-2-norpinanol; tridecanoato de metilo; tetrahidropiraniol éter de citronelol; heptadecanoato de metilo; 11,14,17-eicosatrienoato de metilo; fitol; 9,12,15-octadecatrien-1-ol y 3,7,11,15-tetrametil-hexadecan-3-ol.

10 SUGERENCIAS.

-Someter a los extractos orgánicos (hexánico, de acetato de etilo y metanólico) de *Equisetum hyemale* L al análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), para la identificación de alcaloides y flavonoides.

-Probar el efecto alelopático de los extractos de *Equisetum hyemale* L sobre otras semillas, principalmente en aquellas semillas de plantas que son plagas en los cultivos.

-En actividad bactericida se recomienda encontrar la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Equisetum hyemale* L.

11 BIBLIOGRAFÍA.

- Abdel M., Bastien J., Mahler W., Jia Q., Reinecke N., Robinson Jr. W, Shu Jong-hua y Salles-Asin J. (1996) Drug leads from the Kallawayaya herbalist of Bolivia 1. background, rationale, protocol and anti-hiv activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 50, 156-157.
- Andrade A., Wiedenfeld H., Revilla M. e Islas S. (2000) Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 129-133
- Agoramoorthy G., Chandrasekaran M., Venkatesalu V., y Hsu, M. J. (2007) Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 4, 739-742
- Agyemang D. y Boden R.M. 18 Enero. (2005) Encapsulated flavor and fragrance.U.S. Patent No 6, 844, 302.
- Bai J, Wang J, Tao B. y Teng C. (2012) Allelopathy and preliminary separation of allelopathic substance in the extracts of wheat seed germination. *Advanced Materials Research*, 468, 565-568
- Benelli P., Riehl C., Smânia A., Smânia E. y Ferreira S. (2010) Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomare obtained by SFE and low techniques: Mathematical modeling and extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55, 132-141.
- Birkett M., Chamberlain K., Hooper A. y Pickett J.A. (2001) Does allelopathy offer real promise for practical weed management and for explaining rhizosphere interactions involving higer plants? *Plant and soil*, 232, 31-39
- Bonnet R., Middlemiss F. y Noro T. (1972) Distribution of equisetolic acid in the equisetales. *Phytochemistry*, 11, 2801-2802.
- Boudarene L., Rahim L., Baaliouamer A., y Meklati B. (2004) Analysis of Algerian essential oils from twigs, needles and wood of *Cedrus atlantica* G. Manetti by GC/MS. *Journal of Essential Oil Research*, 16, 6, 531-534.
- Brooks R., Holzbecher J. y Ryan D. (1981) Horsetails (*Equisetum*) as indirec indicators of gold mineralization. *Journal of Geochemical Exploration*, 16, 21-26.
- Brune T. y Haas K. (2011) *Equisetum* species show uniform epicuticular wax structures but diverse composition patterns. *AoB plants*, 2011, plr009.

- Cameron K., Teece M., y Smart L. (2006) Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant physiology*, 140, 1, 176-183.
- Ćanadanović-Brunet J., Ćetković, G., Djilas S., Tumbas V., Savatović S., Mandić A. y Cvetković D. (2009) Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2, 269-278.
- Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Avila G., Duran A. y Lira R. (2005) Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 429-439.
- Cantón R. (2010) Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 6, 375-385.
- Carpenter P. (1979) *Microbiología*. Interamericana, México. 165 págs.
- Cubas P (2008) Plantas vasculares que dispersan esporas (pterodófitos) www.aulados.net Botánica. Recuperado el 10 de Febrero de 2012
- Cushnie T. y Lamb A. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 2, 5, 343-356.
- Cyronak M., Britton G. y Simpson K. (1977) Rhodoxanthin, the red pigment of *Equisetum arvense* sporophytes. *Phytochemistry*, 16, 5, 612-613
- Dav M. y Gnudi F. (1999) Phenolic compounds in surface water. *Water Research*, 33, 14, 3213-3219.
- Davyt D., Dellacassa E., Ferreira P., Menendez P., Moyna P. y Vazquez, A. (1991) *Fitoterapia*, 62, 519-521.
- Demitsky V., Saksonov S., y Rozentsvet O. (2000) Occurrence of diacylglyceryltrimethylhomoserines and major phospholipids in some plants. *Phytochemistry*, 54, 401-407.
- Duerden B., Reid, T., Jewsbury, J., y Turk, D. (1993) *Microbiología de enfermedades infecciosas*. Limusa, México.
- Ezekwe C., Nwodo O., y Ezea S. (2014) Chemical and Phytochemical Components of *Gongronema latifolium* (Asclepiadaceae). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5, 2, 857-866.

- Franco M., de Almeida, R. y de Souza, R. (2014) Allelopathic potential of *Equisetum giganteum* L. and *Nephrolepis exaltata* L. on germination and growth of cucumber and lettuce. *Journal of Plant Sciences*, 2, 5, 237-241.
- Gallardo Pérez (2006) Importancia etnobotánica de una planta vascular sin semilla en México: *Equisetum*. *Polibotánica*, 21, 61-64,.
- García D., Ramos A., Sanchis V. y Marín. (2013) *Equisetum arvense* hydro-alcoholic extract: phenolic composition and antifungal and antimycotoxigenic effect against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in stored maize. *Journal of Science Food Agriculture*, 93, 2248-2253
- Granados P. y Villaverde P. (1996) Microbiología. Bacteriología: características y clasificación bacteriana.
- Gremli H. A. (1974) Interaction of flavor compounds with soy protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51,1, 95A-97A.
- Guerra Santos M, Kelecom A, Ribeiro S, Gomes M, Rocha L. y Garrett R.(2010) Phytochemical studies in pteridophytes growing in Brazil: a review. *The American Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4, 113-125
- Gutiérrez A. y del Río J. (2003) Lipids from flax fibers and their fate in alkaline pulping. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 17, 4965-4971
- Hauke R. L. (1963) A taxonomic monograph of the genus *Equisetum* Subgenus *Hippochaete*. *Nova Hedwigia* 8, 1-123.
- Hauke R. L. (1969) The natural history of *Equisetum* in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 15, 269-281.
- Hauke R. L. (1993) *Equisetaceae*. in: flora of North America. Editorial committee (editors), flora of North America North of Mexico, 2. Oxford University Press, New York, NY.
- Hernández R. N. (2013) Lectura interpretada del antibiograma. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 42, 4, 502-506.
- Hollá M., Svajdlenka E., Tekel J., Vaverková S., y Havránek E. (1997) Composition of the essential oil from *Melissa officinalis* L. cultivated in Slovak Republic. *Journal of Essential Oil Research*, 9, 4, 481-484.
- Hossain M., Al-Toubi W., Weli A., Al-Riyami A. y Al-Sabahi J. (2013) Identification Omani neem. *Jof Taibah University For Science Journal*, 20, 1-8.

- Hu C., Liang Y., Guo F., Li X. y Wang W. (2010) Determination of essential oil composition from *Osmanthus fragans* tea by GC-MS combined with a chemometric resolution method. *Molecules*, 15, 5, 3683-3693.
- Husby Chad (2013) Biology and functional ecology of *Equisetum* with emphasis of the giant horsetails. *The New York Botanical Garden*, 79, 147-177.
- Ingólfssdóttir K, Gissurarson S, Nenninger A.,Neszmelyi A. y Wagner H. (1997) Biologically active alkalamide from the lichen *Stereocaulum alpinum*. *Phytomedicine*, 4, 331-334.
- Jancy R, P. M., Kannan, P. S. M., y Kumaravel, S. (2011) Screening of antioxidant activity, total phenolics and gas chromatograph and mass spectrometer (GC-MS) study of *Delonix regia*. *African journal of biochemistry research*, 2, 12, 341-347.
- Kang W. Yi Q. y Wang M. (2009) Composition of the essential oil of *Adiantum flabellulatum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 4, 575-577
- Karimi H. y Jaafar Z.E. (2011) HPLC and GC-MS Determination of Bioactive Compounds in Microwave Obtained Extracts of Three Varieties of *Labisia pumila* Benth. *Molecules*, 16, 6791-6805.
- Kawakami M., Kobayashi A., y Kator K. (1993) Volatile constituents of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by extraction process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 4, 633-636.
- Koneman M.D. (2003) Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Médica Panamericana, México. Médica Panamericana, Argentina.
- Koneman W., Alen S., Dowell V., Janda W., Somers H. y Winn W. (1992) Diagnóstico microbiológico.
- Kuklinski C. (2000) Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega, España, 186 págs.
- Latini G. (2005) Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta*, 361, 20-29
- León-Camacho M, Alvarez Serrano M y Graciani E..(2004) Formation of stigmasta-3,5-diene in olive oil during deodorization and/or physical refining using nitrogen as stripping gas. *Grasas y Aceites*, 55, 3, 227-232.
- Li P., Matsunaga K. y Ohizumi Y. (1999) Enhancement of the nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells by chinese and paraguayian medicinal plants. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 7, 22, 752-755.

- Lichtfouse É. (1995). Labelling of soil hentriacontane by maize cultivation. *Tetrahedron letters*, 36, 4, 529-530.
- Liu Y., Yang X. y Wu B. (2006) GC-MS analysis of essential oil constituents from buds of *Tussilago farfara* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 15, 1, 10.
- Lock U. (1994) Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Pontificada Universidad de Perú, Perú, 64 págs.
- Lotfipour F., Nazemieh H., Fathi A., Garaei N., Arami S., Talat S., y Hasanpour, R. (2008) Evaluation of antibacterial activities of some medicinal plants from North-West Iran. *Iranian Journal of Basics Medical Sciences*, 2, 11, 80-85.
- Lytle T.F. y Server J. (1976) Hydrocarbons and fatty acids of ferns. *Phytochemistry*, 15, 965-970.
- Lytle T.F. y Server J. (1973) Hydrocarbons and fatty acids of *Lycopodium*. *Phytochemistry*, 12, 623-629
- Martins A., Salgueiro L., da Cunha A., Vila R., Cañigüeral S., Tomi F. y Casanova J. (2003) Essential oil composition of *Eryngium foetidum* from S. Tome e Principe. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 2, 93-95
- Matsunaga K., Sasaki S. y Ohizumi Y. (1997) Excitatory and inhibitory effects of paraguayian medicinal plants *Equisetum giganteum*, *Acanthospermum aorta* and guinea-pig left atrium. *Natural Medicines*, 51, 5, 478-481.
- McGinty D., Letizia C. S., y Api A. (2010) Fragrance material review on phytol. *Food and Chemical Toxicology*, 48, S59-S63.
- Mello M. y Budel J. (2014) *Equisetum* L. (Equisetaceae): Ama Revisão Saúde, 1,9, 1-15.
- Méndez A., Hernández A., López M. y Morales J. (2009) Herbolaria oaxaqueña para la salud. Instituto Nacional de las Mujeres. México. 141 págs.
- Mendoza A. y Pérez B. (2009) Helechos y licopodios de México. Vol. 1. CONABIO. UAM Iztapalapa. México, 267 págs.
- Meyer A., Suhr K., Nielsen P. y Holm F. (2002) Natural food preservatives. Minimal processing technologies in the food industry, 124-174.
- Michielin E., Bresciani L., Danielski L., Yunes R., y Ferreira S. R. (2005) Composition profile of horsetail *Equisetum giganteum* L. oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. *The Journal of supercritical fluids*, 33, 2, 131-138.

- Mickel J. y Beitel J. (1988) Pteridophyte flora of Oaxaca, Mexico. Memoirs of the New York Botanical Garden, New York, 568págs.
- Mickel J. y Smith, A (2004) The pteridophytes of Mexico part I. The New York Botanical Garden. New York USA, 1055 págs.
- Milton J. y Duckett G (1985) Potential allelopathy in *Equisetum* proceeding. Section B, Biological Sciences, 86, 468-469.
- Milovanović V., Radulović N., Todorović Z., Stanković M., y Stojanović G. (2007) Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian *Equisetum* species. Plant Foods for Human Nutrition, 62, 3, 113-119.
- Miyazawa M., Nagai S. y Oshima T. (2008) Volatile Components of the Straw of *Oryza sativa* L. Journal of oleo science, 57, 3, 139-143.
- Msaada K., Hosni K., Taarit M. B., Chahed T. y Marzouk B. (2007) Variations in the essential oil composition from different parts of *Coriandrum sativum* L. cultivated in Tunisia. The Italian journal of biochemistry, 56, 1, 47-52.
- Nabiel A. (2004) Glycosidic nature of *Equisetum* flavonoids. Phytochemistry, 14, 286-287.
- Navdeep S. (2010) Pharmacognostic evaluation of *Equisetum arvense* L. Pharmatech 2, 1460-14643.
- Nazifi E., Movafeghi A., Nazemieh H., Asnaashari S., Bamdad-Moghadam S., y Delazar A. (2010) Phytochemical analysis of essential oils from different plant parts of *Ornithogalum cuspidatum* Bertol. Pharmaceutical sciences.
- Neda M. (2008) Phenolic compounds in field horsetail as natural antioxidants. Molecules. 13, 1455-1464.
- Neethirajan S., Gordon, R. y Wang L. (2009) Potential of silica bodies (phytoliths) for nanotechnology. Trends in Biotechnology, 27, 8, 461-467.
- Neralla S., Weaver R., Varvel T., y Lesikar B. (1999) Phytoremediation and on-site treatment of septic effluents in sub-surface flow constructed wetlands. Environmental technology, 20,11, 1139-1146.
- Ng'ang'a F., Gachanja A., Onditi A. y Ngumba E. (2012) Application of solid phase extraction with gas chromatography-mass spectrometry in geographical profiling and characterization of volatile organics in Kenyan honey. Food Science and Quality Management, 5, 1-10.

- Nichols K., Ham B., Nichols J., Ziegler C., y Green-Church K. (2007) Identification of fatty acids and fatty acid amides in human meibomian gland secretions. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48,1, 34-39.
- Ogunlesi M., Okiei W., Ofor E, y Osibote A. (2009) Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn (Euphorbiaceae), a potential medication for asthma. *African Journal of Biotechnology*, 8, 24.
- Ogunbinu A., Ogunwande I., Walker T., y Setzer W. (2006) Identification of the volatile constituents of *Brachystegia eurycoma* Harms. *International Journal of Aromatherapy*, 16, 3, 155-158.
- Orrego A., Rivera H. Posada H., Restrepo C., y Velasquez J. (2007) Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. *CES Medicina*, 21, 2.
- Paz A., E Cerdeiras, M.P. Fernández, J. Ferreira, F. Moyna, P. Soubes, M. Vázquez, A. Vero, y S. Zunino (1995) Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 1, 45, 67-70
- Phillipson J. y Melville C. (1960) An investigation of the alkaloids of some British species of *Equisetum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 12,1, 506-508.
- Piasenzotto L., Gracco L. y Conte L. (2003) Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 83, 1037-1044.
- Radulovic N., Stojanovic G. y Palic R. (2006) Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytotherapy*, 20, 85-88
- Raman A., Weir U., y Bloomfield S. (1995) Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Letters in applied microbiology*, 21, 4, 242-245.
- Ramírez V., Palma M., y Vega, E. (2002) Plantas medicinales volumen II. CIMED Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 130 págs.
- Ravelo A., y Braun A. (2009) Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103, 2, 409-420.
- Raven P.H (1999) *Biology of plants*. 6a ed. W.H Freeman and Company Worth Publishers. New York, 685 págs.

- Reza V. y Abbas H. (2007) Cytotoxicity and antimicrobial activity of harman alkaloids. *J Pharmacology & Toxicology*, 2, 7, 677-680.
- Rezanka T. (1998) Branched and very long-chain dicarboxylic acids from *Equisetum* species. *Phytochemistry*, 47, 1539-1543.
- Riba R. (1996) Flora del valle de Tehuacán- Cuicatlán. Fascículo 10 Pteridophyta *sensu stricta*. UNAM. México, 23 págs.
- del R o J., Gutierrez A., Gonzalez-Vila F., Mart n F., y Romero J. (199) Characterization of organic deposits produced in the kraft pulping of Eucalyptus globulus wood. *Journal of Chromatography*. 823, 1, 457-465.
- Rontani J., Nassiry M. y Mouzdahir A. (2007) Free radical oxidation (autoxidation) of α -tocopherol (vitamin E): A potential source of 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide in the environment. *Organic Geochemistry*, 38, 37-47.
- Rost T. (1988) Botánica. Introducción a la Biología Vegetal. Editorial Limusa Noriega Editores. México, 486 págs.
- Parsons W. y Cuthbertson E. (1992) Noxious Weeds of Australia. Inkata Press, Melbourne, Australia.
- Sakthivel K., Palani S., Santosh R., Devi K. y Senthil B. (2010) Phytoconstituents analysis by CG-MS, cardioprotective and antioxidant activity of *Buchanania axillaries* against doxorubicin-induced cardio toxicity in albino rats. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 1, 34-38.
- Saleh N., Majak W., y Towers G. (1972) Flavonoids of *Equisetum* species. *Phytochemistry*, 11, 3, 1095-1099.
- Sampietro D. (2002) Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales Dr. Antonio R. Sampietro Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho On line: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia.htm>. Última visita, 12.
- Sánchez J. (2007) Identificación de marcadores asociados a la Resistencia del aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de doctorado. Biología experimental. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México, 116 págs.
- Sánchez J. y Feris J. (1998) Antibiogramas: utilidad y limitaciones. *Arch Dom Ped*, 34,3, 82-7.

- Sarkhail P., Amin G., y Shafiee A. (2004) Composition of the essential oil of *Phlomis persica* Boiss and *Phlomis chorassanica* Bunge from Iran. Flavour and fragrance journal, 19, 6, 538-540.
- Scagel R., Bondini , Maze J., Rouse G., Schofield W. y Stein J. (1984) Plants, an evolutionary survey. Wadsworth Publishing Company. Belmont CA.
- Schaeter M., Medoff G., Eisenstein B. y Guerra H. (1994) Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Págs 50-55.
- Sen A. y Batra A. (2012) Chemical composition of methanol extract of the leaves of *Melia azedarach* L. Asian J Pharm Clin Res,5, 42-45.
- Shabi M., Gayathri K., Venkatalakshmi R., y Sasikala C. (2010) Chemical constituents of hydro alcoholic extract and phenolic fraction of *Cynodon dactylon*. Int J Chem Tech Res, 2,1, 149-154.
- Shelef L. (1984) Antimicrobial effects of spices 1. Journal of Food Safety, 6, 1, 29-44.
- Stainer Y., Michel D. y Adelberg E. (1981) Microbiología. Prentice-Hall. Madrid, España.
- Stoliar C. (2009) Parámetros botánicos y cromatográficos para la monografía farmacopeica de cola de caballo. *Equisetum giganteum*. Las tesinas de Belgrano. No. 271.
- Sukhonthara S., Theerakulkait C. y Miyazawa M. (2009) Characterization of volatile aroma compounds from red and black rice bran. Journal of oleo science, 58, 3, 155-161.
- Tao X., Yang Y. J. y Wan D. (2005) Analysis of chemical components of volatile oil from *Clematis obscura* [J]. Journal of Lanzhou Medical College 3.
- Tava A. (2001) Coumarin-containing grass: volatiles from sweet vernal grass (*Anthoxanthum odoratum* L.). Journal of Essential Oil research, 13,5, 367-370.
- Urban S., de Almeida Leone P., Carroll A., Fechner G., Smith J., Hooper J. y Quinn R. (1999) *Axinella mines* AD, novel imidazo-azolo-imidazole alkaloids from the Australian marine sponge *Axinella* sp. The Journal of organic chemistry, 64, 3, 731-735.
- Uslu M., Erdogan I., Bayraktar O., y Ates, M. (2013) Optimization of extraction conditions for active components in *Equisetum arvense* extract. Romanian Biotechnological Letters, 18, 2, 8115-8131.
- Uzun E, Sariyar G, Adsersen A., Karakoc B., Ötük G., Oktayoglu E. y Pirildar S. (2004) Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. Journal of Ethnopharmacology, 95, 2, 287-296.

- Vasquez R., Ruesga L., D'addosio R., Páez G. y Marín M. (200) Extracción de pectina a partir de la cáscara de plátano (*Musa* AAB, subgrupo plátano) clon Hartón. Revista de la Facultad de Agronomía. 25, 2.
- Veit M., Weidner C., Strack D., Wray V., Wit. Y Czygan F. (1996) Phenolic characters of british hybrid taxa in *Equisetum* subgenus *Equisetum*. Biochemical Systematics and Ecology. 23, 79-87.
- Veit M. y Weidner C. (1992) The distribution of caffeic acid conjugates in equisetaceae and some ferns. Phytochemistry 31, 10, 3483-3845.
- Wang S., Yang L., Zu Y., Zhao C., Sun X., Zhang L. y Zhang Z. (2011) Design and performance evaluation of ionic-liquids-based microwave-assisted environmentally friendly extraction technique for camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from samara of *Camptotheca acuminata*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 50, 24, 13620-13627
- Wiedenfeld H., Andrade A. y Pérez C. (2000) Flavonol glycosides from *Equisetum myriochaetum*. Biochemical systematic and Ecology, 28, 395-397
- Xiangrong L. Wanxing W. y Cuiwu L (2008) Comparative analysis of essential oils compositions from *Phyllanthus niruru*, *P. urinaria* & *P. arenaris*. Chemistry of Natural Compounds, 44, 2, 257-260.
- Yamanishi T., Nose M. y Nakatani Y. (1970) Studies on the flavor of green tea: Part VIII. Further investigation of flavor constituents in manufactured green tea. Agricultural and Biological Chemistry, 34,4, 599-608.
- Yayli N. y Yasar A (2005) Composition & antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* & *Centaurea armena*. Phytochemistry, 66, 1741-1745
- Yu L., Ying-peng Z., Hai-xia Z., Yun-shang Y. y Ce S. (2007). Study on the Chemical Composition of Essential Oil from *Limonium aureum* (L.) Hill. Natural Product Research & Development, 19, 6.
- Yufeng L., Xiuwei Y. y Tonghua L. (2007) GC-MS Analysis of Essential Oil from the Leaves of *Aquilaria sinensis* [J]. Modern Chinese Medicine, 8, 004.
- Zamorano C. (2006) Alelopatía: un nuevo reto en la ciencia de las arvenses en el trópico. Agronomía, 14, 7-15.
- Zeng Z., Zhang H., Zhang T., Tamogami S. y Chen J. Y. (2009) Analysis of flavor volatiles of glutinous rice during cooking by combined gas chromatography–mass spectrometry with modified headspace solid-phase microextraction method. Journal of food composition and analysis, 22,4, 347-353.

-Zhang Y. y Wang Z. (2008) Comparative analysis of essential oil components of three *Phlomis* species in Qinling Mountains of China. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 47, 213-217.

11.1 BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET (Netgrafía).

- www.aulados.net Botánica. Recuperado el 10 de Febrero de 2012

-http://brilliantbotany.com. Recuperado el 14 de Marzo de 2015.

-CONABIO (2005) http://www.conabio.gob.mx/ Recuperado el 1 de Mayo de 2012.

-www.discoverlife.org. Recuperado el 16 de Enero de 2013.

-www.dreamstime.com Recuperado el 17 de Septiembre de 2015.

-http://embryophytas.blogspot.mx. Recuperado el 14 de Marzo de 2015.

-FAO (2006) http://www.fao.org/contact-us/terms/es/ Recuperado el 21 de noviembre de 2014.

-http://plants.ifas.ufl.edu/node/153. Recuperado el 20 de Enero de 2013.

-www.webbooknlist.com Todas las estructuras químicas. Recuperadas entre Febrero y Diciembre de 2014.

12 ANEXOS.

12.1 Anexo I. Ciclo de vida de los equisetos.

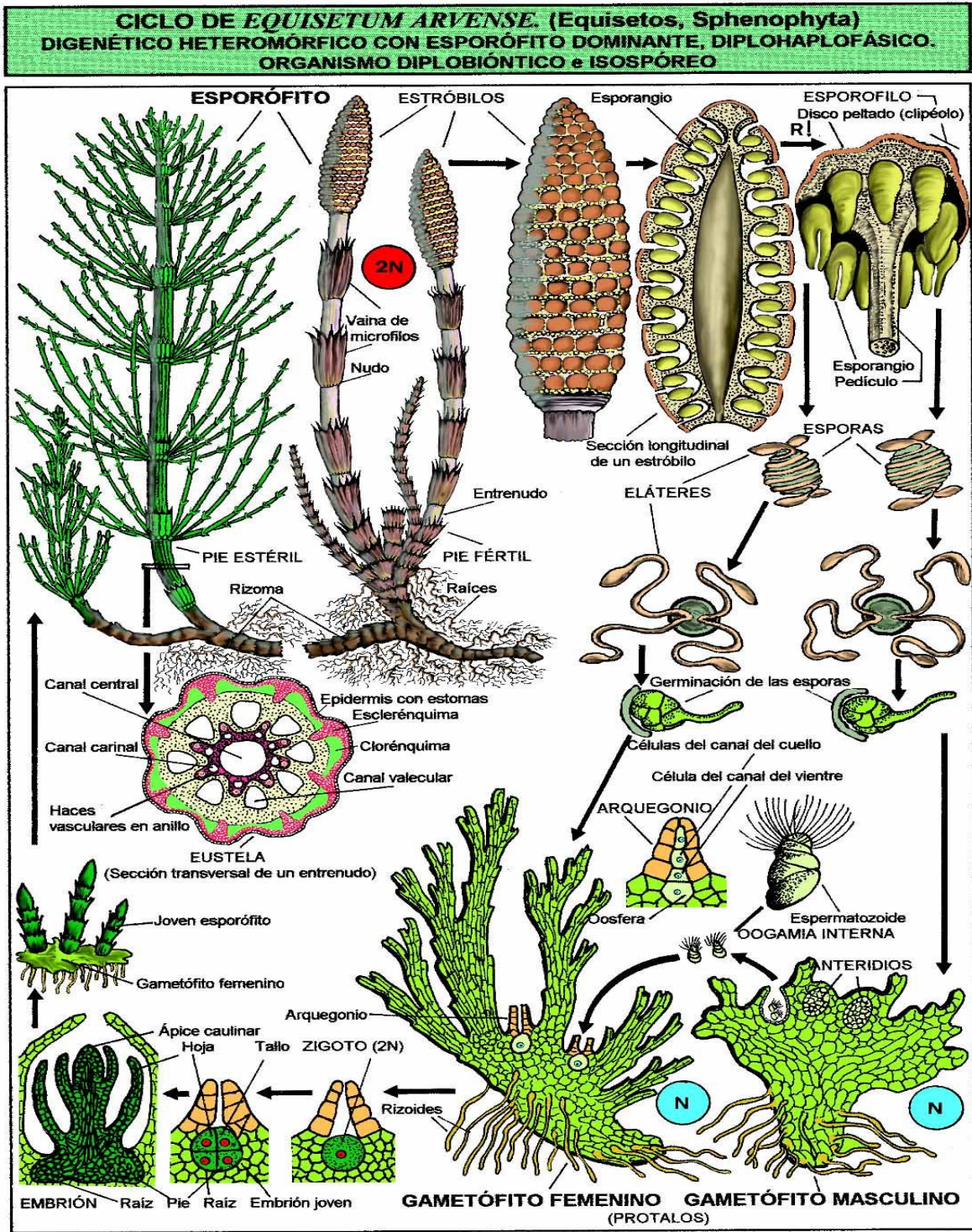


Fig. 48 Ciclo de vida de *Equisetum arvense* L. (Tomada de <http://embryophytas.blogspot.mx/>)

12.2 Anexo II. Pruebas estadísticas: Análisis de varianza de un factor para el porcentaje de inhibición (Actividad alelopática) de la germinación de *Lactuca sativa*:

Entre las concentraciones 10, 50 y 100 mg/mL del extracto Hex de *E. hyemale* L.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	146.6	48.8666667	192.963333		
Columna 2	3	280	93.3333333	133.333333		
Columna 3	3	300	100	0		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4636.34667	2	2318.17333	21.3134877	0.00187855	5.14325285
Dentro de los grupos	652.593333	6	108.765556			
Total	5288.94	8				

Entre las concentraciones 10, 50 y 100 mg/mL del extracto AcOEt de *E. hyemale* L.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	60	20	578.89		
Columna 2	3	300	100	0		
Columna 3	3	300	100	0		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	12800	2	6400	33.1669229	0.00057073	5.14325285
Dentro de los grupos	1157.78	6	192.963333			
Total	13957.78	8				

Entre las concentraciones 10, 50 y 100 mg/mL del extracto AcOEt de *E. hyemale* L.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	33.8	11.2666667	191.243333		
Columna 2	3	300	100	0		
Columna 3	3	300	100	0		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	15747.2089	2	7873.60444	123.511826	1.3334E-05	5.14325285
Dentro de los grupos	382.486667	6	63.7477778			
Total	16129.6956	8				

Prueba de Tukey para la diferencia de medias en el porcentaje inhibición de la germinación de *Lactuca sativa* L. Extracto hexánico.

Porcentaje de Inhibición Hex

HSD de Tukey

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.5		
		1	2	3
Control	3	.0000		
10 mg/mL	3		48.8667	
50 mg/mL	3			93.3333
100 mg/mL	3			100.0000
Sig.		1.000	1.000	.803

Prueba de Tukey para la diferencia de medias en el porcentaje inhibición de la germinación de *Lactuca sativa* L. Extracto de acetato de etilo.

Porcentaje de Inhibición AcOEt

HSD de Tukey

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.5		
		1	2	3
Control	3	.0000		
10 mg/mL	3		20.0000	
50 mg/mL	3			100.0000
100 mg/mL	3			100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Prueba de Tukey para la diferencia de medias en el porcentaje inhibición de la germinación de *Lactuca sativa* L. Extracto de acetato de etilo.

Porcentaje de Inhibición MeOH

HSD de Tukey

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.5		
		1	2	3
Control	3	.0000		
10 mg/mL	3		11.2667	
50 mg/mL	3			100.0000
100 mg/mL	3			100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Análisis de varianza de un factor para la inhibición de *Escherichia coli*:

Entre las concentraciones 2 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	0	0	0		
Columna 2	3	0	0	0		
Columna 3	3	0	0	0		
Columna 4	3	106.4	35.4666667	11.0633333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2830.24	3	943.413333	341.095511	8.8836E-09	0.86003781
Dentro de los grupos	22.1266667	8	2.76583333			
Total	2852.36667	11				

Entre las concentraciones 10 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	12	4	12		
Columna 2	3	12	4	12		
Columna 3	3	0	0	0		
Columna 4	3	106.4	35.4666667	11.0633333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2452.64	3	817.546667	93.2651393	1.4529E-06	0.86003781
Dentro de los grupos	70.1266667	8	8.76583333			
Total	2522.76667	11				

Entre las concentraciones 20 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	21	7	0		
Columna 2	3	21	7	0		
Columna 3	3	12	4	12		
Columna 4	3	106.4	35.4666667	11.0633333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1971.64	3	657.213333	113.984102	6.6591E-07	0.86003781
Dentro de los grupos	46.1266667	8	5.76583333			
Total	2017.76667	11				

Prueba de Tukey para [2 mg/d] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*. Inhibición sobre *E. coli*.

Inhibición				
	extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.5	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Hex	3	.0000	
	AcOEt	3	.0000	
	MeOH	3	.0000	
	Positivo	3		35.4667
	Sig.		1.000	1.000

Prueba de Tukey para [10 mg/d] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*. Inhibición sobre *E. coli*.

Inhibición					
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.5		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	MeOH	3	.0000		
	Hex	3		4.0000	
	AcOEt	3		4.0000	
	Positivo	3			35.4667
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Prueba de Tukey para [20 mg/d] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*. Inhibición sobre *E. coli*.

Inhibición					
	extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.5		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	MeOH	3	4.0000		
	Hex	3		7.0000	
	AcOEt	3		7.0000	
	Positivo	3			35.4667
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Análisis de varianza de un factor para la inhibición de *Bacillus cereus*:

Entre las concentraciones 2 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	19	6.33333333	0.33333333		
Columna 2	3	20	6.66666667	1.33333333		
Columna 3	3	20	6.66666667	0.33333333		
Columna 4	3	107.9	35.9666667	2.33333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1946.5025	3	648.834167	598.923846	9.4842E-10	4.06618055
Dentro de los grupos	8.66666667	8	1.08333333			
Total	1955.16917	11				

Entre las concentraciones 10 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	18	6	0		
Columna 2	3	18	6	0		
Columna 3	3	13	4.33333333	14.3333333		
Columna 4	3	107.9	35.9666667	2.33333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2101.66917	3	700.556389	168.133533	1.4531E-07	4.06618055
Dentro de los grupos	33.3333333	8	4.16666667			
Total	2135.0025	11				

Entre las concentraciones 20 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	19	6.33333333	0.33333333		
Columna 2	3	18	6	0		
Columna 3	3	20	6.66666667	0.33333333		
Columna 4	3	107.9	35.9666667	2.33333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1976.46917	3	658.823056	878.430741	2.0623E-10	4.06618055
Dentro de los grupos	6	8	0.75			
Total	1982.46917	11				

Prueba de Tukey para [2 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *B. cereus*.

Inhibición				
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = .5	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Hex	3	6.3333	
	AcOEt	3	6.6667	
	MeOH	3	6.6667	
	Positivo	3		35.9667
	Sig.		.978	1.000

Prueba de Tukey para [10 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *B. cereus*.

Inhibición				
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.5	
			1	2
HSD de Tukey ^a	MeOH	3	4.3333	
	Hex	3	6.0000	
	AcOEt	3	6.0000	
	Positivo	3		35.9667
	Sig.		.754	1.000

Prueba de Tukey para [20 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *B. cereus*.

Inhibición				
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = .5	
			1	2
HSD de Tukey ^a	AcOEt	3	6.0000	
	Hex	3	6.3333	
	MeOH	3	6.6667	
	Positivo	3		35.9667
	Sig.		.784	1.000

Análisis de varianza de un factor para la inhibición de *Staphylococcus aureus*:

Entre las concentraciones 2 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	31	10.3333333	2.33333333		
Columna 2	3	27	9	3		
Columna 3	3	28	9.33333333	0.33333333		
Columna 4	3	113.3	37.7666667	0.25333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1793.58917	3	597.863056	403.961524	4.5399E-09	4.06618055
Dentro de los grupos	11.84	8	1.48			
Total	1805.42917	11				

Entre las concentraciones 10 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	26	8.66666667	0.33333333		
Columna 2	3	28	9.33333333	0.33333333		
Columna 3	3	27	9	1		
Columna 4	3	113.3	37.7666667	0.25333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1862.58917	3	620.863056	1293.4647	4.4058E-11	4.06618055
Dentro de los grupos	3.84	8	0.48			
Total	1866.42917	11				

Entre las concentraciones 20 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	40	13.3333333	26.3333333		
Columna 2	3	30	10	0		
Columna 3	3	31	10.3333333	0.33333333		
Columna 4	3	113.3	37.7666667	0.25333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1605.58917	3	535.196389	79.5239805	2.6914E-06	4.06618055
Dentro de los grupos	53.84	8	6.73			
Total	1659.42917	11				

Prueba de Tukey para [2 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *S. aureus*.

Inhibición				
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.5	
			1	2
HSD de Tukey ^a	AcOEt	3	9.0000	
	MeOH	3	9.3333	
	Hex	3	10.3333	
	Positivo	3		37.7667
	Sig.		.564	1.000

Prueba de Tukey para [10 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *S. aureus*.

Inhibición				
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.5	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Hex	3	8.6667	
	MeOH	3	9.0000	
	AcOEt	3	9.3333	
	Positivo	3		37.7667
	Sig.		.656	1.000

Prueba de Tukey para [20 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *S. aureus*.

Inhibición					
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.5		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	AcOEt	3	10.0000		
	MeOH	3	10.3333		
	Hex	3		13.3333	
	Positivo	3			37.7667
	Sig.		.998	.524	1.000

Análisis de varianza de un factor para la inhibición de *Staphylococcus epidermidis*:

Entre las concentraciones 2 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	47	15.6666667	5.33333333		
Columna 2	3	0	0	0		
Columna 3	3	14	4.66666667	16.3333333		
Columna 4	3	83.7	27.9	6.43		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1392.05583	3	464.018611	66.0603077	5.4906E-06	4.06618055
Dentro de los grupos	56.1933333	8	7.02416667			
Total	1448.24917	11				

Entre las concentraciones 10 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	35	11.6666667	14.3333333		
Columna 2	3	0	0	0		
Columna 3	3	19	6.33333333	0.33333333		
Columna 4	3	83.7	27.9	6.43		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1283.78917	3	427.929722	81.1369358	2.4907E-06	4.06618055
Dentro de los grupos	42.1933333	8	5.27416667			
Total	1325.9825	11				

Entre las concentraciones 10 mg/disco de los extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale* L.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	60	20	64		
Columna 2	3	26	8.66666667	2.33333333		
Columna 3	3	20	6.66666667	1.33333333		
Columna 4	3	83.7	27.9	6.43		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	895.055833	3	298.351944	16.1060926	0.00094326	4.06618055
Dentro de los grupos	148.193333	8	18.5241667			
Total	1043.24917	11				

Prueba de Tukey para [2 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *S. epidermidis*.

Inhibición						
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = .5			
			1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	AcOEt	3	.0000			
	MeOH	3		4.6667		
	Hex	3			15.6667	
	Positivo	3				27.9000
	Sig.			1.000	1.000	1.000

Prueba de Tukey para [10 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *S. epidermidis*.

Inhibición						
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = .5			
			1	2	3	4
HSD de Tukey ^a	AcOEt	3	.0000			
	MeOH	3		6.3333		
	Hex	3			11.6667	
	Positivo	3				27.9000
	Sig.			1.000	1.000	1.000

Prueba de Tukey para [20 mg/mL] Extractos Hex, AcOEt y MeOH de *E. hyemale*.
Inhibición sobre *S. epidermidis*.

Inhibición					
	Extracto	N	Subconjunto para alfa = .5		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	MeOH	3	6.6667		
	AcOEt	3	8.6667		
	Hex	3		20.0000	
	Positivo	3			27.9000
	Sig.			.939	1.000

12.3 Anexo III: Cromatografía en capa fina (CCF) de las muestras analizadas mediante CG-masas, de los extractos de *E. hyemale* L.



Fig. 49 CCF del extracto hexánico eluido con acetato de etilo.

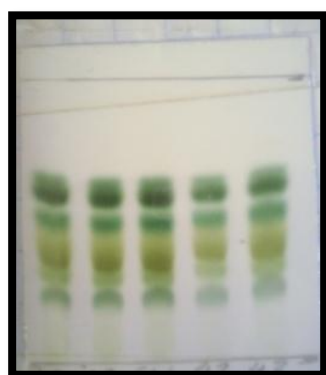


Fig. 50 CCF de las fracciones 24 a 55 de la CCV del extracto AcOEt, eluidas con Hex-AcOEt 1:1.

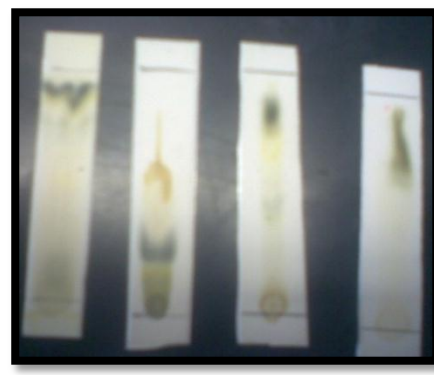


Fig 51 CCF de la fracción hexánica del extracto MeOH. Eluidas: A) Hex-AcOEt 6:4, B) Hex-AcOEt 7:3, C) AcOEt, D) AcOEt-MeOH 1:1.

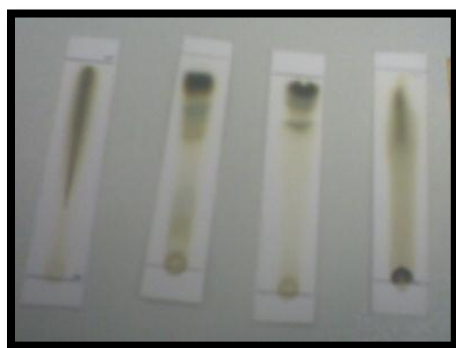


Fig 52 CCF de la fracción AcOEt del extracto MeOH. Eluidas: A) Hex-AcOEt 7:3, B) Hex-AcOEt 1:1, C) AcOEt, D) Éter etílico.



Fig. 53 CCF de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico. Eluida con clorofórmico.

12.4 Anexo IV Dispersión de aleloquímicos en el ambiente.

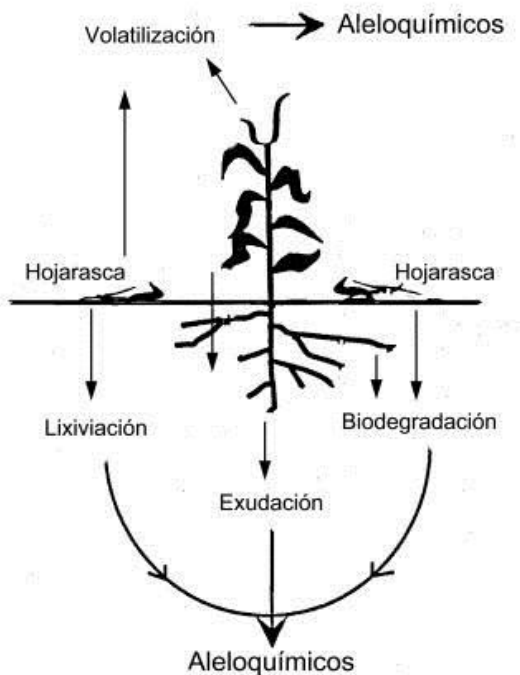


Fig. 54 Vías a través de las cuales se liberan los agentes alelopáticos al entorno (Sampietro, 2002)

12.5 Anexo V Pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

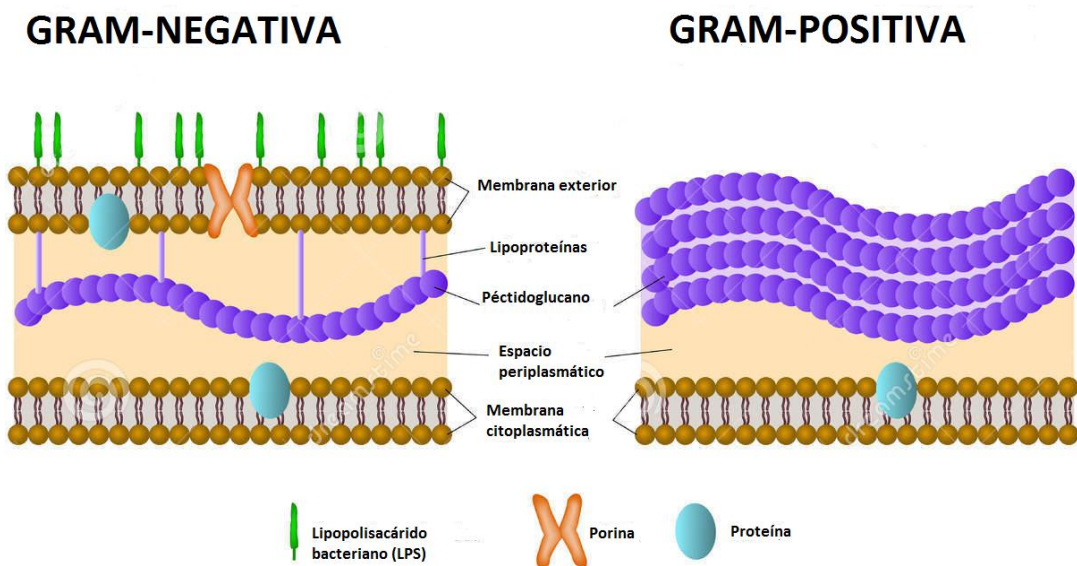


Fig. 55 Esquema de las membranas celulares en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Dreamstime.com)

