



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHINÁ

TESIS

Aplicaciones agronómicas potenciales de hongos endófitos de tres gramíneas nativas de la Península de Yucatán

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN AGROECOSISTEMAS SOSTENIBLES

PRESENTA

Tatiana Esperanza Vales Bautista

Chiná, Campeche, México a junio de 2023



2023
AÑO DE
Francisco
VILLA
EL REVOLUCIONARIO DEL PUEBLO



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHINÁ

TESIS

Aplicaciones agronómicas potenciales de hongos endófitos de tres gramíneas nativas de la Península de Yucatán

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN AGROECOSISTEMAS SOSTENIBLES

PRESENTA

Tatiana Esperanza Vales Bautista

Chiná, Campeche, México a junio de 2023



2023
AÑO DE
Francisco
VILLA
EL REVOLUCIONARIO DEL PUEBLO



COMITÉ REVISOR

Chiná, Campeche, **01/junio/2023**

Oficio: DIR/542/2023

ASUNTO: Aprobación

C. TATIANA ESPERANZA VALES BAUTISTA
PRESENTE

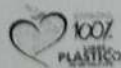
El que suscribe, manifiesta que el Dictamen emitido por el Comité de Revisión que integra el sínodo del trabajo de tesis denominado **“Aplicaciones agronómicas potenciales de hongos endófitos de tres gramíneas nativas de la Península de Yucatán”**, es aprobado como requisito parcial para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Agroecosistemas Sostenibles.

Sin más por momento le envió un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
Aprender Produciendo

MARCO GABRIEL ROSADO ÁVILA
DIRECTOR

MGRA/R/2M/JF/JP/zapl



COMITÉ REVISOR

Este trabajo fue revisado y aprobado por este Comité y presentado por Lic. Tatiana Esperanza Vales Bautista como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Agroecosistemas Sostenibles el día 01 del mes de junio del año 2023 en Chiná Campeche.

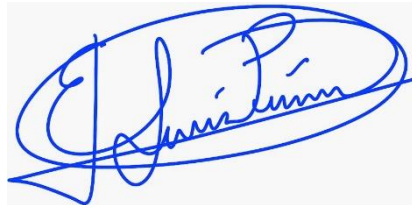
Dra. Norma Laura Rodríguez Ávila
Presidenta



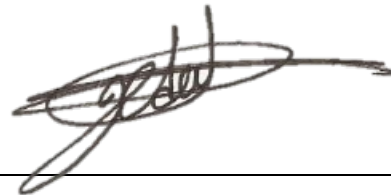
Dr. Carlos Milton Soto Barajas
Secretario



Dr. José Efraín Ramírez Benítez
Vocal



M.P.A.T. Jesús Froylán Martínez Puc



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en el presente documento deriva de los estudios realizados para alcanzar los objetivos planteados en mi trabajo de tesis, en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Chiná. De acuerdo a lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Chiná. Por otra parte, de acuerdo a lo manifestado, reconozco de igual manera que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de la información generada en el desarrollo del presente estudio, le pertenecen patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Chiná de manera que si se derivasen de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  _____

Nombre: TATIANA ESPERANZA VALES BAUTISTA

Resumen

En los últimos años el sector agrícola ha incrementado el uso de agroquímicos sintéticos, para incrementar la productividad y con ello, los problemas que causan estos compuestos en el ecosistema. Una alternativa de solución a esta problemática es el uso de bioplaguicidas para el manejo de los cultivos; sin embargo, estos compuestos aún se encuentran en desarrollo y no han podido sustituir por completo a los productos tradicionales. La Península de Yucatán es una región caracterizada por presentar una amplia diversidad de especies vegetales. Esta investigación se divide en dos capítulos; el primer capítulo se presenta una revisión de publicaciones relacionadas con la descripción de hongos endófitos asociados a gramíneas arvenses de climas tropicales, debido a que estos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar productos naturales con potencial plaguicida, resultando ser una alternativa natural que no causa resistencia bacteriana o contaminación por metales pesados, pudiendo actuar de forma específica, sin dañar a otras especies. En el segundo capítulo se presentan los resultados de los análisis de identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos obtenidos a partir de las gramíneas arvenses, posibles hospederos de endófitos, *Dactyloctenium aegyptium* (DA, pasto pata de pollo), *Cynodon dactylon* (CD, Bermuda Grass), *Cenchrus echinatus* (CE, zacate Cadillo) y la ciperácea *Fimbristylis cymosa* (FC), en tres fases de maceración. Se identificaron alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, flavonoides, glucósidos cardíacos, quinonas, saponinas, taninos y triterpenos. Los azúcares reductores y triterpenos se identificaron en el 100% de las muestras, mientras que las quinonas solo se identificaron en el primer extracto etanólico de CD. Aunque los resultados variaron entre las gramíneas arvenses, FC fue la única muestra que presentó el mismo perfil metabólico en los extractos obtenidos tras todo el proceso de maceración. Los resultados demuestran que las gramíneas arvenses tienen potencial como fuente de metabolitos secundarios que pueden ser empleados como bioplaguicidas.

Palabras clave: Bioplaguicidas, Poaceae, Ciperaceae, clima tropical.

Potential agronomic applications of endophytic fungi of three native grasses of the Yucatan Peninsula

Abstract

In recent years, the agricultural sector has increased the use of pesticides and chemical fertilizers to meet demand, and with it the problems caused by these synthetic compounds in the ecosystem. Consequently, the use of biopesticides has been extended for crop management; however, these compounds are still under development and cannot completely replace traditional products (pesticides and fertilizers). The Yucatan Peninsula is a region characterized by presenting a wide diversity of plant species. This investigation is divided into two chapters. The first chapter presents a review of publications related to the description of endophytic fungi associated with weed grasses in tropical climates, because these microorganisms have the ability to synthesize natural products with pesticide potential, resulting in a natural alternative that does not cause resistance bacterial and contamination by heavy metals, acting at a specific level so it would not harm other species. The second chapter presents the results of the qualitative identification analyzes of the secondary metabolites present in the ethanolic extracts obtained from the weed grasses *Dactyloctenium aegyptium* (DA, chicken foot grass), *Cynodon dactylon* (CD, Bermuda Grass), *Cenchrus echinatus* (CE, grass Cadillo) and the sedge *Fimbristylis cymosa* (FC), in three phases of maceration. Alkaloids, reducing sugars, coumarins, flavonoids, cardiac glycosides, quinones, saponins, tannins and triterpenes were identified. Reducing sugars and triterpenes were identified in 100% of the samples, while quinones were only identified in the first ethanolic extract of CD. Although the results varied among the weeds, FC was the only sample that obtained the same results in its three ethanolic extracts. The qualitative determination shows that weed grasses have potential as a source of secondary metabolites that can be used as pesticides.

Keywords: Biopesticides, Poaceae, Ciperaceae, tropical climate.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada con el número 748389 (CVU: 1007380).

Al Tecnológico Nacional de México (TECNM) Campus Chiná por las facilidades otorgadas en las instalaciones para realizar los experimentos.

A los directores de este trabajo: Dr. Milton Carlos Soto Barajas, a la Dra. Norma Laura Rodríguez Ávila y al Dr. José Efraín Ramírez Benítez por su apoyo, dedicación y paciencia.

A todos mis compañeros de laboratorio que apoyaron en el procesamiento de las muestras vegetales.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo 1 GENERALIDADES	1
1.1. Introducción	1
1.2. Antecedentes	2
1.2.1. Gramíneas arvenses.....	2
1.2.2. Tamizaje fitoquímico	5
1.3. Justificación	11
1.4. Hipótesis	11
1.5. Objetivos	12
1.5.1. Objetivo general	12
1.5.2. Objetivos específicos	12
1.6. Referencias.....	13
Capítulo 2 Perspectivas biotecnológicas de hongos endófitos asociados a poáceas distribuidas en climas tropicales	22
2.1. Resumen.....	22
2.2. Introducción	23
2.3. Microorganismos endófitos	24
2.4. Descubrimiento de los hongos endófitos	26
2.5. Clasificación de los hongos endófitos.....	27
2.6. Efecto de las condiciones ambientales sobre la presencia y diversidad de hongos endófitos.....	29
2.7. Beneficios que confieren los hongos endófitos a las plantas tropicales	31
2.7.1. Producción de hormonas vegetales	33
2.7.2. Producción de enzimas.....	35
2.7.3. Metabolitos secundarios.....	36
2.8. Hongos endófitos presentes en plantas de climas tropicales	39
2.9. Hongos endófitos aislados en gramíneas tropicales.....	40
2.10. Conclusión	43

2.11. Referencias.....	43
Capítulo 3 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios presentes en gramíneas arvenses de sitios tropicales de Campeche	49
3.1. Resumen.....	49
3.2. Introducción	50
3.3. Materiales y métodos	51
3.3.1. Material vegetal.....	51
3.3.2. Preparación del extracto etanólico estándar	53
3.3.3. Análisis de datos	54
3.4. Resultados y Discusión	54
3.4.1. Alcaloides.....	56
3.4.2. Azúcares reductores	58
3.4.3. Cumarinas	60
3.4.4. Flavonoides	62
3.4.5. Glucósidos cardíacos.....	64
3.4.6. Quinonas	66
3.4.7. Saponinas	67
3.4.8. Taninos	69
3.4.9. Triterpenos	71
3.5. Conclusión	75
3.6. Referencias.....	76
Capítulo 4 Conclusión	79
Capítulo 5 Anexo.....	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Características de la asociación endófito-gramíneas.....	27
Cuadro 2.	Propiedades de los hongos endófitos.....	28
Cuadro 3.	Hongos endófitos aislados en especies vegetales de zonas climaticas tropicales	39
Cuadro 4.	Características locales donde se recolectaron las plantas arvenses.....	52
Cuadro 5.	Compuestos fitoquímicos evaluados y su importancia biológica.....	53
Cuadro 6.	Resultado del tamizaje fitoquímico	73
Cuadro 7.	Metabolitos secundarios identificados en gramíneas arvenses.....	75
Cuadro 8.	Protocolo de tamizaje fitoquímico.....	80
Cuadro 9.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Dactyloctenium aegyptium</i> muestras 1-6	81
Cuadro 10.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Dactyloctenium aegyptium</i> muestras 7-12	82
Cuadro 11.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Dactyloctenium aegyptium</i> muestras 13-18	83
Cuadro 12.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Cynodon dactylon</i> muestras 1-6.....	84
Cuadro 13.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Cynodon dactylon</i> muestras 7-12.....	85
Cuadro 14.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Cynodon dactylon</i> muestras 13-18....	86
Cuadro 15.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Cenchrus echinatus</i> muestras 1-6.....	87
Cuadro 16.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Cenchrus echinatus</i> muestras 7-12....	88
Cuadro 17.	Resultado del tamizaje fitoquímico de <i>Cenchrus echinatus</i> muestras 13-16.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Compuestos químicos producidos por hongos endófitos y su potencial aplicación agronómica. Fuente: elaboración propia. 33
- Figura 2. Distribución geográfica de hongos endófitos aislados de gramíneas de zonas climáticas tropicales. 40
- Figura 3. Hongos endófitos identificados y especies vegetales asociadas en gramíneas de zonas tropicales. 42
- Figura 4. (a) *Dactyloctenium aegyptium*. (b) *Cenchrus echinatus*. (c) *Cynodon dactylon*. (d) *Fimbristylis cymosa*. 51
- Figura 5. Ecosistemas donde se recolectaron las gramíneas arven ses: *Dactyloctenium aegyptium* (a,b,c,d,e,f) y *Cenchrus echinatus* (g). 52
- Figura 6. Comparación del número de metabolitos secundarios identificados por cada extracto etanólico de cada muestra (planta recolectada). 55
- Figura 7. Ensayos químicos para determinar alcaloides. DA=*Dactyloctenium aegyptium*, *Cynodon dactylon* (CD) y *Cenchrus echinatus* (CE). M4=Muestra 4. M18=Muestra 18. EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= testigo. A=Reacción de Dragendorff. B=Reacción de Hager. 57
- Figura 8. Comparación de los porcentajes de alcaloides identificados en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3). 58
- Figura 9. Ensayos químicos para determinar azúcares reductores. A= Reacción de Benedict. B=Reacción de Feheling. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). M4= Muestra 4. M17=Muestra 17. EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. 59
- Figura 10. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron azúcares reductores en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3). 60
- Figura 11. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. A= Reacción de Ehrlich. B=Reacción

- de NH_4OH . Solución de NaOH 5 %: 1,4,7,10,13 y 16. Solución de NaOH 10 %: 2,5,8,11,14 y 17. Solución de KOH 2N.3, 6, 9, 12, 15 y 18 61
- Figura 12. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron cumarinas en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3). 62
- Figura 13. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. M1=Muestra 1. M4=Muestra. A=Reacción de Shinoda. B= Reacción de NaOH 10 % 63
- Figura 14. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron flavonoides en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3). 64
- Figura 15. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. M16=Muestra 16. M17=Muestra 17. 65
- Figura 16. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron glucósidos cardíacos en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3). 65
- Figura 17. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. M1=Muestra 1. M5=Muestra 5, M17= Muestra 17. A=Reacción NH_4OH . B= H_2SO_4 66
- Aunque las reacciones no presentaron el color rojo, algunas precipitaron como se observa en la figura 17, sin embargo, la precipitación se cuenta como positiva por lo cual la figura 18 muestra la comparación del total de muestras. 66
- Figura 18. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron quinonas en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3). 67
- Figura 19. Ensayos químicos para saponinas *Dactyloctenium aegyptium* (A1-A3), *Cynodon dactylon* (B1-B3), *Cenchrus echinatus* (C1-C3). EE1=Extracto etanólico de 5 días.

EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo.
D= Reacción de Lieberman-Bouchard. E= Reacción de Rosenthaler. 68

Figura 20. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron saponinas en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3). 69

Figura 21. Ensayos químicos para determina taninos. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= testigo. A=Reactivo de gelatina. B= Reacción de cloruro férrico. C= Ferrocianuro de potasio. 70

Figura 22. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron taninos en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. 71

Figura 23. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días (1). EE2= Extracto etanólico de 10 días (2). EE3=Extracto etanólico de 15 días (3). T= testigo. A= antes de la reacción. B= después de la reacción. C=Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron triterpenos en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). 72

Figura 24. Ensayos químicos para determinar: A=Alcaloides (EE3). B=Taninos, reacción de cloruro férrico (EE1). C= Prueba de espuma (EE1). D=Cumarinas reacción de Ehrlich (EE2). E= Cumarinas reacción de NH₄OH (EE2). T= testigo (extracto etanólico). 74

Abreviaturas

‰: Por ciento

°C: Grados Celsius

AIA: Ácido indol-3-acético

ATPasa Na⁺ -K⁺: Adenosintrifosfatasa, bomba de sodio-potasio

C3: Vía metabólica de 3 carbonos

C4: Vía metabólica de 4 carbonos

C₆FeK₄N₆: Ferrocianuro de potasio

CD: *Cynodon dactylon*

CE: *Cenchrus echinatus*

CH₃COOH: Ácido acético

Cm: Centímetro

COV: Compuestos orgánicos volátiles

DA: *Dactyloctenium aegyptium*

EE1: Primer extracto etanólico (maceración de 5 días)

EE2: Segundo extracto etanólico (maceración de 10 días)

EE3: Tercer extracto etanólico (maceración de 15 días)

EEE: Extracto etanólico estándar (EE1, EE2 y EE3)

FC: *Fimbristylis cymosa*

FeCl₃: Cloruro de hierro (cloruro férrico)

g: Gramo (s)

Gas: Giberelinas

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HCl: Ácido clorhídrico

KOH: Hidróxido de potasio

ml: Mililitros

Msnm: Metros sobre el nivel del mar

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

NH₄OH: Hidróxido de amonio

pH: Concentración de iones de hidrógeno

UV: Radiación (luz) ultravioleta

μl: Microlitro

Capítulo 1 GENERALIDADES

1.1. Introducción

A nivel mundial las plagas afectan hasta el 40 % de la producción agrícola, en México aproximadamente 44.2 % de los daños es debido a causas biológicas y el 21.6 % es derivado de enfermedades. Por lo tanto, desde el desarrollo de los plaguicidas sintéticos aumentaron las aplicaciones para mejorar la productividad de los cultivos agrícolas de interés. Sin embargo, actualmente existe evidencia científica que sustenta el daño que la agricultura tradicional causó debido al uso inadecuado de los plaguicidas sintéticos ocasionando problemas ambientales, económicos y de salud.

Estas circunstancias son la pauta para buscar procedimientos alternativos a los métodos tradicionales utilizados en el ámbito agropecuario, por lo que se exploran estrategias más amigables de prevención, control y manejo de plagas a través de la bioprospección de microorganismos sintetizadores de productos naturales con potencial aplicación en la agricultura.

Las poáceas están adaptadas a casi cualquier bioma, estas pueden vivir en simbiosis mutualista con hongos endófitos que pueden tener la capacidad de sintetizar productos naturales que generan ventajas y defensa ante el estrés abiótico y biótico. Entre las actividades biológicas de los metabolitos secundarios se encuentra que son fungicidas, alelopáticas, antibacterial, citotóxicos, neurotóxicos y biorremediadores. (White *et al.*, 2019; Rodriguez *et al.*, 2009, Wilson, 1995).

Con base en lo anterior, en este estudio se realizó la bioprospección de los productos naturales producidos en cuatro plantas arvenses: *Dactyloctenium aegyptium*, *Cynodon dactylon*, *Cenchrus echinatus* y *Fimbristylis cymosa* recolectadas en seis localidades costeras de Campeche. De forma preliminar, se identificó la presencia de alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, saponinas, taninos, quinonas, cumarinas, glucósidos cardíacos y triterpenos; por tamizaje fitoquímico en los extractos etanólicos con tres tiempos de

maceración diferentes para determinar la presencia y prevalencia de los metabolitos secundarios en las muestras.

En general, los resultados obtenidos de los tres extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium*, *Cynodon dactylon* y *Cenchrus echinatus* demostraron la presencia de metabolitos comunes, como son los azúcares reductores y triterpenos. Sin embargo, de acuerdo con el promedio de metabolitos identificado se observó que las muestras de *Dactyloctenium aegyptium* se caracterizaron por ser las arvenses con menor número (seis) de metabolitos, mientras que *Cynodon dactylon* y *Cenchrus echinatus* se obtuvieron siete grupos de metabolitos identificados cualitativamente. En el caso de *Fimbristylis cymosa* se identificaron ocho metabolitos secundarios en los tres extractos, esta planta fue la más estable en relación a la presencia de metabolitos y el tiempo de maceración. Los resultados demuestran similitud en el perfil de metabolitos encontrados en las gramíneas de cada sitio, por lo cual podría asumirse que están influenciadas por presencia del microbioma asociado a las plantas de la región, así como de sus condiciones climáticas que comparten.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Gramíneas arvenses

Del orden Poales, la familia de las poáceas o gramíneas son una de las familias vegetales más extensas en especies, se ubican en el quinto lugar de las familias de plantas con flores. Las gramíneas poseen importancia económica debido a que forman parte de la alimentación como los cereales, el arroz, el maíz y el trigo; también tienen aplicaciones como plantas forrajeras, en la industria como fuentes de azúcar, ornamentales y las usadas con fines medicinales. Sin embargo, existen otras especies consideradas gramíneas invasoras. Estas arvenses pueden ser pastos ampliamente distribuidos en casi cualquier ecosistema ya sea hábitat naturales o agrícolas y están asociadas con efectos negativos en la economía ya que la presencia de las

plantas arvenses limita la productividad y la rentabilidad de los cultivos (Sutton *et al.*, 2019; (Fatima *et al.*, 2018; Dávila, 2006).

Las gramíneas arvenses transforman el entorno en el cual se desarrollan otras especies vegetales perturbando el ecosistema, pues cuentan con sistemas radiculares densos que compiten por los nutrientes lo cual ayuda a acelerar su presencia y distribución. Sin embargo, estas plantas exhiben comportamientos ecológicos como son la mayor tolerancia a la sequía y al estrés oxidativo (Zhang y Nan, 2007); tolerancia a suelos ácidos con altos contenidos de zinc (Monnet *et al.*, 2001), aluminio (Zaurov *et al.*, 2001) y tolerancia al estrés salino (Waller *et al.*, 2005), además, de las funciones provenientes de la actividad biológica de los metabolitos secundarios (que producen las plantas o los hongos endófitos) con efecto citotóxico neurotóxico, antibacterial, antifúngico e insecticida (Linder *et al.*, 2018; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Este estudio se centra en cuatro especies arvenses:

Dactyloctenium aegyptium

Debido a la forma de su inflorescencia es conocido por pasto pata de gallina, esta hierba perenne puede llegar a medir 50 cm, es de metabolismo C4, originaria del viejo mundo, actualmente está distribuida por todas las regiones tropicales, subtropicales y templadas. Se propagan por semillas o estolones, por lo tanto, tienen la capacidad de colonizar casi cualquier ambiente, principalmente en zonas ruderales costeras debido a su inclinación por suelos arenosos, además es tolerante al estrés salino. *Dactyloctenium aegyptium* es usado como alimento, y en farmacología debido a sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes, gastrointestinales y antioxidante (Ahmed *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2015; Aliyu *et al.*, 2017; Laguna *et al.*, 2009).

Cynodon dactylon

Recibe el nombre común de pasto Bermuda, es una hierba anual y perenne de metabolismo C4. Originaria de África, se extendió por las regiones tropicales, subtropicales y templadas. Llegan a medir hasta 25 cm de altura, sus estolones tienen nudos que arraigan en el suelo. Se dispersan fácilmente por sus estolones y semillas colonizando cualquier ambiente. Es tolerante a la sequía, a temperaturas altas, a diferentes tipos de suelos y pH, a la salinidad e incluso a las heladas. Esta gramínea es usada principalmente como césped, también se puede usar para forraje (aunque de menor calidad) y en la India es usada en la medicina tradicional como antidiabético, antidiurético (Rojas-Sandoval y Acevedo-Rodríguez, 2022; Kaliyaperumal *et al.*, 2013; Cook *et al.*, 2005; Holm *et al.*, 1977).

Cenchrus echinatus

También llamado zacate cadillo, planta anual de metabolismo C4. Originaria de América Central, distribuida en climas tropicales, y naturalizada en regiones subtropicales y templadas. Su altura varía de 60 cm hasta 90 cm. *Cenchrus echinatus* reside en áreas perturbadas, en zonas ruderales, tiene preferencia a suelos arenosos, por lo que se encuentran fácilmente en las playas; de propagación rápida por semillas (involucros). *Cenchrus echinatus* tiene actividad alelopática (Hilario *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2009; DeLisle, 1962).

Fimbristylis cymosa (ciperácea)

De la familia Ciperaceae, *Fimbristylis cymosa* (hurricane grass), planta perenne de climas tropicales y subtropicales de todo el mundo, llega a medir 60 cm. Tiene la capacidad de adaptarse a ecosistemas con poca humedad, suelos arenosos, bajo contenido de nutrientes, tolerancia a alta salinidad, al viento, a la sequía y a temperaturas frías. Es común encontrar a *Fimbristylis cymosa* en dunas costeras, se propaga por medio de semillas (fruto) y vegetativamente. Puede ser usada como alimento de ganado, en la India lo usan como

remedio para la disentería; también, es usada para elaborar artesanías (Rosen, 2022; Widane *et al.*, 2022; Rosen *et al.*, 2012; Burkill, 1966).

1.2.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico permite determinar de forma cualitativa, mediante reacciones químicas de coloración y precipitación, los principales grupos químicos derivados del metabolismo secundario presentes en una planta, para posteriormente determinar el aislamiento de los grupos de compuestos de mayor interés (extracción y/o fracción). Entre los compuestos de interés se encuentran los grupos fenólicos: antocianinas, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, y taninos; terpenos y esteroides: alcaloides, esteroides, saponinas, y triterpenos (Moore y Darlymple, 1976; Ávila *et al.*, 2001; Shaikh y Patil, 2020).

La extracción de los fitoquímicos de la planta se realiza con el material vegetal que puede ser fresco o seco, el disolvente a usar determinara el tipo de compuesto biológico activo debido a la polaridad de los metabolitos secundarios y el disolvente. Se pueden usar diferentes disolventes, entre los más comunes son el agua, la acetona, el cloroformo, el éter y etanol. En esta investigación se usó etanol como disolvente, ya que es más fácil de atravesar la membrana celular. Así, como hay diferentes técnicas de extracción, entre las más comunes es la maceración, que es la técnica que se usó en esta investigación. La maceración para extractos líquidos consiste en obtener las muestras de las plantas lo más pequeñas posibles para aumentar el área de superficie de extracción y mantener en contacto con el disolvente (Tiwari *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Ncube *et al.*, 2008).

A continuación, se describe brevemente las funciones biológicas que presentan los diversos metabolitos secundarios.

Alcaloides

Los alcaloides son compuestos químicos que pueden ser sintetizados por plantas o microorganismos. Estas moléculas son muy diversas según su estructura química o

biosíntesis, se pueden clasificar en alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides. Los alcaloides verdaderos derivan de los aminoácidos, presentan una estructura de anillo heterocíclico el cual contiene nitrógeno posicionado intracíclico y carbono, son básicos y se pueden encontrar en las especies vegetales en forma de sales (Facchini, 2001). Los protoalcaloides tienen como precursor los aminoácidos y tienen el nitrógeno extracíclico (no está en el anillo heterocíclico) y los pseudoalcaloides no se forman de los aminoácidos y son conocidos como alcaloides terpénicos.

Los alcaloides presentan diferentes funciones, se distinguen como moléculas tóxicas que suministradas a dosis bajas tienen efectos farmacológicos, tal caso, es el taxol (producidos por los endófitos *Nodulisporium sylviforme* y *Taxomyces andreanae*) usado como tratamiento contra el cáncer (Barrales y de la Rosa, 2014). La función más importante de un alcaloide en las plantas es de defensa, pues provee resistencia contra herbívoros, por ejemplo: la peramina y lolinas (sintetizados por endófitos del género *Epichloë*) tienen actividad insecticida (Vázquez de Aldana *et al.*, 2015).

Azúcares reductores

Los azúcares son los productos principales de la fotosíntesis, según su estructura se clasifican en azúcares reductores y no reductores. Los azúcares reductores poseen grupos de cetonas y aldehídos libres que se pueden oxidar en soluciones alcalinas con la presencia de agentes oxidantes. Entre los azúcares reductores más comunes presentes en las plantas son la glucosa, la fructosa, maltosa. Los azúcares tienen diversas funciones (proporcionan energía para sus procesos fisiológicos), ayudan a la planta en la asimilación y transporte de los nutrientes, actúan como moléculas señalizadoras, reducen la presión osmótica en respuesta al estrés; por ejemplo: las poáceas, almacenan carbohidratos como fructanos (polímeros de fructosa y glucosa), que proporciona ventajas adaptativas en condiciones de estrés hídrico y bajas temperaturas (Halford *et al.*, 2011; Cairns *et al.*, 2000; Hendry, 1993).

Cumarinas

Las cumarinas son compuestos aromáticos que están distribuidas en casi todas las especies vegetales, principalmente en pastos; pertenecen a los compuestos fenólicos y estructuralmente son lactonas fenilpropanoides; se clasifican en: furanocumarinas, hidroxycumarinas, metoxicumarinas y piranocumarinas. Originalmente, las cumarinas eran usadas como aditivos alimentarios y en la industria cosmética hasta que se demostró que causan toxicidad hepática por lo cual su uso se ha limitado. En las plantas las cumarinas presentan características alelopáticas negativas, su función es de defensa frente a herbívoros y patógenos, brindan soporte mecánico, absorben la radiación ultravioleta, atraen dispersores y polinizadores de frutos (Torres Zulueta, 2018; Ringuelet y Viña, 2013). Adicionalmente, las cumarinas tienen potenciales usos farmacéuticos debido a sus actividades antiviral, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, antifúngica, antioxidante, anti-artritis reumatoide y enfermedades del cerebro (Katsori y Hadjipavlou, 2014; Kostova *et al.*, 2011).

Flavonoides

Los flavonoides son producidos en grandes cantidades pues la luz solar favorece su síntesis, son compuestos fenólicos originados de las vías del ácido Shikímico y de los policétidos, se clasifican por su estructura molecular entre los que destacan las flavonas, flavanoles, flavonoles, flavanonas, isoflavonoides y antocianósidos (antocianinas). Los flavonoides ejercen diferentes funciones en las plantas, principalmente aportan olor, color y sabor en los vegetales, los pigmentos amarillos tienen la finalidad de atraer polinizadores y las antocianinas proporcionan las pigmentaciones azules, rojas y violetas (Estrada *et al.*, 2012; Luengo, 2002).

En general, los flavonoides pueden funcionar como protectores de la pigmentación, de daños provocados por la luz ultravioleta por su acción antioxidante (resistencia a la fotooxidación), ayudan al establecimiento de hongos simbióticos o micorrizas. Asimismo, son considerados protectores del sistema vascular por sus efectos antiinflamatorio e inhibidores de enzimas,

por ejemplo: la quercetina (Estrada *et al.*, 2012; Luengo, 2002; Martínez *et al.*, 2002). Particularmente, las isoflavonas tienen varias actividades biológicas diferentes, como los roteinoides con acción insecticida y fitoalexinas, que son compuestos antimicrobianos (Taiz y Zeiger, 2002).

Glucósidos cardíacos

Los cardenólidos son semejantes a las saponidas esteroideas, se encuentran naturalmente en forma de glicósidos o de agliconas, dependiendo de la glicosilación se pueden clasificar en primarios o secundarios según la terminación de los azúcares. En altas dosis los glucósidos cardíacos resultan tóxicos para los animales e incluso para el hombre porque paralizan el transporte de iones y nutrientes que depende de las ATPasa $\text{Na}^+ -\text{K}^+$ y producen muerte celular. Su importancia radica en el área farmacológica porque al ser regulado a bajas dosis sirve para tratar enfermedades como la insuficiencia cardiaca; por ejemplo: la digitoxina es la más conocida y se aisló de las hojas de las plantas del género *Digitalis* (*Digitalis lanata* y *D. purpurea*); simultáneamente se ha propuesto que la función ecológica de los cardenólicos es repeler herbívoros, especialmente, en las plantas del género *Digitalis* ya que las plantas son importantes fuentes para extraer los glucósidos cardíacos pues su complejidad química de biosíntesis ha dificultado su producción sintética a gran escala (Pérez., 2014; García y Carril, 2011; Ávila *et al.*, 2001; Malcolm y Zalucki, 1996).

Quinonas

Las quinonas se encuentran en bacterias, hongos, organismos marinos y plantas, estos metabolitos secundarios son compuestos obtenidos de la oxidación de grupos aromáticos, por lo tanto, su estructura molecular presenta diferentes núcleos aromáticos los cuales se clasifican en antraquinonas, benzoquinonas, naftoquinonas y poliquinonas; su biosíntesis es por las rutas del acetato-malonato (policétidos) y del Shikímato. Las naftoquinonas poseen diferentes actividades biológicas, por ejemplo: la plumbagina y la lawsona poseen efectos antibacteriales sobre especies aeróbicas y anaeróbicas; la juglona obtenida del nogal

(*Junglans regia*) tiene propiedades antibacterianas y fungicidas (Didry *et al.*, 1986). Otro ejemplo de naftoquinonas con funciones biológicas se encuentra en el hongo *Chloridium* sp., del cual aislaron la javanicina, compuesto que posee actividad contra *Escherichia coli*, *Bacillus* sp, *Candida albicans*, y *Fusarium oxysporum* (Leyva *et al.*, 2017; Eyong *et al.*, 2013; Ringuélet & Viña, 2013; Kharwar *et al.*, 2009).

Saponinas

Las saponinas derivan de los glucósidos, son sintetizadas por la vía del mevalonato, generalmente se clasifican según sus agliconas en triterpénicos y en esteroídicos, por ejemplo, en las plantas monocotiledónas es común encontrar saponinas esteroidales y en las dicotiledóneas saponinas terpénicas (Puentes, 2009; López, 2001). Las saponinas son moléculas anfipáticas que disminuyen la tensión superficial del agua mediante sus propiedades y características similares al jabón conocidas por ser tensoactivos naturales, las cuales se manifiestan en una variedad de efectos biológicos entre los que destacan los insecticidas, los alelopáticos y los antimicóticos. Por ejemplo: en la avena extraen la avenacina A-1 que actúa sobre el hongo patógeno del arroz *Gaeumannomyces graminis* y en el tomate extraen la tomatidina. Además, las saponinas podrían usarse para controlar plagas en el almacenamiento de granos alimenticios (B. Singh y Kaur, 2018; Ringuélet y Viña, 2013; García y Carril, 2011). No obstante, cuando en los alimentos están presentes las saponinas del tipo glicoalcaloides pueden llegar a ser consideradas antinutricionales y tóxicas para cualquier ser vivo.

Taninos

Los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos presentes en árboles forrajeros, arbustos, cereales y granos; su biosíntesis es por la vía del ácido Shikímico y con base en su estructura química se dividen en taninos hidrolizables y taninos condensados llamados proantocianidinas, aunque dentro de la clasificación general se puede incluir a los florotaninos y a los taninos completos (Camacho-Escobar *et al.*, 2020; Olivas-Aguirre *et al.*,

2015). Los taninos tienen la capacidad de disminuir la absorción de los aminoácidos esenciales, se unen a las proteínas desnaturalizándolas y reduce la digestibilidad en la dieta de los rumiantes. En las plantas los taninos ejercen actividad de defensa contra mamíferos, bacterias, levaduras y hongos; también protegen a la planta de los rayos UV, de los radicales libres porque actúa como antioxidantes y es considerado un metabolito alelopático (Shirmohammadli *et al.*, 2018; Ringuélet y Viña, 2013; Taiz y Zeiger, 2002).

Triterpenos

Los triterpenos son compuestos de terpenos de cadena de 30 carbonos, biosintetizados por las vías del ácido mevalónico y la del no mevalonato; de acuerdo con las características de la estructura se dividen en subgrupos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. Los triterpenos están ampliamente distribuidos, se obtienen de las resinas vegetales, forman parte de los fitoesteroles, fitoalexinas, de las ceras de las plantas y toxinas. Los triterpenos también pueden ser producidos por hongos, animales y bacterias. Los triterpenos tienen funciones importantes de proteger de la radiación solar, se involucran en la respiración, la fotosíntesis, en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal (Noushahi *et al.*, 2022; González-López, 2016; Yan *et al.*, 2014).

1.3. Justificación

Los pastos o gramíneas son plantas caracterizadas por su adaptabilidad a medios inhóspitos. Las plantas producen metabolitos secundarios que proporcionan ventajas adaptativas las cuales permiten el desarrollo, crecimiento y reproducción de las gramíneas en suelos calcáreos, ácidos o salinos, donde no se logra desarrollar otro tipo de vegetación. Los agroquímicos de origen natural han demostrado ser más amigables para el hombre y para el medio ambiente, por lo cual se ha propuesto que dichos metabolitos secundarios podrían ser utilizados para desarrollar agroquímicos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Por lo tanto, es importante analizar la diversidad de metabolitos secundarios presentes en gramíneas de climas tropicales debido a que los estudios precursores son escasos; sin embargo, han tomado gran relevancia y su exploración se ha diversificado en la comunidad científica de interés.

El énfasis del estudio radica en analizar el perfil de los metabolitos secundarios, principalmente identificar alcaloides para determinar su presencia en las gramíneas arvenses y su posible uso como fuentes de estos metabolitos secundarios con posibles funciones específicas aplicados a cultivos agronómicos.

1.4. Hipótesis

Las plantas arvenses *Cenchrus echinatus*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Distichils spicata* y *Fimbristylis cymosa* representan una fuente de metabolitos secundarios los cuales presentan diferentes actividades biológicas que pueden ser útiles para su aplicación en la mejora de cultivos.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Identificar los metabolitos secundarios presentes en tres especies de gramíneas arvenses tropicales: *Cenchrus echinatus*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Distichils spicata* y en la planta *Fimbristylis cymosa*.

1.5.2. Objetivos específicos

Determinar los metabolitos secundarios presentes en tres extractos etanólicos con diferentes tiempos de maceración mediante tamizaje fitoquímico de las plantas arvenses tropicales: *Cenchrus echinatus*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Distichils spicata* y *Fimbristylis cymosa*.

Comparar el perfil de metabolitos identificados en las muestras por especie vegetal.

Determinar la planta arvense con mayor potencial de producción de metabolitos secundarios como posible fuente de bioplaguicidas.

1.6. Referencias

- Ahmed, M. I., Sulieman, A. A., Xu, X., Na, Y., Mahdi, A. A., & Mohammed, J. K. (2019). Effect of preprocessing methods on the physicochemical and functional properties of koreeb (*Dactyloctenium aegyptium*) seeds. *Journal of Cereal Science*, 87, 280-285.
- Aliyu, M. A., Abdullahi, A. A., & Ugya, A. (2017). Antioxidant properties of selected poaceae species in Kano, Northern Nigeria. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(5), 577-585.
- Ávila, Z. G., Garcia, C., Gavilan, I., León, F., Méndez, J. M., Pérez, G., Santos, E. (2001). *Química Orgánica, Experimentos con un enfoque ecológico*. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, México, 376.
- Babu, H. R., & Savithramma, N. (2014). Screening of secondary metabolites of underutilized species of Cyperaceae. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 24, 182-187.
- Barba Chávez, J. M. A. (1997). *Introducción al análisis de los productos naturales: laboratorio de fitoquímica*. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Barrales-Cureño, H. J., & de la Rosa Montoya, R. (2014). Uso de hongos endófitos en la producción del fármaco anti-cáncer Taxol. *Biotecnología Vegetal*, 14(1).
- Benedict, S. R. (1909). A reagent for the detection of reducing sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 5(5), 485-487.
- Burkill, I. H. (1966). A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. *Nature* 137, 255 (1936). <https://doi.org/10.1038/137255c0>

- Cairns, A. J., Pollock, C. J., Gallagher, J. A., & Harrison, J. (2000). Fructans: Synthesis and Regulation. In R. C. Leegood, T. D. Sharkey, & S. von Caemmerer (Eds.), *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (pp. 301-320). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M.A., Hanson, J. Mullen, B.F. Partridge, I.J., Peters, M., Schultze-Kraft, R. (2005). *Tropical Forages: an interactive selection tool*. Web Tool. CSIRO. URL: <http://www.tropicalforages.info/>
- Dávila Aranda, P. (2006). *Catálogo de las Gramíneas de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 671 pp.
- DeLisle, D. G. (1962). *Taxonomy and distribution of the genus Cenchrus*: Iowa State University.
- Didry, N., Pinkas, M., & Dubreuil, L. (1986). *Activité antibactérienne de naphtoquinones d'origine végétale*. Paper presented at the *Annales pharmaceutiques françaises*.
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica* Editorial Limusa. México DF.
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., & Araujo-Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud mental*, 35(5), 375-384.
- Eyong, K. O., Kuete, V., & Efferth, T. (2013). 10 - Quinones and Benzophenones from the Medicinal Plants of Africa. In V. Kuete (Ed.), *Medicinal Plant Research in Africa* (pp. 351-391). Oxford: Elsevier.

- Facchini, P. J. (2001). ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 29-66. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.29
- Fehling, H. v. (1849). Die quantitative Bestimmung von Zucker und stärke mittelst Kupfervitriol. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 72(1), 106-113.
- García, A. Á., & Carril, E. P.-U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- González-López, Á. M., Quiñones-Aguilar, E. E., & Rincón-Enríquez, G. (2016). Actividad biológica de los terpenos en el área agroalimentaria. En: Espinosa Andrews, H., García Marquez, E., Gastélum Martínez, E. (editores). *Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción*. CIATEJ, México.
- Halford, N. G., Curtis, T. Y., Muttucumar, N., Postles, J., & Mottram, D. S. (2011). Sugars in crop plants. *Annals of Applied Biology*, 158(1), 1-25.
- Harborne, J. B., & Harborne, J. B. (1984). Phenolic compounds. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 37-99.
- Hendry, G. A. F. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, 123(1), 3-14.
- Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V., & Herberger, J. P. (1977). *The world's worst weeds. Distribution and biology*: University Press of Hawaii.
- Kaliyaperumal, A., Kumarakurubaran, S., & Saradha, D. M. (2013). *Cynodon dactylon* (L.) Pers.: An updated review of its phytochemistry and pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(48), 3477-3483.

- Katsori, A.-M., & Hadjipavlou-Litina, D. (2014). Coumarin derivatives: An updated patent review (2012–2014). *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(12), 1323-1347.
- Kharwar, R. N., Verma, V. C., Kumar, A., Gond, S. K., Harper, J. K., Hess, W. M., . . . Strobel, G. A. (2009). Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp. *Current Microbiology*, 58(3), 233-238.
- Kostova, I., Bhatia, S., Grigorov, P., Balkansky, S., S Parmar, V., K Prasad, A., & Saso, L. (2011). Coumarins as antioxidants. *Current medicinal chemistry*, 18(25), 3929-3951.
- Laguna, E., Ferrer, P. P., Collado-Rosique, F., & Vizcaíno-Matarredona, A. (2009). Primera cita de *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.(Poaceae) en la Comunitat Valenciana. *Studia Botanica*, 28, 175-178.
- Leyva, E., Loredó-Carrillo, S., López, L., Escobedo-Avellaneda, E., & Navarro-Tovar, G. J. A. (2017). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. 74(577).
- Linder, H. P., Lehmann, C. E. R., Archibald, S., Osborne, C. P., & Richardson, D. M. (2018). Global grass (Poaceae) success underpinned by traits facilitating colonization, persistence and habitat transformation. *Biological Reviews*, 93(2), 1125-1144.
- López Luengo, M. T. (2001). Fitoterapia: Saponósidos. *Offarm: farmacia y sociedad*, 20(6), 124-128.
- Luengo, M. T. L. (2002). Flavonoides. *Offarm: farmacia y sociedad*, 21(4), 108-113.
- Malcolm, S. B., & Zalucki, M. P. (1996, 1996). Milkweed latex and cardenolide induction may resolve the lethal plant defence paradox. In: Städler, E., Rowell-Rahier, M., Bauer, R. (eds) *Proceedings of the 9th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Series Entomologica, vol 53. Springer, Dordrecht.

- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Monnet, F., Vaillant, N., Hitmi, A., Coudret, A., & Sallanon, H. (2001). Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum*, 113(4), 557-563.
- Moore James, A., & Darlymple David, D. (1976). *Experimental Methods in Organic Chemistry*. W. B. Saunders Co. . Philadelphia. USA, 317-318.
- Nanna, R. S., Banala, M., Pamulaparthi, A., Kurra, A., & Kagithoju, S. (2013). Evaluation of phytochemicals and fluorescent analysis of seed and leaf extracts of *Cajanus cajan* L. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 22(1), 11-18.
- Nascimento, E. A., Terrones, M. G. H., Morais, S. A. L., Chang, R., Andrade, G. A., Santos, D. Q., & Pereira, B. H. A. (2009). Allelopathic activity of *Cenchrus echinatus* L. extracts on weeds and crops. *Allelopathy Journal*, 24(2).
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).
- Noushahi, H. A., Khan, A. H., Noushahi, U. F., Hussain, M., Javed, T., Zafar, M., . . . Shu, S. (2022). Biosynthetic pathways of triterpenoids and strategies to improve their Biosynthetic Efficiency. *Plant Growth Regulation*, 97(3), 439-454.
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A. (2015). Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición hospitalaria*, 31(1), 55-66.

- Pérez, A. R. (2014). BIOSINTESIS DE LOS GLUCOSINOLATOS E IMPORTANCIA NUTRICIONAL HUMANA Y FUNCIONES DE PROTECCIÓN A LAS PLANTAS. *Alimentos hoy*, 22(31), 64-80.
- Puentes, L. N. D. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET. Revista de estudios transdisciplinarios*, 1(2), 32-55.
- Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP)*.
- Rodriguez, R., White Jr, J., Arnold, A., & Redman, a. R. a. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314-330.
- Rojas-Sandoval, J., & Acevedo-Rodríguez, P. (2022). *Cynodon dactylon (Bermuda grass) (Vol. CABI Compendium): CABI International*.
- Rondón, M., Moncayo, S., Cornejo, X., Santos, J., Villalta, D., Siguencia, R., Duche, J. (2018). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University-Science*, 30(4), 500-505.
- Rosen, D. (2022). *Fimbristylis cymosa (tropical fimbry) (Vol. CABI Compendium): CABI International*.
- Rosen, D. J., Carter, R., Richardson, A., & King, K. (2012). CYPERUS ALBOSTRIATUS (CYPERACEAE) NEW TO NORTH AMERICA AND FIMBRISTYLIS CYMOSA (CYPERACEAE) NEW TO TEXAS. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 6(1), 299-302.

- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.
- Shaikh, J. R., & Patil, M. K. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603-608.
- Shi, H., Wang, Y., Cheng, Z., Ye, T., & Chan, Z. (2012). Analysis of natural variation in bermudagrass (*Cynodon dactylon*) reveals physiological responses underlying drought tolerance. *PLoS One*, 7(12), e53422.
- Shirmohammadli, Y., Efhamisizi, D., & Pizzi, A. (2018). Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Industrial Crops and Products*, 126, 316-332.
- Singh, B., & Kaur, A. (2018). Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. *Lwt*, 87, 93-101.
- Singh, V., & Kumar, R. (2017). Study of phytochemical analysis and antioxidant activity of *Allium sativum* of Bundelkhand region. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 3(6), 1451-1458.
- Sutton, G. F., Canavan, K., Day, M. D., den Breeyen, A., Goolsby, J. A., Cristofaro, M., . . . Paterson, I. D. (2019). Grasses as suitable targets for classical weed biological control. *BioControl*, 64(6), 605-622.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sinauer Assoc. Inc. Publ., Sunderland, Mass., 1-690.

- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98-106.
- Torres Zulueta, C. D. (2018). Relación estructura–actividad antioxidante de derivados de cumarinas.
- Trease, G. E., & Evans, W. C. (1987). *Tratado de farmacognosia*. Interamericana, México 846 p.
- Vázquez de Aldana, B. R., Soto Barajas, M. C., & Zabalgogezcoa, I. (2015). Hongos endófitos *Epichloë* en pastos de la península ibérica.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., . . . Kogel, K.-H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13386-13391.
- Wang, G.-X., Zhou, Z., Jiang, D.-X., Han, J., Wang, J.-F., Zhao, L.-W., & Li, J. (2010). In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 305-313.
- White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., . . . Kowalski, K. P. (2019). Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest management science*, 75(10), 2558-2565.
- Widane, K. A., Widyasari, A., & Retnaningrum, E. (2022). Characterization and Polyphasic Identification of Novel Rhizobacteria Strain Isolated from Sand Dunes Ecosystem. *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, 29(1).
- Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274-276.

- Yan, X.-J., Gong, L.-H., Zheng, F.-Y., Cheng, K.-J., Chen, Z.-S., & Shi, Z. (2014). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discovery Today*, 19(4), 482-488.
- Zaurov, D. E., Bonos, S., Murphy, J. A., Richardson, M., & Belanger, F. C. (2001). Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. *Crop Science*, 41(6), 1981-1984.
- Zhang, Y. P., & Nan, Z. B. (2007). Growth and Anti-Oxidative Systems Changes in *Elymus dahuricus* is Affected by *Neotyphodium* Endophyte Under Contrasting Water Availability. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193(6), 377-386.

Tipo de manuscrito: artículo de revisión.

Capítulo 2 Perspectivas biotecnológicas de hongos endófitos asociados a poáceas distribuidas en climas tropicales

Tatiana Esperanza **VALES-BAUTISTA**¹, MILTON CARLOS **SOTO-BARAJAS**², José Efraín **RAMÍREZ-BENÍTEZ**³, Norma Laura **RODRÍGUEZ-ÁVILA**^{*1}

¹Tecnológico Nacional de México campus I.T. Chiná. Calle 11, S/N entre 22 y 28, Chiná, Campeche, México. C.P. 24520.

²Departamento de Ciencias Ambientales y Suelos. Instituto de Geología AVENIDA UNIVERSIDAD, No. 3000, UNAM CU, COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO. C.P. 04510.

³Facultad de Ciencias Químico-Biológicas-UAC. Av. Ing. Humberto Lanz Cárdenas, S/N, Col. Ex Hacienda Kalá, Campeche, México. CP. 24085.

***Autor para correspondencia:** norma.ra@china.tecnm.mx

2.1. Resumen

Las poáceas, caracterizadas por su alta capacidad adaptativa, constituyen una de las familias de una amplia distribución geográfica. Diversos estudios atribuyen esa plasticidad fisiológica a la existencia de interacciones mutualistas con microorganismos endófitos, a través de la síntesis de metabolitos secundarios con funciones específicas contra el estrés abiótico y biótico. La evidencia científica a la fecha se centra en modelos vegetales procedentes de climas templados; sin embargo, las zonas de clima tropical presentan la mayor diversidad biológica del planeta, por lo que en este trabajo se analizó el estado del arte de hongos endófitos asociados a gramíneas tropicales con un enfoque bioprospectivo. La presente revisión hace énfasis en la diversidad biológica de los endófitos y su relación con los factores ambientales. Asimismo, se da relevancia al descubrimiento de nuevas aplicaciones biotecnológicas de hongos endófitos en agricultura.

Palabras clave: Poáceas, metabolitos secundarios, control biológico.

2.2. Introducción

Cada vez el sector agrícola genera una mayor demanda, se estima que a nivel mundial las plagas pueden afectar hasta un 50 % los rendimientos. En México los principales factores que dañan los cultivos de interés económico se relacionan con problemas biológicos y las enfermedades que causan; por lo tanto, el uso de plaguicidas químicos es imprescindible, no obstante, cuando esta actividad es practicada de manera inadecuada las consecuencias pueden ser inexorables, pues se está afectando la salud, la economía y principalmente, el ecosistema. En la búsqueda de minimizar el uso y los efectos de los plaguicidas químicos se recurren a la exploración de sustancias de origen natural. Estas sustancias o productos naturales pueden ser generadas por las plantas y por simbiosis mutualista con microorganismos endófitos, sin embargo, no están presentes de forma accesible.

Uno de los casos más conocidos en la producción de sustancias activas y que actualmente se comercializa es el Taxol (alcaloide), compuesto anticancerígeno producido por el hongo endófito *Taxomyces andreanae*, aislado del árbol *Taxus* spp de climas templados. En las zonas templadas también se descubrieron que los pastos en asociación con hongos endófitos sintetizan los alcaloides del Ergot, que al ser consumidos provocan toxicosis. Estos compuestos químicos proporcionan a las plantas hospedadoras mecanismos de defensa contra herbívoros, algunos pueden actuar como sustancias alelopáticas, efecto observado en las gramíneas arvenses que no permiten el crecimiento de otras plantas a su alrededor.

También estas regiones presentan diferencias en cuanto al nivel de investigaciones debido a su economía, pues algunos países de zonas templadas son considerados de primer mundo lo que ha ocasionado diferencias significativas en el avance de ciencia y tecnología, así como su transferencia del conocimiento; mientras que en las regiones tropicales es caso contrario, (paradoja ecuatorial). Simultáneamente, en estas regiones tropicales se presenta la mayor diversidad ecológica, donde los estudios de hongos endófitos en las plantas se están alzando. Ya se han estudiado variedad de plantas medicinales, árboles y en menor cantidad los pastos,

aunque este grupo de familia está entre el cuarto y quinto lugar de mayor diversidad de especies.

Varios de los estudios actuales consisten en la inoculación de las plantas de interés por un hongo endófito conocido, aislado y caracterizado en otra especie vegetal pero los resultados de experimentación y de campo pueden ser desfavorables, pues tienen éxito solo *In vitro*, pero en campo no. Entonces, la importancia de estudiar las interacciones entre hongos endófitos y sus hospedadoras que se encuentran adaptadas naturalmente al ecosistema es vital para encontrar compuestos químicos que se puedan emplear como bioplaguicidas o biofertilizantes.

En este trabajo se revisan aspectos relevantes sobre los hongos endófitos, como su definición, clasificación y beneficios que proporcionan a su hospedadora. Para la revisión bibliográfica se consideró a los artículos del año 2017 hasta los artículos actuales, la búsqueda incluyó las siguientes palabras: hongos endófitos aislados/caracterizados de/y que hospedan en gramíneas tropicales, mediante el principal buscador Google Scholar. La investigación se centró en artículos científicos que aplicaban metodologías de aislamiento y caracterización morfológica y filogenética para nombrar las especies de hongos endófitos encontrados. También fueron considerados los artículos de investigaciones que en su parte experimental demostraron que los hongos endófitos sintetizan productos naturales con potenciales aplicaciones agronómicas y su perspectiva actual.

2.3. Microorganismos endófitos

Originalmente, el término endófito ha sido modificado a lo largo de la historia, primero se usó para describir el vocablo al referirse a un grupo de organismos fúngicos parásitos que habitaban en las plantas; posteriormente, Béchamp (1866) utilizó el término de microzimas para mencionar la existencia de los microorganismos en las plantas; sin embargo, la definición más conocida ha sido la de Petrini (1991), donde el concepto abarca a todos los organismos que se alojan en los órganos vegetales y que en algún momento de su ciclo de

vida poseen la capacidad de colonizar los tejidos internos sin dañar aparentemente al hospedador.

Actualmente, la palabra endófito es usada para describir hongos, bacterias, algas, virus, arqueas, amebas o cualquier microorganismo que se hospede en un momento particular del ciclo de vida de las plantas en los tejidos internos aéreos como son flores, frutos, semillas, ramas y tallos con la capacidad de replicarse, transferir su información y material genético en sus hospedadores sin provocar daños evidentes de enfermedad. Actualmente, se busca incluir en la definición que los hongos endófitos no deben causar daño a la planta bajo ninguna circunstancia (Cocq *et al.*, 2017).

Los microorganismos endófitos que se hospedan en las plantas residen en casi todos los ecosistemas y forman parte importante de la vida vegetal, no obstante, exhiben características simbióticas distintas según el hábitat en el que se encuentren.

El estilo de vida de los microorganismos endófitos ha sido comparado con el de los patógenos porque logran colonizar a la planta y ambos son capaces de interactuar con su hospedadora, se ha sugerido que tienen un origen en común, pero sus rasgos filogenéticos de exactitud o similitud no se conservaron y fueron evolucionando como estrategia nutricional para adaptarse biológicamente, por lo que no está del todo claro en qué momento un microorganismo deja de ser patógeno y se vuelve mutualista.

A estas condiciones facultativas de los microorganismos endófitos se le ha denominado esquizotrofismo, término designado a los microorganismos que son patógenos en grupos de plantas específicos y endófitos en otros grupos de plantas; por ejemplo: se ha encontrado que la familia de hongos Xylariaceae tiene presencia ubicua, mientras que en regiones templadas actúan como descomponedores de madera en zonas tropicales su comportamiento biológico se diferencia por ser endófito (Petrini, 1991).

2.4. Descubrimiento de los hongos endófitos

Los registros fósiles indican que las relaciones endofíticas, principalmente con bacterias y hongos micorrizos, datan de hace más de 400 millones de años a través de los cuales la simbiosis planta-endófito fue coevolucionando.

Clay (1988) sugiere que un grupo específico de hongos endófitos de la familia de clavicipitáceos evolucionaron de un ancestro en común semejante a organismos pertenecientes al género *Claviceps*, aunque se desconoce con exactitud su procedencia, se considera que surgieron ante circunstancias ambientales complejas que experimentó el hospedador.

La investigación formal de hongos endófitos surgió a partir de los primeros registros que se remontan a finales del siglo XIX cuando Vogl (1898) identificó hifas de hongos en semillas de una planta conocida como *cizaña* (*Lolium perenne* subsp. *temulentum* = *L. temulentum*); así mismo, Guérin (1898) examinó varias gramíneas, entre ellas la misma planta que Vogl había observado (*Lolium*), en la que había propuesto que la membrana formada por las hifas sugería una simbiosis mutualista entre los hongos y las plantas. Freeman (1904) describió por primera vez la relación de vida de las plantas de *L. temulentum* con el hongo del cornezuelo, al observar que las hifas acceden al embrión antes de la maduración de la semilla y después de la germinación donde el endófito coordina su crecimiento con los tejidos vegetales, también observó que el hongo estaba presente en *L. perenne* y en menor cantidad de plantas de *L. italicum*.

Actualmente, se manejan dos hipótesis para explicar el inicio de la relación hongo-hospedadora: (a) la endógena, plantea la evolución de las células vegetales a partir de tejidos internos como la mitocondria y el cloroplasto debido a que comparten caracteres genéticos similares con el anfitrión; y (b) el sistema exógeno que asume la procedencia externa de endófitos y entran al huésped a través de superficies como las heridas o estomas.

2.5. Clasificación de los hongos endófitos

Existen diferentes formas de clasificar a los hongos endófitos, de acuerdo con el tipo de organismo, la interacción con otras plantas, por el tipo de colonización, por su forma de reproducción, ecología o transmisión.

Por lo general, los hongos endófitos se pueden clasificar en función de sus características morfológicas de reproducción que se describen en dos grupos: meiospórico o mitospórico. La clase meiospórica presenta la reproducción sexual conocida en las estructuras teleomórficas, en la división Ascomycota el mecanismo de reproducción de los hongos pueden ser por contacto gametangial, espermatización y somatogamia. Las meiosporas poseen la capacidad de sobrevivir en ambientes inhóspitos (Wallen and Perlin, 2018). En la Clase mitospórica la reproducción del hongo endófito es asexual, presenta estructuras anamórficas. En la división de Ascomycota el mecanismo de formación de esporas está dada por la conidiogénesis (Rodríguez *et al.*, 2009).

Por otra parte, Clay and Schardl, (2002) clasifican en tres Tipos la colonización de los hongos endófitos asociados con las gramíneas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de la asociación endófito-gramíneas.

Colonización		I	II	III
Hongo	Reproducción	Sexual	Ambas	Clónico
	Transmisión	Horizontal	Ambas	Vertical
	Propágulo	Ascosporas	Ambas	Semillas
	Reproducción	Estéril/clonal	Esterilidad parcial	Sexual
	Interacción	Patógeno	Intermedio	Mutualista
Anfitrión	Frecuencia de infección	Baja-moderada	Intermedio	Alto
	Taxonomía	Toda la familia de gramíneas	Gramíneas C3	Gramíneas C3

I =Tipo sintomático, II=Tipo mixto y III=tipo asintomático.

En el Tipo I la transmisión horizontal permite mantener la comunidad endofítica heterogénea porque da lugar a individuos quiméricos que impulsan poblaciones más resistentes, por

ejemplo, pueden proporcionar tolerancia térmica en su hospedadora. En el Tipo II el hongo endófito se puede denominar como simbiontes pleiotrópicos, debido a su capacidad de transmisión vertical por semilla y horizontal por esporas. En el Tipo III, la transmisión heredada de madres a hijas aumenta las posibilidades de la interacción coevolutiva.

No obstante, la forma de agrupación más utilizada para clasificar a los hongos endófitos es la propuesta por Rodríguez *et al.*, (2009), que cataloga a los hongos endófitos en dos grupos: (1) Clavicipitáceos o Clase I y (2) no Clavicipitáceos, estos últimos subdivididos en tres Clases de acuerdo con su filogenia y funciones ecológicas e identificados como Clase II, Clase III y Clase IV (Cuadro 2).

Cuadro 2. Propiedades de los hongos endófitos.

Grupo/Clase	(1) Clavicipitáceos	(2) No Clavicipitáceos	III	IV
Género de hongos	<i>Epichloë</i> , <i>Claviceps</i>	II <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Beauveria</i> <i>Xylaria</i>	<i>Fusarium</i> Sobreposición con la clase II	<i>Curvularia</i> <i>Phialocephala</i> , <i>Deschlera</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Sarocladium</i>
Filogenia	División Ascomycota	Subreino Dikaryomycota División: Ascomycota y Basidiomycota	Subdivisiones: Agaricomycotina, Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina Hongos endolícnicos	Pueden ser ascomicetos del orden Helotiales
Hospedadora	Gramíneas climas fríos tropicales	deColonizan todas las partes y de las plantas de todos los linajes en los diferentes biomas	Muy diversos, principalmente en hojas de árboles y herbáceas de zonas tropicales	Raíces de gran variedad de plantas de hábitats polares, alpinos y tropicales
Transmisión	Horizontal y vertical	Horizontal y Vertical	Horizontal	Horizontal
Referencia	Khiralla <i>et al.</i> (2016)	Khiralla <i>et al.</i> (2016) Dash <i>et al.</i> (2018)	Mane and Vedamurthy (2018)	Galindo and Fenández (2022)

Dentro del primer grupo de la clasificación, los hongos endófitos de la Clase I se asocian con la producción y acumulación de alcaloides en los tejidos vegetales que proveen a la planta

defensa contra patógenos, artrópodos y vertebrados (Rodríguez *et al.*, 2009; Khiralla *et al.*, 2016).

La Clase II y la Clase III son grupos muy diversos, pero que pueden compartir características, por ejemplo: Rayner (1915) informó por primera vez a *Phoma* spp. como hongo endófito en la planta *Calluna vulgaris* que tiene la capacidad de crecer en suelos no fértiles. Actualmente el género *Phoma* se ha encontrado asociado a hojas del arbusto tropical *Piper hispidum* con propiedades insecticidas y en las hojas y raíces en leguminosas como la soya (*Glycine max*) cultivadas en regiones de clima tropical en Brasil (Fernandes *et al.*, 2015). Por lo tanto, cada Clase posee diferentes funciones dependiendo del establecimiento del hongo.

Los hongos endófitos de la Clase IV fueron descubiertos durante el estudio de hongos ectomicorrízicos y se caracterizaron por su pigmentación marrón a negrozco; actualmente se conocen como endófitos septados oscuros (Dark septate endophyte, DSE), que son hongos biotróficos facultativos. Aunque han pasado 100 años desde el descubrimiento de los hongos endófitos septados aún no se comprende del todo su rol ecológico, pero se ha demostrado que pudieran beneficiar a las plantas en condiciones climáticas especiales, tal caso podría ser estrés hídrico y salino.

2.6. Efecto de las condiciones ambientales sobre la presencia y diversidad de hongos endófitos

Los hongos endófitos se han encontrado en todos los tejidos de las plantas, desde silvestres hasta cultivadas en diversos ambientes de regiones templadas, océanos, desiertos, zonas antárticas, suelos geotérmicos, bosques costeros y selvas tropicales. Los estudios de las exploraciones simbióticas mutualistas entre los hongos endófitos y las hospedadoras en las regiones mencionadas anteriormente permitieron conocer la diversidad y abundancia, la cual está directamente relacionada con factores ambientales biofísicos que pueden afectar la colonización, y la composición de las especies de hongos endófitos en las especies vegetales (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los factores como la humedad, la luz, la temperatura, la precipitación, la altitud o el suelo están directamente relacionados con el crecimiento óptimo del micelio y su reproducción. Así mismo, cualquier impacto que provoque disturbios al ecosistema como la deforestación, los incendios, sequías o los cultivos tradicionales pueden causar la pérdida de la vegetación y reducir la presencia y diversidad de los hongos endófitos (Sánchez Márquez; 2009).

En el caso de la luz, cuando el hongo este expuesto a mayor presencia realizará una mejor síntesis de compuestos celulares, sin embargo, los hongos endófitos tienen cierto favoritismo dependiendo del rango de temperatura, por lo tanto, los mesofílicos crecen en condiciones óptimas en el intervalo de los 15 a 30 °C y los psicrófilos, tienen la capacidad de adaptarse a las temperaturas bajas y pueden ser obligados o facultativos; por ejemplo: algunos basidiomicetes tienen la capacidad de sobrevivir pero esperan condiciones adecuadas de temperatura para fructificar.

La altitud es otro factor que provoca la disminución de los hongos endófitos, a mayor altitud las especies vegetales disminuyen y los hongos endófitos también debido a la falta de vegetación con que asociarse. Arnold and Lutzoni (2007) evidenciaron que los gradientes de latitud afectan las asociaciones endófitas, en sus estudios sobre endófitos de angiospermas, considerando el Bosque Boreal del Norte y el bosque tropical, concluyeron que las plantas presentan mayor diversidad de hongos endófitos si se encuentran más cerca del ecuador, además, en los trópicos el generalismo del hospedador fue muy común.

En ecosistemas de Perú la distribución vegetal influyó en la presencia de hongos endófitos en relación directa con la abundancia de plantas. Rojas *et al.* (2016) estudiaron en bosques lluviosos de Costa Rica el gradiente altitudinal de 400 a 2900 msnm y concluyeron que al aumentar la elevación la diversidad de endófitos disminuyó. La distribución de algunos endófitos puede ser parecida en plantas de diferentes familias si tienen características similares, por ejemplo: la mayor parte de los hongos endófitos correspondientes a la

subfamilia Balansieae aislados de las Poaceae también se hallaron en Cyperaceae y Juncaceae.

Incluso, a pesar de los diferentes factores que afectan la diversidad fúngica, se estima que existen entre 1.3 y 3.8 millones de especies de hongos a nivel mundial (Hawksworth *et al.*, 2017). La diversidad de hongos endófitos también se estudia según las divisiones filogenéticas. Hamzah *et al.* (2018) sugieren que la proporción de endófitos de las divisiones Ascomycotas: Basidiomycota es de 25:1 distribuidos en 372 383 especies de plantas vasculares, por lo cual podrían haber 1.49 millones de especies correspondientes a hongos endófitos.

Liu *et al.* (2022) analizaron 1556 artículos publicados del año 1988 hasta diciembre de 2021 referentes a la tolerancia a estrés y promoción del crecimiento vegetal proporcionados por los hongos endófitos en las hospedadoras de climas templados y tropicales; determinaron que los estudios se enfocaron en un 76.9 % en la división Ascomycota seguidos de 11.7 % de la división Basidiomycota, mientras el 11.4 % corresponde a otras divisiones filogenéticas y otros microbiomas.

2.7. Beneficios que confieren los hongos endófitos a las plantas tropicales

La forma más rápida de actuar de los hongos endófitos puede ser por competencia del espacio y nutrientes disponibles; por lo tanto, los hongos endófitos pueden ocupar el nicho que podría ser utilizado por un patógeno si realizan una colonización rápida y captación de nutrientes de las plantas.

El equilibrio entre la planta y el hongo endófito brinda beneficios, los cuales pueden ser aprovechados por los diferentes sectores industriales, específicamente en el área agrícola con el fin de minimizar el uso de compuestos químicos sintéticos. Particularmente en la sustitución de plaguicidas que afectan la salud humana y ambiental. Respecto a los efectos negativos de los plaguicidas de origen químico sobre la salud humana. Sabarwal *et al.*(2018)

recopilaron los resultados encontrados en algunas investigaciones relacionadas entre el manejo de plaguicidas y enfermedades como el linfoma, problemas reproductivos y hasta cáncer; además de los daños provocados al ecosistema como la contaminación del agua, suelo, aire, la resistencia de las plagas, el brote de nuevas plagas, enfermedades secundarias, la disminución de la biodiversidad porque afectan a especies no objetivos entre los que se encuentran plantas e insectos benéficos que pueden ser polinizadores

Los mecanismos mediante el cual actúan los hongos endófitos pueden ser físicos o químicos. El mecanismo físico o directo es inducido por la competencia interespecífica de los microorganismos mediante la antibiosis o en el caso de los hongos como micoparasitismo generado por las interacciones de contacto entre hifas y células vegetales. El mecanismo químico abarca la producción de metabolitos primarios y compuestos bioactivos, también denominados metabolitos secundarios que participan en procesos bioquímicos provocando la resistencia sistémica adquirida (RSA) o la resistencia sistémica inducida (RSI) ; por ejemplo: el hongo endófito *Piriformospora indica* (= *Serendipita indica*) induce la RSI como respuesta de defensa a patógenos en la planta *Arabidopsis thaliana* dependiendo de la concentración de ácido jasmónico presente en sus tejidos vegetales (Le Cocq *et al.*, 2017). Los compuestos químicos que pueden ser sintetizados por los hongos endófitos se ilustran en la figura 1.

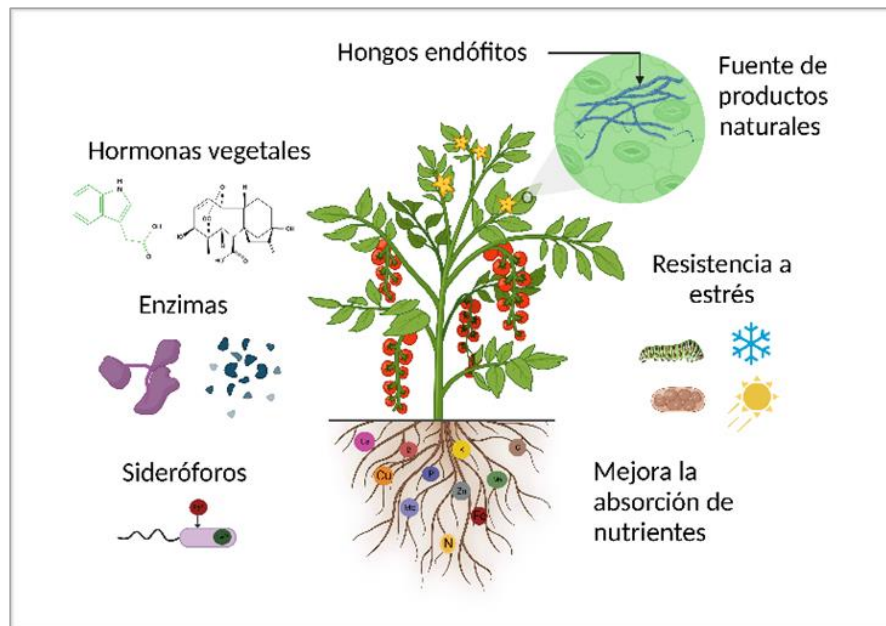


Figura 1. Compuestos químicos producidos por hongos endófitos y su potencial aplicación agronómica. Fuente: elaboración propia.

2.7.1. Producción de hormonas vegetales

El estrés abiótico es causante de efectos perjudiciales en la morfología y fisiología de las plantas. La producción de hormonas vegetales se favorece por la presencia de los hongos endófitos, como las giberelinas, citoquininas, etileno y auxinas como el ácido indol-3-acético.

Las giberelinas (GAs) fueron aisladas por primera vez del hongo *Gibberella fujikuroi*, si bien son más de 120 tipos identificados en las plantas, solo pocas tienen funciones biológicas, las cuales son esenciales, pues participan en la germinación de semillas, floración y senescencia de las plantas. Las giberelinas producidas por hongos endófitos se sintetizan en la vía del ácido mevalónico por el acetil-Coenzima A. Bilal *et al.* (2018) aislaron 15 hongos endófitos de la planta herbácea *Oxalis corniculata* ampliamente distribuida en climas tropicales, de los cuales *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium proliferatum* demostraron que producían diferentes concentraciones de giberelinas en los tratamientos de filtrados de los cultivos que

experimentaron y que aplicaron a plántulas de arroz (*Oryza sativa*) cv (mutante) Waito-C deficientes de GAs, en el cual concluyeron que las GAs promovieron el crecimiento de las plantas. Ismail *et al.* (2017) aislaron hongos endófitos en soya e identificaron a *Porostereum spadiceum* AGH786, que en los filtrados de cultivos se detectó la presencia de seis Gas diferentes en su forma activa (GA 1, GA 3, GA 4, GA 5, GA 7 y GA 19) y que se usó para cocultivos de plántulas de soya en condiciones axénicas que incrementaron la biomasa fresca y seca, además, mejoró la tolerancia al estrés salino inducido con cloruro de sodio. Se ha informado que los hongos endófitos *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium funiculosum*, *P. corylophilum*, *Rhizopus stolonifer* y *Paecilomyces formosus* producen Gas.

Las citoquininas estimulan la división celular esencialmente en las raíces, los brotes y el crecimiento de las plantas, además trabajan en conjunto con las auxinas que facilitan la absorción de los nutrientes y el agua. Aunque se ha logrado identificar la producción de citoquininas por endófitos los mecanismos de producción no han sido dilucidados por completo, la información sobre este proceso es escasa, además los estudios que se han realizado se han llevado a cabo principalmente en bacterias endófitas. Existen pocos ensayos registrados sobre la producción de citoquininas por hongos endófitos.

El etileno es una fitohormona conocida por su participación en el crecimiento, desarrollo y maduración de frutos. Además, participan en la respuesta de las plantas a las señales ambientales ante el estrés abiótico como el salino, el frío y por ozono. Por ejemplo: el hongo endófito *Gilmaniella* sp se aisló de la hierba *Atractylose lancea* y se observó que al inocular plántulas mejoró la biosíntesis de etileno y la acumulación del metabolito secundario sesquiterpenoide.

También, Cao *et al.* (2022), con el objetivo de optimizar la producción y el rendimiento de taxol que es un fármaco usado para tratar e inhibir células cancerosas, empleó el hongo endófito *Pseudodidymocyrtis lobariellae*, aislado del árbol *Taxus chinensis*, para realizar

fermentaciones, las cuales aumentaron la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de fitohormonas entre ellas etileno, citoquinina, ácido giberélico, ácido salicílico, ácido abscísico y ácido jasmónico.

En el caso del ácido indol-3-acético (AIA), su biosíntesis se ha detectado en plantas colonizadas por hongos endófitos como *Colletotricum acutatum*, *Fusarium proliferatum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *Muscodor cinnamomi*, *Piriformospora indica* (*Serendipita indica*), *Ustilago esculenta* y *U. maydis*. En la zona tropical se aisló *Colletotrichum fructicola* de la planta de café arábico que sintetizó AIA. Asimismo, los hongos endófitos *Purpureocillium lilacinum*, *P. lavendulum* y *Metarhizium marquandii* pueden producir AIA, adicionalmente, tienen la capacidad para solubilizar fósforo a partir de fluorapatita y mejorar la disponibilidad de este elemento (fósforo), y nitrógeno en soya, frijol y maíz, los cuales promueven el incremento en la materia seca de brotes y raíces.

2.7.2. Producción de enzimas

La producción de enzimas por los hongos endófitos es otro beneficio conferido a las plantas, pues está demostrado que influyen en su constitución y promueven su aumento. Entre las enzimas producidas se encuentran las peroxidasas, polifenol oxidasa, catalasas y superóxido dismutasas, que proporcionan a la hospedadora tolerancia al estrés biótico; por ejemplo, el estrés oxidativo ocasionado por metales en sustratos contaminados con níquel se reduce la peroxidación de lípidos.

Los antioxidantes también ofrecen tolerancia al estrés hídrico, se ha demostrado que el hongo endófito *Piriformospora indica* mejoró la regulación de la expresión positiva de genes protectores de la sequía mediante el incremento de enzimas antioxidantes en col chino *Brassica rapa* tratados con polietilenglicol que imitaban el estrés por sequía, además proporcionó tolerancia a suelos ácidos y al estrés salino.

Las serinas son otras enzimas que pueden producirse por los hongos endófitos, brindan efecto protector para la planta porque participan en la degradación de quitinasas dañando las paredes celulares de hongos patógenos, así como permiten la colonización de endófitos mediante la inducción de la llamada inmunidad desencadena por patrones moleculares asociados a microbios.

Los hongos endófitos igualmente producen pequeñas moléculas llamadas sideróforos que se inducen como respuesta a la baja concentración de hierro en el medio. Actúan como agentes quelantes que permiten a las plantas asimilar el hierro, su función no es muy notoria y se ha sugerido que sostienen relación con la resistencia sistémica inducida. Por ejemplo: Eslahi *et al.* (2020) evaluaron cepas recombinantes del hongo endófito *Trichoderma harzianum* (T13) en plantas de frijol, sus ensayos in vivo demostraron que las plantas inoculadas tuvieron mejor crecimiento y rendimiento, los estudios de la expresión genética revelaron que tal aumento se asoció a la producción de sideróforos. También Dusingize *et al.* (2020) estudiaron los hongos endófitos presentes en la gramínea tropical *Brachiaria* spp, del cual aislaron 169 hongos y el 49 % de los aislados fueron capaces de producir sideróforos, entre los géneros identificados están: *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coprinopsis atramentaria*, *Mucor hiemalis*, *Alternaria alterna*, *Gibbella zae*, *Mucor racemosus* y *Phoma* ssp.

2.7.3. Metabolitos secundarios

En situaciones de estrés las plantas sintetizan metabolitos secundarios con funciones biológicas. Estos compuestos químicos no están presentes en cualquier planta. Los metabolitos secundarios se agrupan de acuerdo con su origen biosintético. Entre los metabolitos secundarios se encuentran los alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, fenoles y compuestos orgánicos volátiles. Los productos naturales exhiben protección contra herbívoros y patógenos de tal modo que son considerados como la principal forma de acción

de los hongos endófitos contra el estrés abiótico y biótico, actúan como antibacterial, antifúngico, insecticidas o antioxidantes.

A partir de estos descubrimientos han sido numerosos los estudios encontrados en la literatura que centran las investigaciones en la protección de las plantas contra el estrés biótico. La mayoría de los alcaloides producidos por hongos endófitos pertenecen a los clavicipitáceos que colonizan a las gramíneas. Los alcaloides causan daños a plagas agrícolas como al gorgojo argentino *Listronotus bonariensis* y presentan importantes beneficios protectores contra más de 40 especies de insectos y disuadores de herbívoros de plantas tropicales.

Los estudios de bioprospección sobre los hongos endófitos y sus hospedadoras han permitido la generación del suficiente conocimiento para llevar a cabo la inoculación de semillas de diversos cultivos con hongos endófitos para comercializar. Nueva Zelanda es el principal productor de semillas de pastos inoculadas con hongos endófitos con aplicación en campos deportivos, de igual manera, en España se usan y comercializan semillas con el mismo fin.

Los terpenoides son los compuestos orgánicos más grandes y diversos de los metabolitos secundarios, actúan como moléculas de señalización en la simbiosis y la comunicación entre hongos y bacterias. La mayoría de los terpenoides son producidos por hongos de la división de basidiomycota. Otro grupo de compuestos dentro de los terpenoides son los ácidos fenólicos como las isobenzofuranonas y los isobenzofuranonos que actúan como antioxidantes cuya producción puede estimularse por los hongos endófitos al liberar especies reactivas de oxígeno para que pueda completar su síntesis dentro de la planta hospedadora. Los ácidos fenólicos también participan en la modulación de la mitosis y el alargamiento celular que influyen en el crecimiento y desarrollo de las hospedadoras, propiedades consideradas como promotoras de crecimiento (Galindo-Solís and Fernández, 2022).

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son moléculas pequeñas que por sus propiedades fisicoquímicas se difunden (esparcen) fácilmente a través la membrana celular. Pertenecen a diferentes grupos químicos como a los terpenoides, se desempeñan como agentes de

comunicación fúngica con otros organismos, incluidas las plantas y su entorno. presentan bioactividad contra patógenos. Algunos de los COV presentan efectos aleloquímicos que generan inhibición en el crecimiento de la raíz de algunas especies vegetales como amaranto y tomate. Los COV son utilizados para la micofumigación, el género de hongos endófitos *Muscodor* es el más explorado en relación con la producción de COV, presentando una amplia gama de estos metabolitos. Este hongo se ha utilizado en el proceso de postcosecha y como inoculante de suelo donde inhibe el crecimiento de hongos patógenos. En México se aisló el hongo endófito *Muscodor yucatanensis* del árbol *Bursera simaruba* nativo de regiones tropicales, que producen COV con efectos alelopáticos en plantas como amaranto y tomate. Además, los hongos del género *Nodulisporium* son reconocidos por producir COV con actividad antifúngica y ha sido aplicados con los mismos fines que *Muscodor*.

El perfil de metabolitos secundarios y sus beneficios son prácticamente un abanico donde las posibilidades son innumerables debido a que no se conocen todos los hongos endófitos existentes, y, por lo tanto, los beneficios. Las investigaciones sobre la ecología de los hongos endófitos y sus hospedadoras aún son insuficientes para comprender las vías biosintéticas y las sustancias producidas que no han sido caracterizadas con posibles aplicaciones agronómicas. Análogamente, es importante complementar las investigaciones para garantizar la seguridad en el uso y aplicación de los hongos endófitos y sus metabolitos producidos, pues al ser especializados las interacciones pueden no ser beneficiosos en algunos casos. Tal es el caso del hongo endófito *Acremonium strictum* inoculado en plantas de tomate redujo significativamente la producción del compuesto m-cimeno, pero al evaluar el comportamiento de oviposición del gusano cogollero *Helicoverpa armigera* observaron que las plantas inoculadas con el endófito presentaron un menor número de oviposiciones que aquellas no tratadas con el hongo, lo cual confirma la especificidad de la relación planta endófito y las consecuencias sobre la interacción con insectos.

La búsqueda de hongos endófitos productores de compuestos químicos con potenciales aplicaciones agrícolas aumenta cada día, y contribuyen a enriquecer la información existente

encontrada para su aprovechamiento en función de los beneficios que aporten. Por lo cual es relevante que las investigaciones se desarrollen en hospedadoras de hábitats que se encuentren en condiciones inhóspitas, ya que pudiera ser un indicativo de que las plantas se encuentran en simbiosis con hongos endófitos y está generando metabolitos secundarios para su adaptación ambiental.

2.8. Hongos endófitos presentes en plantas de climas tropicales

Las plantas de estas regiones son consideradas como reservorio de endófitos que aún están por encontrar, pero entre los taxones estudiados de especies vegetales frecuentemente están las Poaceae, Solanaceae, Fabaceae, Brassicaceae, Curcubitaceae, Asteraceae, y en menor recurrencia otras especies (Hamzah *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2022).

Algunos hongos endófitos que presentaron algún beneficio a su hospedadora encontrados en plantas de climas tropicales se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Hongos endófitos aislados en especies vegetales de zonas climáticas tropicales

Hongo endófito	Hospedadora	Beneficio	Fuente
<i>Aspergillus niger</i>	Girasol y soya	Tolerancia al estrés por altas temperaturas	Ismail <i>et al.</i> 2020
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Maíz	Tolerancia a salinidad	Gul <i>et al.</i> (2019)
<i>Phialemonium inflatum</i>	Algodón	Suprime a <i>Meloidogyne incognita</i>	Zhou <i>et al.</i> (2018)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Tomate	Producción de metabolitos, actividad contra <i>Fusarium oxysporum</i>	Bader <i>et al.</i> (2020)
<i>Trichoderma sp.</i>	Canola		Chhipa and Deshmukh (2019)
<i>Metarhizium robertsii</i>	Inoculada en plantas	Promotor vegetal	Alengebawy <i>et al.</i> (2021)
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Plantas recolectadas en campos agrícolas	Actividad antimicrobiana	Farhat <i>et al.</i> (2019)
<i>Fusarium solani</i>		Producción de monocerina	
<i>Aspergillus sojae</i>	<i>Plectranthus amboinicus</i>	Biocontrol de <i>Spodoptera litura</i>	Elango <i>et al.</i> (2020)

2.9. Hongos endófitos aislados en gramíneas tropicales

Las investigaciones se han enfocado en la inoculación de hongos que ya son conocidos como endófitos en cultivos de interés agronómicos, sin embargo, para el adecuado aprovechamiento de las funciones de los hongos endófitos y sus aplicaciones es importante el aislamiento y caracterización de los hongos endófitos que están presentes en plantas adaptadas a la región y estudiar sus propiedades. Estas investigaciones son menores en gramíneas porque parte de esta familia son consideradas como plantas arvenses (sin interés económico), sin embargo, en la Figura 2, se representan las zonas tropicales de los últimos seis años (2017-2022) en las que se han realizado estudios de bioprospección de hongos endófitos que hospedan gramíneas.

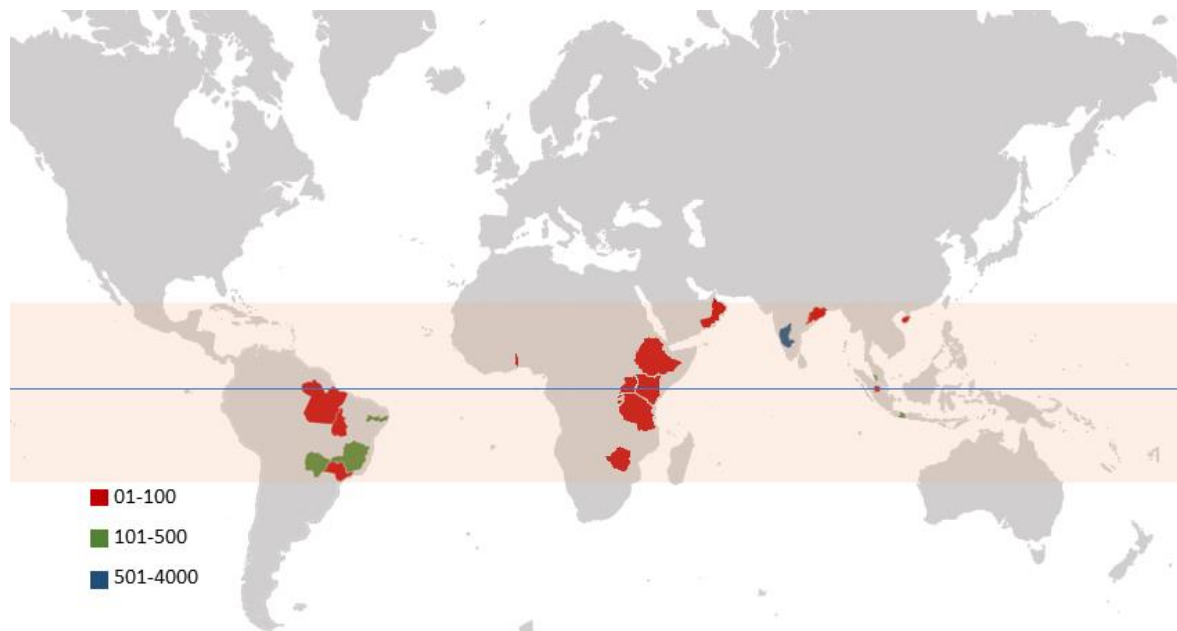


Figura 2. Distribución geográfica de hongos endófitos aislados de gramíneas de zonas climáticas tropicales.

Las exploraciones de los hongos prácticamente se llevan a cabo en todas las zonas tropicales, pero, al analizar la información se detectó que muchos estudios no logran identificar las

especies de hongos endófitos que habitan en simbiosis con las gramíneas, esto debido a diferentes factores, entre los principales es que hay especies de hongos endófitos que no esporulan y la caracterización morfológica se debe complementar con análisis filogenéticos.

En otros casos, afecto la falta de secuencias, regiones incompletas o que se sobreponen los datos de especies. Los hongos fueron caracterizados molecularmente mediante las secuencias de espaciador transcritto interno y las regiones 18S, que en algunos casos respaldan los estudios de caracterización morfológica.

Aunque en el mapa solo están registradas las zonas tropicales, hay muchas investigaciones que se están realizando sobre microorganismos endófitos en otras especies vegetales. De igual forma se observó que actualmente las zonas templadas han aumentado los estudios en gramíneas, También se observó que la zona con mayor aislamiento fue India, con 4306, sin embargo, solo 108 especies fueron caracterizadas filogenéticamente, posteriormente, Brasil de 845 aislamientos morfológicos caracterizó filogenéticamente 258. En Malasia se identificaron 190 aislados y solo cuatro especies fueron identificadas. En Indonesia de 152 aislados, se identificaron 12 especies molecularmente, en el continente africano se aislaron 177 y se identificaron 38 especies, por último, la zona tropical de China se identificaron 18 especies.

El sesgo que presentan los artículos de investigación entre el número de hongos aislados y caracterizados es muy distante, sin embargo, conocer las especies de gramíneas y hongos endófitos que viven en simbiosis mutualista es un punto de partida para incrementar la bioprospección (Figura 3).

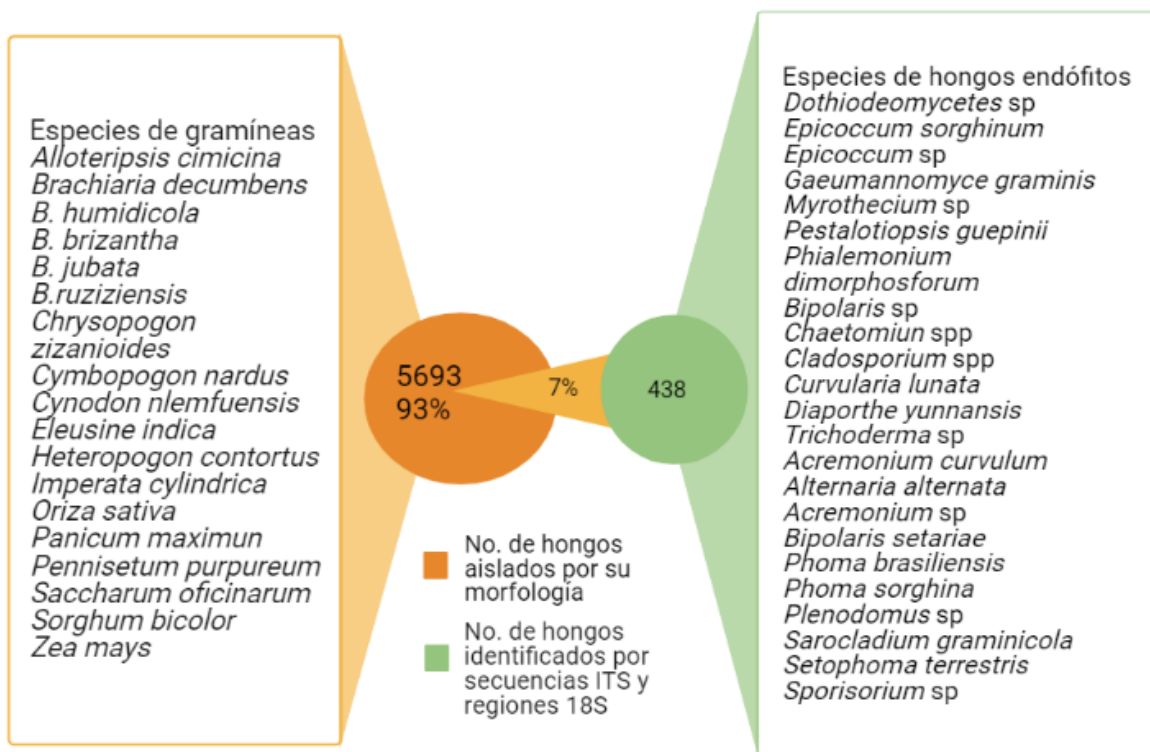


Figura 3. Hongos endófitos identificados y especies vegetales asociadas en gramíneas de zonas tropicales.

En algunos de los estudios analizados, los hongos endófitos presentaron características de biocontrol, por ejemplo: en Brasil se aisló del pasto *Brachiaria* sp., los hongos endófitos *Paraconiothyrium* sp., *Sarocladium kiliense*, *Acremonium curvulum*, *Setophoma terrestris*, *Dissoconium* sp. y *Cladosporium flabeliforme* que presentaron actividad antagónica contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los hongos endófitos *Phialemonium dimorphosporum*, *Gaeumannomyces graminis* y *Gaeumannomyces amomi* aislados en arroz y maíz de Indonesia presentaron funciones de promotores de crecimiento, pues aumentaron la altura de las plantas y la longitud de las raíces.

El análisis de los artículos de investigación recopilados confirma que la división Ascomycota es la más común en las plantas, y que existen otras divisiones y especies presentes en menor proporción que no se han podido identificar por los métodos tradicionales de aislamiento.

2.10. Conclusión

Es importante mencionar que en la región tropical se lleva a cabo estudios de bioprospección de hongos endófitos en otras especies vegetales, sin embargo, aquí analizamos los de gramíneas. Asimismo, el estudiar la transmisión de los hongos proporcionará que se desarrollen técnicas más eficientes para inocular. Además, los avances de la bioinformática también benefician para comprender los mecanismos del metabolismo secundarios, que entender este aspecto mejorará la producción de los compuestos de interés. México cuenta con una gran diversidad, el cual puede ser un área de estudio en el que deben considerar las gramíneas arvenses porque está demostrado su alta capacidad adaptativa y de producir metabolitos secundarios en las regiones tropicales.

2.11. Referencias

- Alengebawy A, Abdelkhalek ST, Qureshi SR, Wang MQ. 2021. Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics*. 9: (3). <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Arnold AE, Lutzoni F. 2007. DIVERSITY AND HOST RANGE OF FOLIAR FUNGAL ENDOPHYTES: ARE TROPICAL LEAVES BIODIVERSITY HOTSPOTS? *Ecology*. 88(3): 541-9. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
- Bader AN, Salerno GL, Covacevich F, Consolo VF. 2020. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of King Saud University-Science*. 32(1): 867-73. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>

- Béchamp. 1866. A. Du rôle de la craie dans les fermentations butyrique et lactique, et des organismes actuellement vivants qu'elle contient. CR Hebd Seances Acad Sci. 63: 451-456. [https://science.nuu.uz/admin/pdf/Uzmu-321-2021\(1-bolim\).pdf](https://science.nuu.uz/admin/pdf/Uzmu-321-2021(1-bolim).pdf) (Revisado: marzo 2022)
- Bilal L, Asaf S, Hamayun M, Gul H, Iqbal A, Ullah I. 2018. Plant growth promoting endophytic fungi *Asprgillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis*.76(2): 117-27. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0545-4>
- Cao X, Xu L, Wang J, Dong M, Xu C, Kai G. 2022. Endophytic fungus *Pseudodidymocyrtis lobariellae* KL27 promotes taxol biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis*. *BMC Plant Biology*. 22(1): 12. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03396-6>
- Chhipa H, Deshmukh SK. 2019. Fungal Endophytes: Rising Tools in Sustainable Agriculture Production. In: Jha S, editor. *Endophytes and Secondary Metabolites*. Cham: Springer International Publishing. 631-55. (Revisado Marzo)
- Clay K, Schardl C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *the american naturalist*.160(S4):S99-S127. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/full/10.1086/342161> (Revisado Marzo)
- Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*. 69(1):10-6. <https://doi.org/10.2307/1943155>
- Dash CK, Bamisile BS, Keppanan R, Qasim M, Lin Y, Islam SU. 2018. Endophytic entomopathogenic fungi enhance the growth of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) and negatively affect the development and reproduction of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Microbial Pathogenesis*. 125:385-92. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.044>

- Dusingize MC, Mutimura M, Mutai C, Ghimire S. 2020. Diversity of fungal endophytes associated with Rwandan Brachiaria ecotypes (Brachiaria spp). Rwanda Journal of Agricultural Sciences. 2(1):20-32. <https://www.ajol.info/index.php/rjeas/article/view/200842> (Revisado Marzo)
- Elango D, Manikandan V, Jayanthi P, Velmurugan P, Balamuralikrishnan B, Ravi. 2020. Selection and characterization of extracellular enzyme production by an endophytic fungi *Aspergillus sojae* and its bio-efficacy analysis against cotton leaf worm, *Spodoptera litura*. Current Plant Biology.;23:100153. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100153>
- Eslahi N, Kowsari M, Motallebi M, Zamani MR, Moghadasi Z. 2020. Influence of recombinant *Trichoderma* strains on growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L) by increased root colonization and induction of root growth related genes. Scientia Horticulturae. 261:108932. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108932>
- Farhat H, Urooj F, Tariq A, Sultana V, Ansari M, Ahmad VU. 2019. Evaluation of antimicrobial potential of endophytic fungi associated with healthy plants and characterization of compounds produced by endophytic *Cephalosporium* and *Fusarium solani*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.;18:101043. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101043>
- Freeman EM. I. 1904—The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the darnel. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character.196(214-224):1-27. <https://doi.org/10.1098/rspl.1902.0057>
- Galindo-Solís JM, Fernández FJ. 2022. Endophytic Fungal Terpenoids: Natural Role and Bioactivities. Microorganisms.;10(2).<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020339>
- Guérin MP. 1898. Sur le développement des téguments séminaux et du péricarpe des Graminées. Bulletin de la Société Botanique de France.45(5):405-11 <https://doi.org/10.1080/00378941.1898.10830873>

- Gul Jan F, Hamayun M, Hussain A, Jan G, Iqbal A, Khan A. 2019. An endophytic isolate of the fungus *Yarrowia lipolytica* produces metabolites that ameliorate the negative impact of salt stress on the physiology of maize. *BMC microbiology*.19(1):1-10. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1374-6>
- Hamzah TNT, Lee SY, Hidayat A, Terhem R, Faridah-Hanum I, Mohamed R. 2018. Diversity and Characterization of Endophytic Fungi Isolated From the Tropical Mangrove Species, *Rhizophora mucronata*, and Identification of Potential Antagonists Against the Soil-Borne Fungus, *Fusarium solani*. *Frontiers in Microbiology*.9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01707>
- Hawksworth David L, Lücking R, Heitman J, James Timothy Y. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*. 5(4):5.4.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-201>
- Ismail, Hamayun M, Hussain A, Iqbal A, Khan SA, Lee I-J. 2020. *Aspergillus niger* boosted heat stress tolerance in sunflower and soybean via regulating their metabolic and antioxidant system. *Journal of Plant Interactions*.15(1):223-32. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1771444>
- Khiralla A, Spina R, Yagi S, Mohamed I, Laurain-Mattar D. 2016. Endophytic fungi: occurrence, classification, function and natural products. *Endophytic fungi: diversity, characterization and biocontrol*.1-19. https://www.researchgate.net/profile/Sakina-Yagi/publication/340685249_Endophytic_fungi_occurrence_classification_function_and_natural_products/links/6045ce03a6fdcc9c781ddb6f6/Endophytic-fungi-occurrence-classification-function-and-natural-products.pdf#page=13 (Revisado Marzo)
- Le Cocq K, Gurr SJ, Hirsch PR, Mauchline TH. 2017. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular Plant Pathology*.18(3):469-73. <https://doi.org/10.1111/mpp.12483>

- Liu-Xu L, Vicedo B, García-Agustín P, Llorens E. 2022. Advances in endophytic fungi research: a data analysis of 25 years of achievements and challenges. *Journal of Plant Interactions.*;17(1):244-66. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2032429>
- Mane R, Vedamurthy A. 2018. The fungal endophytes: Sources and future prospects. *Journal of Medicinal Plants Studies.*;6:121-6. <https://www.plantsjournal.com/archives/2018/vol6issue2/PartB/6-2-31-305.pdf> (Revisado Marzo)
- Numponsak T, Kumla J, Suwannarach N, Matsui K, Lumyong S. 2018. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fructicola* CMU-A109. *PLoS One.* 13(10): e0205070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205070>
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *Microbial ecology of leaves: Springer.* p. 179-97. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Rayner M.C. 1915. Obligate symbiosis in *Calluna vulgaris*. *Annals of Botany.*;29(113): 97-133. <https://www.jstor.org/stable/43236093> (Revisado Marzo)
- Rodriguez R, White Jr J, Arnold A, Redman aRa. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist.*182(2): 314-30. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rojas-Jimenez K, Hernandez M, Blanco J, Vargas LD, Acosta-Vargas LG, Tamayo G. 2016. Richness of cultivable endophytic fungi along an altitudinal gradient in wet forests of Costa Rica. *Fungal Ecology.*20: 124-31. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.12.006>
- Sabarwal A, Kumar K, Singh RP. 2018. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 63: 103-14. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>

- Vogl AE. 1898. Mehl und die anderen Mehlprodukte der Cerealien und Leguminosen. Nahrungsm Unters Hyg Warenk. 12: 25-9. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/2002/pub/agrar/02H306/prom.pdf> (Revisado marzo 2022)
- Wallen RM, Perlin MH. 2018. An overview of the function and maintenance of sexual reproduction in dikaryotic fungi. *Frontiers in microbiology*.;9: 503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00503>
- Zhou W, Wheeler TA, Starr JL, Valencia CU, Sword GA. 2018. A fungal endophyte defensive symbiosis affects plant-nematode interactions in cotton. *Plant and soil*. 422(1): 251-66. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3147-z>

Capítulo 3 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios presentes en gramíneas arvenses de sitios tropicales de Campeche

Tatiana Esperanza Vales-Bautista¹, Milton Carlos Soto-Barajas², José Efraín Ramírez-Benítez,³ Norma Laura Rodríguez-Ávila^{1*}

¹Tecnológico Nacional de México campus I.T. Chiná. Calle 11, S/N entre 22 y 28, Chiná, Campeche, México. C.P. 24520.

²Departamento de Ciencias Ambientales y Suelos. Instituto de Geología AVENIDA UNIVERSIDAD, No. 3000, UNAM CU, COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO. C.P. 04510.

³Facultad de Ciencias Químico-Biológicas-UAC. Av. Ing. Humberto Lanz Cárdenas, S/N, Col. Ex Hacienda Kalá, Campeche, México. C.P. 24085.

*Autor para correspondencia: norma.ra@china.tecnm.mx

3.1. Resumen

Las plantas arvenses están ampliamente distribuidas, su crecimiento desmedido ha afectado a los cultivos agrícolas de zonas tropicales. Las arvenses tienen la capacidad de sobrevivir en diferentes ecosistemas debido a la producción de metabolitos secundarios. Se ha descrito una gran diversidad de metabolitos secundarios que están relacionados con la respuesta de las plantas en presencia de factores que provocan el estrés biótico y abiótico. Por tanto, las especies arvenses resultan de interés como fuente de metabolitos secundarios útiles para la agricultura, donde podrían aplicarse como bioplaguicidas, además de que algunos metabolitos actúan como promotores de crecimiento. En ese sentido, en este estudio se aplicaron ensayos de tamizaje fitoquímico para identificar cualitativamente la presencia de los metabolitos secundarios: alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, flavonoides, glucósidos cardíacos, quinonas, saponinas, taninos y triterpenos en las gramíneas arvenses *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y en la planta *Fimbristylis cymosa* (FC), en extractos etanólicos obtenidos tras distintos tiempos de maceración: EE1, EE2 y EE3. La frecuencia de los metabolitos en FC no presentó diferencias

a través del tiempo. También se apreciaron cambios cualitativos en la cantidad de metabolitos presentes en las muestras de las tres especies. De manera importante, se estableció que las especies estudiadas tienen potencial como fuente de alcaloides que pueden ser usados como controladores biológicos.

Palabras claves: Poaceae, Cyperaceae, productos naturales.

3.2. Introducción

Durante la historia del crecimiento poblacional la producción agrícola ha requerido mejorar y aumentar sus rendimientos para satisfacer la demanda alimentaria. Sin embargo, el sector agrícola se ha enfrentado a las plagas y a las enfermedades que derivan de estas, así como a diferentes tipos de estrés abiótico (hídrico, salino, temperatura) los cuales disminuyen la calidad de los cultivos y provocan pérdidas. Como alternativa para mejorar la productividad de los cultivos agrícolas las aplicaciones de productos naturales están incrementando pues se le atribuyen efectos protectores que combaten el estrés abiótico y biótico en las plantas.

Aunque en la literatura se menciona que las especies vegetales cuentan con defensa de protección mediante la producción de los metabolitos secundarios, estos compuestos no son del todo conocidos, por lo tanto, la bioprospección es indispensable para aprovechar las ventajas otorgadas por la naturaleza e implementar las aplicaciones de los metabolitos secundarios en cultivos de interés económicos. Algunas gramíneas no tienen valor económico, son consideradas arvenses (malezas) porque interfieren con los cultivos de importancia compitiendo por el espacio y los nutrientes, por lo tanto, es importante que la bioprospección se realice en los sitios donde se pretende mejorar los cultivos.

En la Península de Yucatán, específicamente en el estado de Campeche se ha observado la presencia de gramíneas arvenses en sitios cerca de las dunas costeras, estos sitios carecen de suelo fértil para el crecimiento vegetal, se caracterizan por el estrés salino y bajo contenido de nutrientes por lo cual no es común encontrar otro tipo de vegetación. Sin embargo, estas

plantas están adaptadas a la región y proliferan a pesar de las condiciones ambientales. Por lo anterior, es posible inferir que dichas especies son productoras de metabolitos secundarios.

En este estudio se realizó la bioprospección de metabolitos secundarios donde se identificaron de forma cualitativa la presencia de alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, flavonoides, glucósidos cardíacos, quinonas, saponinas, taninos y triterpenos en las gramíneas arvenses (figura 4): *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y en la planta *Fimbristylis cymosa* (FC) recolectadas en varias localidades costeras del estado de Campeche las cuales fueron maceradas a diferentes días (EE1,EE2,EE3). Lo anterior, con el fin de determinar las especies con mayor potencial de síntesis química de metabolitos secundarios con posibles aplicaciones agronómicas.

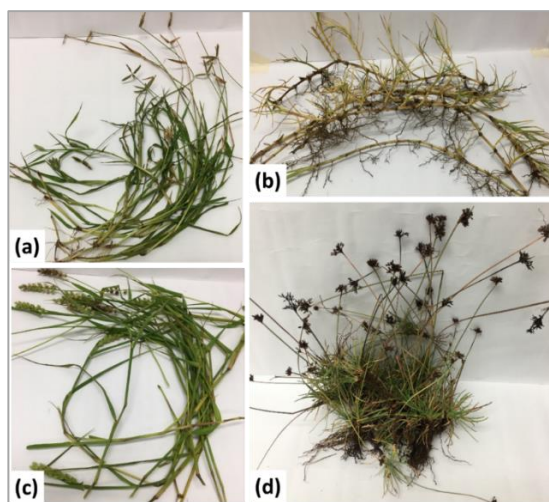


Figura 4. (a) *Dactyloctenium aegyptium*. (b) *Cenchrus echinatus*. (c) *Cynodon dactylon*. (d) *Fimbristylis cymosa*.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Material vegetal

El material vegetal (Figura 5) fue recolectado de seis diferentes localidades costeras del estado de Campeche, las plantas fueron transportadas al Instituto Tecnológico de Chiná,

donde fueron procesadas, las muestras eran plantas turgentes sin indicios de ataques físicos por herbívoros o presencia de daño alguno por bacterias u hongos.

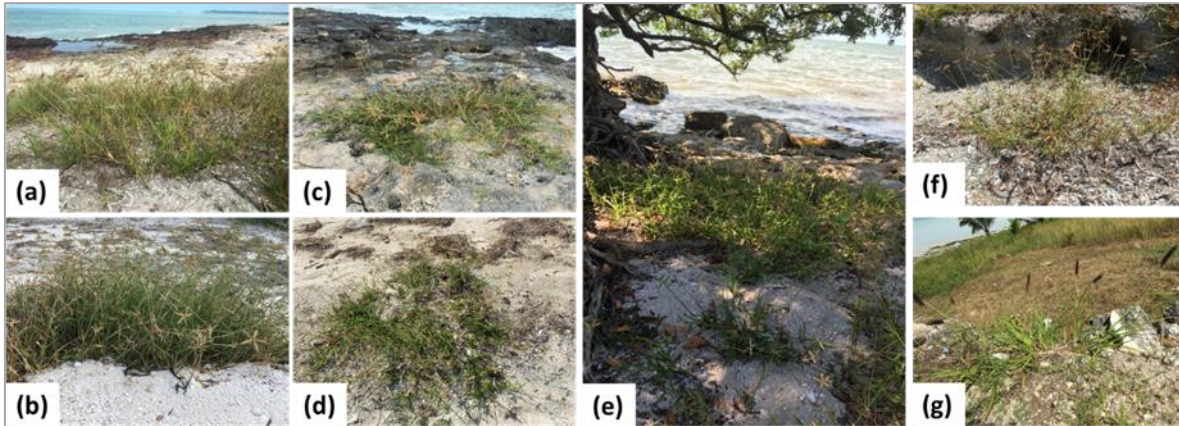


Figura 5. Ecosistemas donde se recolectaron las gramíneas arven ses: *Dactyloctenium aegyptium* (a,b,c,d,e,f) y *Cenchrus echinatus* (g).

En cada localidad se recolectaron tres plantas de *Dactyloctenium aegyptium*, *Cynodon dactylon* y *Cenchrus echinatus* (en localidad seis solo se recolecto una planta), además en la localidad dos se recolecto una planta de *Fimbristylis cymosa*, en el cuadro 4 se incluyen los detalles de las plantas recolectadas.

Cuadro 4. Características locales donde se recolectaron las plantas arvenses.

Localidad	Hábitat	Coordenadas		Plantas recolectadas
		Latitud	Longitud	
1 Seybaplaya	Dunas costeras	19°37'31.0"N	90°41'06.3"O	9
2 Siho Playa, Campeche	Dunas costeras	19°35'10.0"N	90°41'52.6"O	10
3 Champotón	Dunas costeras	19°25'23.1"N	90°42'54.9"O	9
4 Xochen, Campeche	Dunas costeras	19°11'04.2"N	90°53'49.3"O	9
5 Villamar, Campeche	Dunas costeras	19°17'21.5"N	90°46'34.7"O	9
6 Ciudad del sol, Champotón	Dunas costeras	19°28'38.6"N	90°42'16.3"O	7

3.3.2. Preparación del extracto etanólico estándar

Las muestras recolectadas se lavaron con agua corriente para eliminar restos de suelo y arena. Seguidamente se pesaron 15 g peso fresco de cada muestra y se maceraron en 50 ml de etanol al 96 % por cinco días (EE1), por 10 días (EE2) y por 15 días (EE3), se almacenaron en condiciones de temperatura controlada de 37 °C sin agitación en frascos de vidrio para laboratorio sin exposición a la luz. Posterior a la maceración se filtraron las muestras para eliminar el orujo y se etiquetaron como extracto etanólico estándar (EEE). Se realizaron las corridas de los ensayos químicos (Cuadro 5) para determinar la presencia de cada metabolito secundario en cada muestra de las tres fases de maceración. Durante las corridas químicas las muestras fueron almacenadas sin luz y a temperatura de 37 °C. Las reacciones se consideran positivas al cambio de coloración o precipitación según la literatura correspondiente a cada ensayo.

Cuadro 5. Compuestos fitoquímicos evaluados y su importancia biológica.

Metabolito secundario	Importancia biológica	Método de identificación
Alcaloides	Resistencia a herbívoros Insecticida Inhibidor de microorganismos	Dragendorff (Domínguez 1973, Barba 1997) Reactivo de Hager (Domínguez 1973, Barba 1997)
Azúcares reductores	Facilita la asimilación de nutrientes Modula procesos fisiológicos Moléculas señalizadoras	Reacción de Fehling (1849) Reacción de Benedict (1909)
Cumarinas	Antimicrobiana Antiviral Antioxidante	Reacción de Ehrlich (Coloración naranja) Reacción de hidróxido de amonio (Fluorescencia azul-violeta) Reacciones con soluciones alcalinas (Domínguez 1973)
Flavonoides	Insecticida Fitoalexinas	Reacción de Shinoda (Domínguez 1973, Barba 1997) Reacción de NaOH 10 % (Harbone 1989, Barba 1997)
Glucósidos cardíacos	Repelente de herbívoros	Ácido acético glacial con gotas de cloruro férrico al 5% y ácido sulfúrico (anillo marrón en la interfase de la reacción) Keller-Killani test
Quinonas	Antibacterial Fungicida	Reacción hidróxido de amonio (Coloración roja) Reacción ácido sulfúrico (Coloración roja)
Saponinas	Insecticida Alelopáticas Antimicóticas	Prueba de altura y estabilidad de espuma (Domínguez 1973) Reacción de Lieberman Bouchard (Coloración rosa, roja, magenta o violeta)

Taninos	Alelopáticos Protección UV Defensa contra mamíferos	Reacción de Rosenthaler (Domínguez 1973, Barba 1997) Reactivo de gelatina (Precipitado blanco) Reactivo de cloruro férrico al 1% (Azul a negro, verde) Reactivo de Ferrocianuro de potasio al 1% (Domínguez 1973, Trease 1986)
Triterpenos	Antibacterial Protector de altas temperaturas	Cloroformo, anhídrido acético y H ₂ SO ₄ (colores rojos, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase de la reacción indican que la prueba es positiva. (Domínguez 1973, Barba 1997)

Elaboración propia

3.3.3. Análisis de datos

Se realizaron tres réplicas de cada ensayo por cada muestra, los análisis cualitativos se registran mediante el sistema de cruces que indican la ausencia o presencia de los metabolitos secundarios de acuerdo con Domínguez (1973). Posteriormente se graficó el número de metabolitos identificados por cada sitio (frecuencias), elaborados en el programa de Excel.

3.4. Resultados y Discusión

El tamizaje fitoquímico es una prueba preliminar cualitativa, su fundamento es específico para cada reacción porque identifica las diferentes estructuras químicas de los metabolitos secundarios. En este estudio se analizó la presencia de los diversos grupos químicos que forman los metabolitos secundarios. La planta arvense *Fimbristylis cymosa* fue la única muestra que se recolectó en la localidad dos por lo cual se comparó la presencia de los metabolitos en los tres extractos (EE1, EE2 Y EE3), esta planta fue la única que no presentó diferencias en el número de metabolitos identificados (figura 6) mientras que las gramíneas arvenses *Cynodon dactylon*, *Dactyloctenium aegyptium* y *Cenchrus echinatus* sí presentaron variación en el número de metabolitos identificados por cada muestra de los tres extractos etanólicos, además, se observó que las reacciones presentaron diversas intensidades de color entre las muestras de las diferentes especies vegetales.

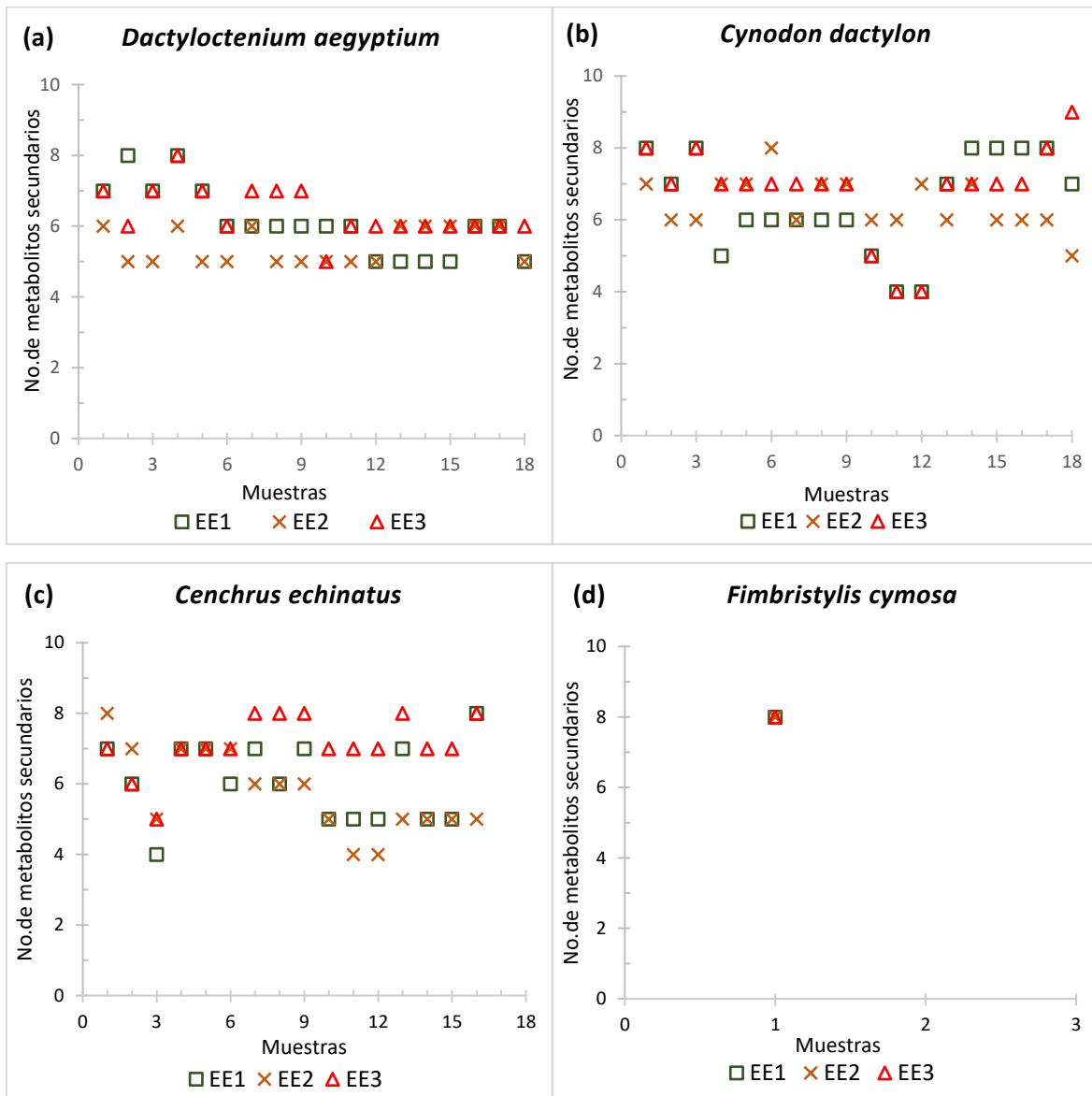


Figura 6. Comparación del número de metabolitos secundarios identificados por cada extracto etanólico de cada muestra (planta recolectada).

A continuación, se presentan los resultados de los metabolitos identificados en las plantas arvenses.

3.4.1. Alcaloides

La mayoría de los alcaloides son oxigenados, en su estado natural se presentan en forma de sales, son solubles en sustancias polares a pH ácido; por eso las pruebas de colorimetría y precipitación incluyen soluciones neutras o débilmente ácidas donde los alcaloides afines a la polaridad precipitan y cambian de color mediante las pruebas generales de Dragendorff y Hager (Popoff).

En el caso de Dragendorff (solución ácida de yodobismutato de potasio) las muestras de los extractos etanólicos que contenían alcaloides (bases nitrogenadas) se combinaron con los compuestos químicos del reactivo y se formaron sales dobles (yoduros) las cuales se observaron como precipitados que adquirieron una coloración rojiza, naranja o marrón (se considera que las reacciones se comportan como una base que reacciona con el ácido formando sal de amonio, después forma una sal compleja insoluble por el intercambio iónico de la sal de amonio y el yodobismutato que reacciona con la estructura del alcaloide presente en la muestra, el ion que se forma tiene color, este color puede ser menos intenso si las aminas son secundarias) (Raal *et al.*, 2020). Aunque el reactivo de Dragendorff es específico para alcaloides puede dar falsos positivos en presencia de proteínas, cumarinas, hidroxiflavonas y algunos polifenos, de manera que, la prueba se complementó con el reactivo de Hager que en combinación con las muestras que tenían alcaloides formaron cristales (picratos), además el cambio de color de la muestra debe ser amarillo (figura 7).

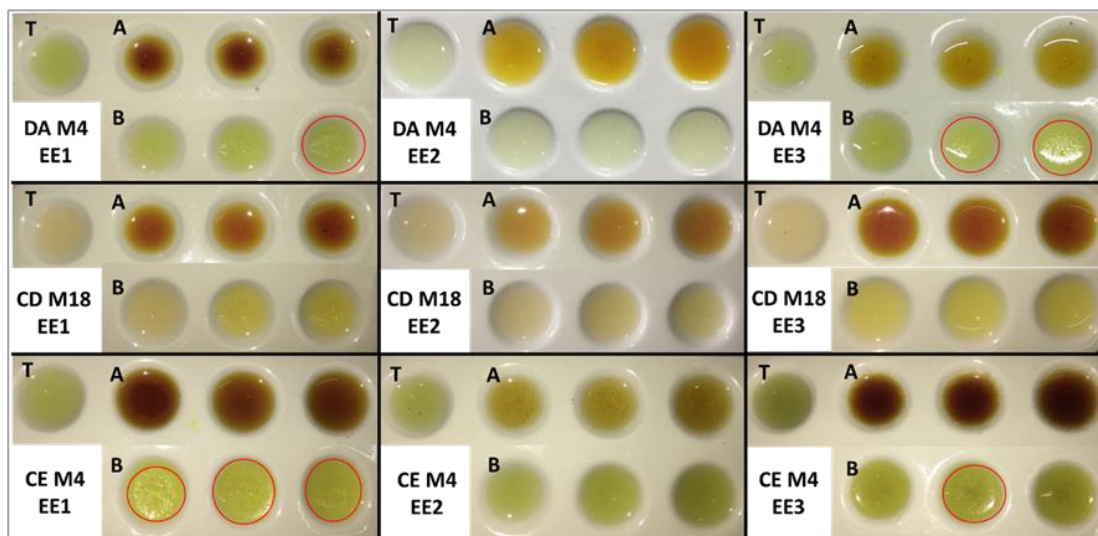


Figura 7. Ensayos químicos para determinar alcaloides. DA=*Dactyloctenium aegyptium*, *Cynodon dactylon* (CD) y *Cenchrus echinatus* (CE). M4=Muestra 4. M18=Muestra 18. EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= testigo. A=Reacción de Dragendorff. B=Reacción de Hager.

Los alcaloides son un grupo que poseen varias funciones biológicas, en este trabajo se identificó que todas las muestras de *Dactyloctenium aegyptium* resultaron positivas, sin embargo, aunque en los ensayos se observó que la cantidad de cristales que se formaron en las reacciones de Hager variaban entre las localidades donde se recolectaron las muestras, por lo cual se infiere que a pesar de que son la misma especie vegetal y comparten las características ecológicas no tienen la misma concentración del metabolito, se podría mencionar que su concentración es baja debido a que no abundaban cristales en las muestras y en el caso de Dragendorff se visualizó trazas de precipitado. *Cynodon dactylon* no presentó alcaloides en la localidad cuatro, pero en el resto de las localidades se observó mayor formación de cristales para la reacción de Hager y para la reacción de Dragendorff los resultados de todas las muestras fueron similares, presentaron cambio de color. En *Cenchrus echinatus* de la localidad uno y dos las reacciones fueron más notables. En la figura 8 se presenta el porcentaje de las plantas que resultaron positivas para las reacciones.

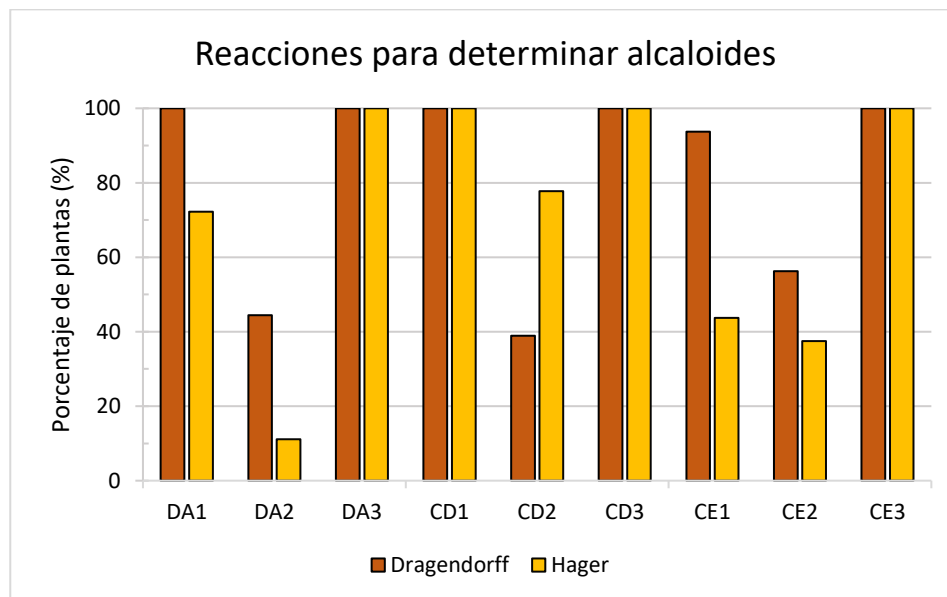


Figura 8. Comparación de los porcentajes de alcaloides identificados en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3).

3.4.2. Azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron por las reacciones de Benedict y Fehling. En las reacciones de Benedict (1909) el azúcar reductor presente en las muestras se oxida (se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ en medio básico que precipita a óxido de cobre en presencia de azúcares reductores en las muestras) y se formó un precipitado de color rojo-naranja que considera la concentración de moderado a alto, mientras que en algunas muestras fue de rojo ladrillo que señala que hay una gran cantidad de azúcar reductor en las muestras; aunque este estudio es cualitativo, en el caso de la reacción de Benedict se menciona que el color varía según la concentración del metabolito, incluso puede dar coloraciones verde que indica trazas y amarillo baja cantidad de azúcares reductores (Shaikh y Patil, 2020).

La prueba de Fehling (1849) consiste en la reducción del grupo carbonilo, se oxida a ácido carboxílico y se reduce a óxido de cobre, entonces se forma un precipitado de color rojo que es lo que se observó durante los ensayos químicos en las diferentes muestras. Las pruebas de Benedict y Fehling (Figura 9) son muy parecidas en sus mecanismos de reacciones, pero la de Benedict es más estable y sensible debido a que el reactivo incluye citrato de sodio (citrato sódico).

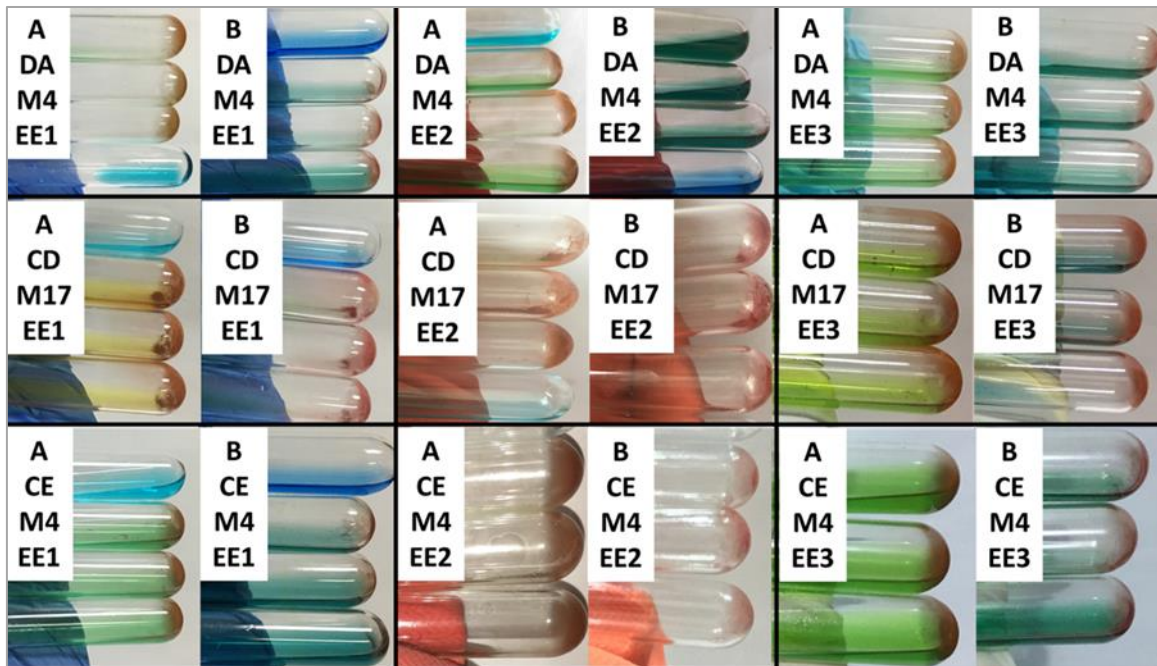


Figura 9. Ensayos químicos para determinar azúcares reductores. A= Reacción de Benedict. B=Reacción de Fehling. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). M4= Muestra 4. M17=Muestra 17. EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días.

Los azúcares reductores son metabolitos que se encuentran en la mayoría de las plantas, proporcionan protección frente al estrés hídrico, las plantas que se recolectaron presentaron diferentes intensidades de color y precipitado. La figura 10 ilustra el porcentaje de plantas positivas a las pruebas.

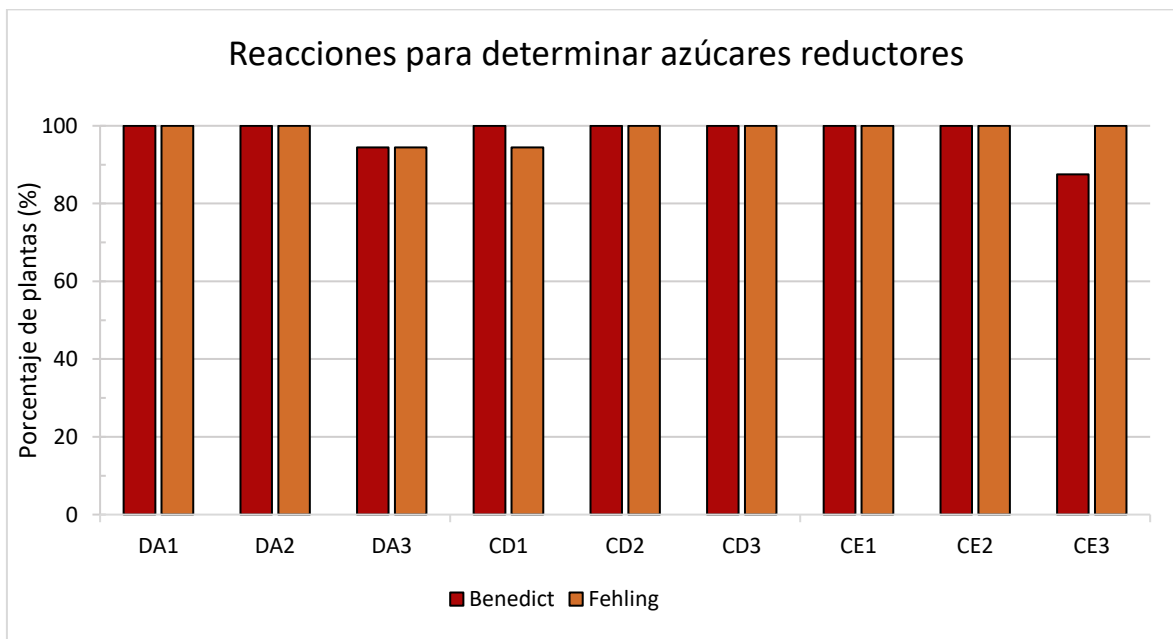


Figura 10. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron azúcares reductores en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3).

3.4.3. Cumarinas

Al combinarse el reactivo de Ehrlich con muestras que posean compuestos con anillos furánicos o pirroles se produce una lactonización del ácido hidroxicinámico y se determinan los grupos furanos que se exhiben por la coloración naranja, después se forma el catión imínico que es el producto final de la reacción y adquiere el color púrpura, si hay compuestos similares los colores pueden ser morado, azul o violeta. En este ensayo de Ehrlich todas las muestras resultaron negativas, aunque en la planta *Fimbristylis cymosa* se formó un precipitado y la prueba se consideró positiva.

Los extractos vegetales se ensayaron con las pruebas de hidróxido de amonio, porque el reactivo altera los electrones que forman las sales alcalinas del ácido cumárico e intensifica

la fluorescencia que varían de color azul a amarillo y púrpura, esta prueba de igual forma que la anterior resulto negativa en todas las muestras pues las reacciones no presentaron fluorescencia.

Por último, en soluciones alcalinas se disuelven las lactonas que son cumarinas, por lo cual para determinar la presencia de estas también se ensayaron las reacciones con hidróxido de sodio y potasio bajo luz ultravioleta, en el cual las muestras resultaron positivas porque mostraron fluorescencia (figura 11).

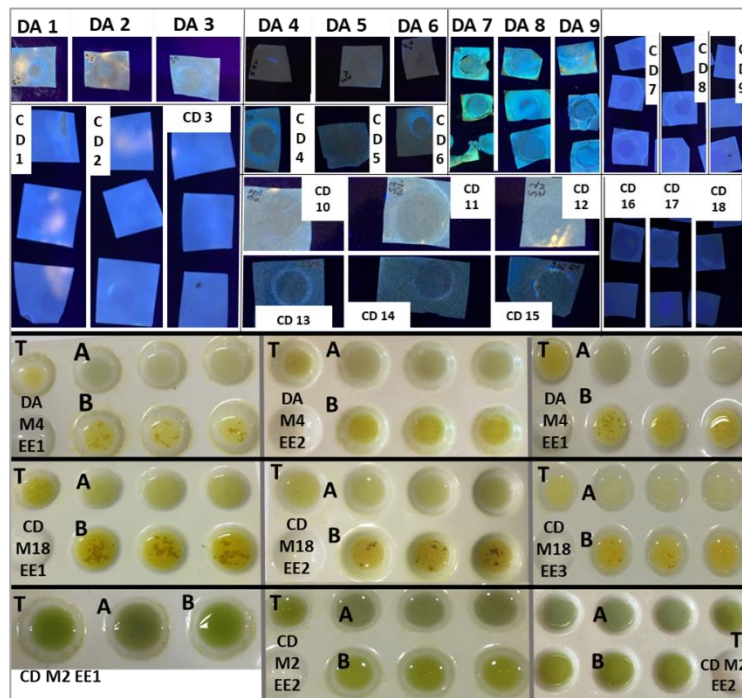


Figura 11. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. A= Reacción de Ehrlich. B=Reacción de NH_4OH . Solución de NaOH 5 %: 1,4,7,10,13 y 16. Solución de NaOH 10 %: 2,5,8,11,14 y 17. Solución de KOH 2N.3, 6, 9, 12, 15 y 18

Las cumarinas son uno de los metabolitos secundarios más comunes que existen en las plantas, que las reacciones de Ehrlich y del hidróxido de amonio resultaran negativas se puede atribuir a la polaridad de estas, pues las cumarinas son solubles en solventes no polares y para la maceración se usó etanol que es un disolvente polar. La figura 12 representa el porcentaje de las plantas que resultaron positivas en las pruebas de soluciones alcalinas,

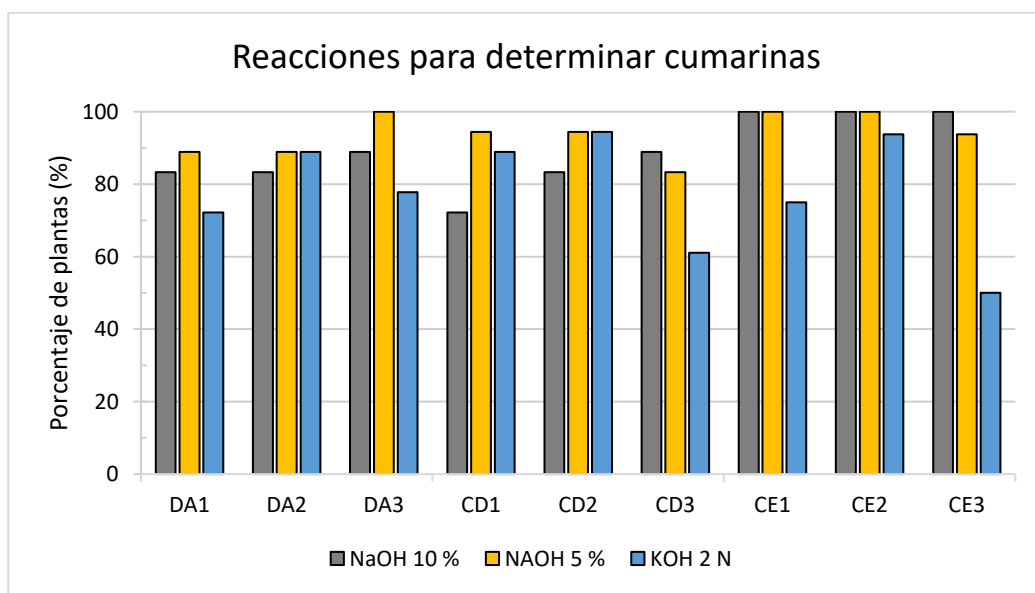


Figura 12. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron cumarinas en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3).

3.4.4. Flavonoides

Los flavonoides se detectaron cualitativamente por la reacción de Shinoda y por el hidróxido de sodio. En la reacción de Shinoda se combinan los reactivos de magnesio metálico y ácido sulfúrico con los extractos, en las reacciones se observó la formación de burbujas (liberación del gas dihidrógeno), entonces el cloruro de magnesio libre en la reacción se une con los flavonoides presente en las muestras y forma complejos que son las coloraciones de magenta

claro a intensas que se observaron en las diversas muestras que podrían indicar la presencia de flavononas (Figura 13). Si la coloración es roja indicará la presencia de auronas o chalconas, una coloración naranja a rojo indicará la presencia de flavonas, si es rojo indica flavonoles.

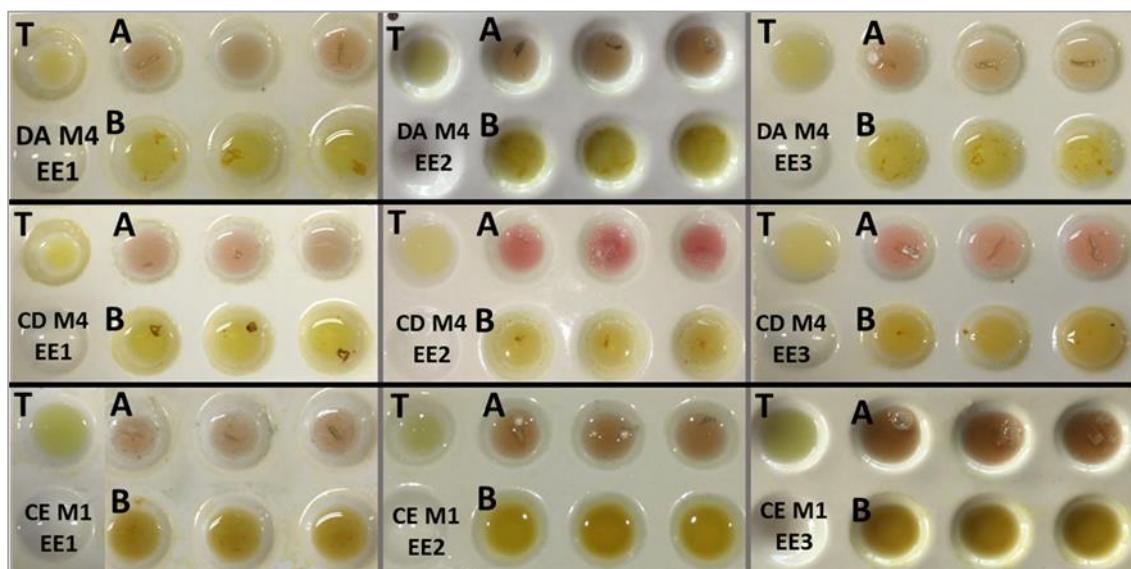


Figura 13. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. M1=Muestra 1. M4=Muestra. A=Reacción de Shinoda. B=Reacción de NaOH 10 %.

Los flavonoides con el núcleo benzopirona como las flavonas, flavonoles al reaccionar con la solución de hidróxido de sodio produce la ruptura del anillo C del flavonoide y se producen las diversas coloraciones, las chalconas, xantonas y flavonas se demuestran por la coloración amarilla de diferentes intensidades a púrpura rojiza, también las isoflavonas pueden exhibir diferentes tonalidades de color rojo, los flavonoles de coloración café a naranja y las antocianinas de color azul. En ambas reacciones se registraron en la siguiente grafica (Figura

14) la cual indica los extractos etanólicos que mostraron mayor actividad en los ensayos por el cambio de coloración y precipitación.

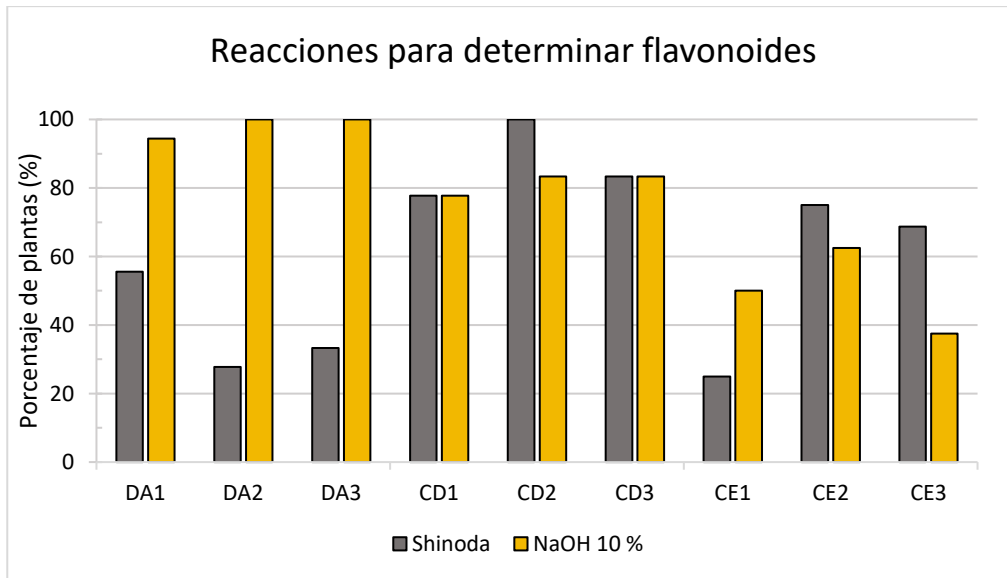


Figura 14. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron flavonoides en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3).

3.4.5. Glucósidos cardíacos

Los glucósidos cardíacos son caracterizados por su estructura química de los desoxiazúcares, los cuales se pueden identificar por la prueba de Keller-Killiani, que consiste en combinar las muestras con ácido acético glacial y cloruro férrico al 5 % donde las reacciones formarían la presencia de un anillo pardo-rojizo en la interfase, cuando se le agrega ácido sulfúrico (Figura 15).

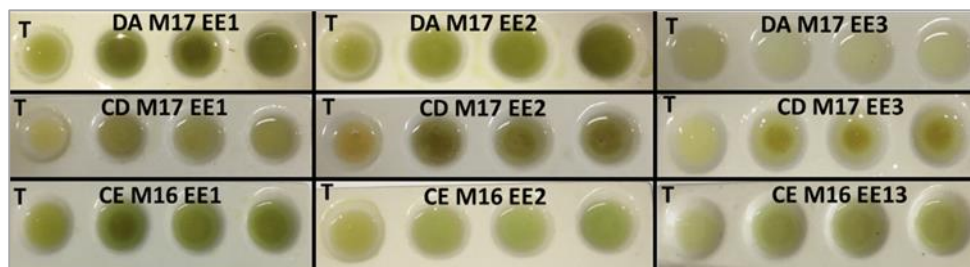


Figura 15. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. M16=Muestra 16. M17=Muestra 17.

Esta reacción es rápida por lo cual al término de la reacción puede regresar a su color del extracto, las muestras no representan ser una fuente para extraer este metabolito, e incluso para la planta no es fácil sintetizar este grupo de metabolito por lo cual no es común encontrarlos en cualquier especie vegetal y en algunos casos se considerada específica para las especies vegetales, por ejemplo, para el género *Digitalis*, aun así, algunas muestras presentaron cambio de color (Figura 16).

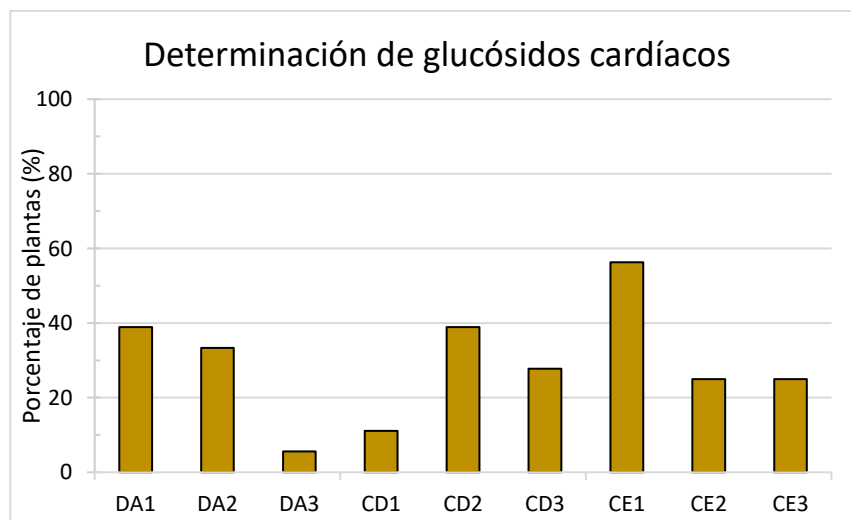


Figura 16. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron glucósidos cardíacos en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD),

Cenchrus echinatus (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3).

3.4.6. Quinonas

Para determinar las quinonas se emplearon los reactivos concentrados de hidróxido de amonio y ácido sulfúrico (Figura 17). El hidróxido de amonio forma complejos en presencia de naftaquinonas y antraquinonas libres de color rojo cereza y el ácido sulfúrico es un agente que reduce las benzoquinonas a hidroquinonas que de igual forma da colores rojos o púrpuras.

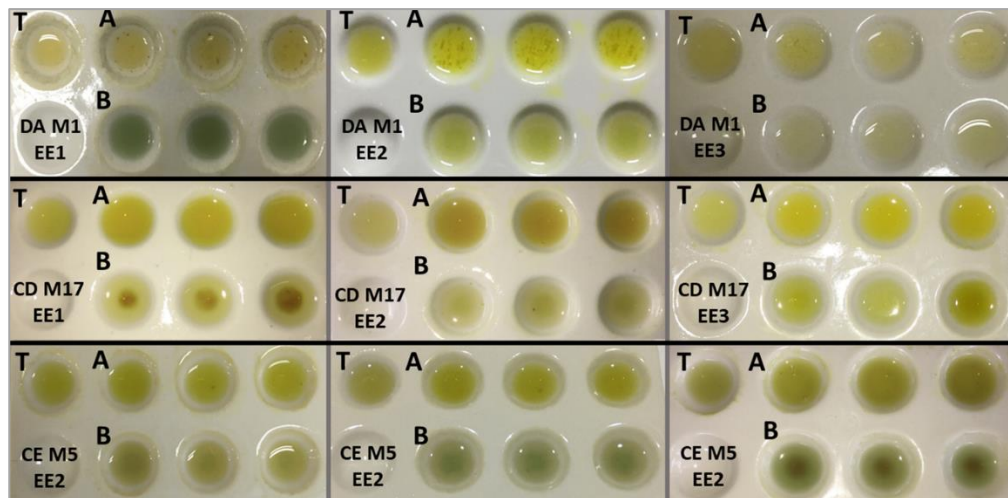


Figura 17. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. M1=Muestra 1. M5=Muestra 5, M17= Muestra 17. A=Reacción NH₄OH. B=H₂SO₄

Aunque las reacciones no presentaron el color rojo, algunas precipitaron como se observa en la figura 17, sin embargo, la precipitación se cuenta como positiva por lo cual la figura 18 muestra la comparación del total de muestras.

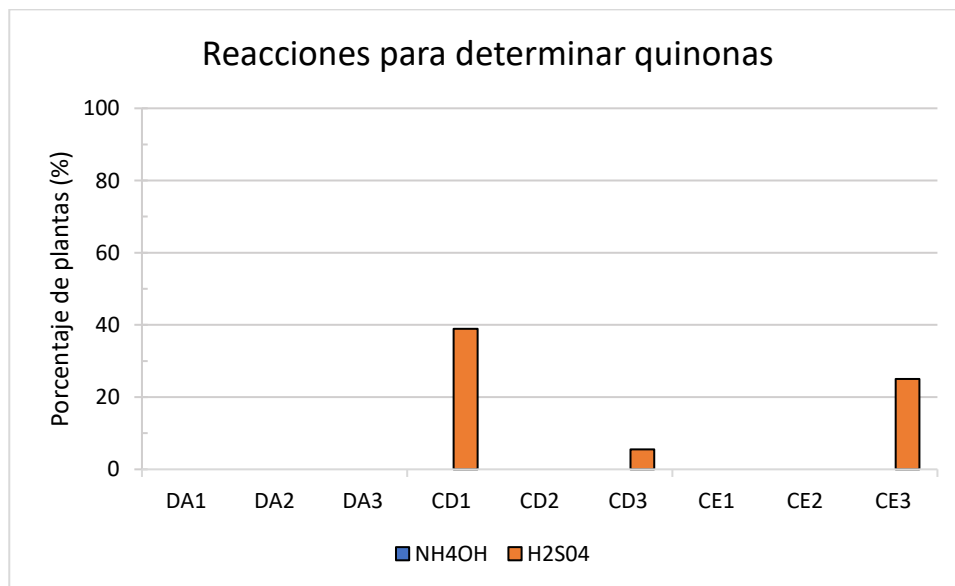


Figura 18. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron quinonas en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3).

3.4.7. Saponinas

Las saponinas se determinaron por los ensayos de espuma, la reacción de Lieberman-Bouchard y la reacción de Rosenthaler.

La prueba de espuma es la más común para determinar saponinas por sus propiedades fisicoquímicas en la cual parte de su estructura es una aglicona liposoluble y otra parte es azucarada que es hidrosoluble por lo cual al ser agitadas producen espuma, las muestras que presentan estabilidad de espuma por 10 minutos en sus espumas se consideraron positivas (Figura 19).

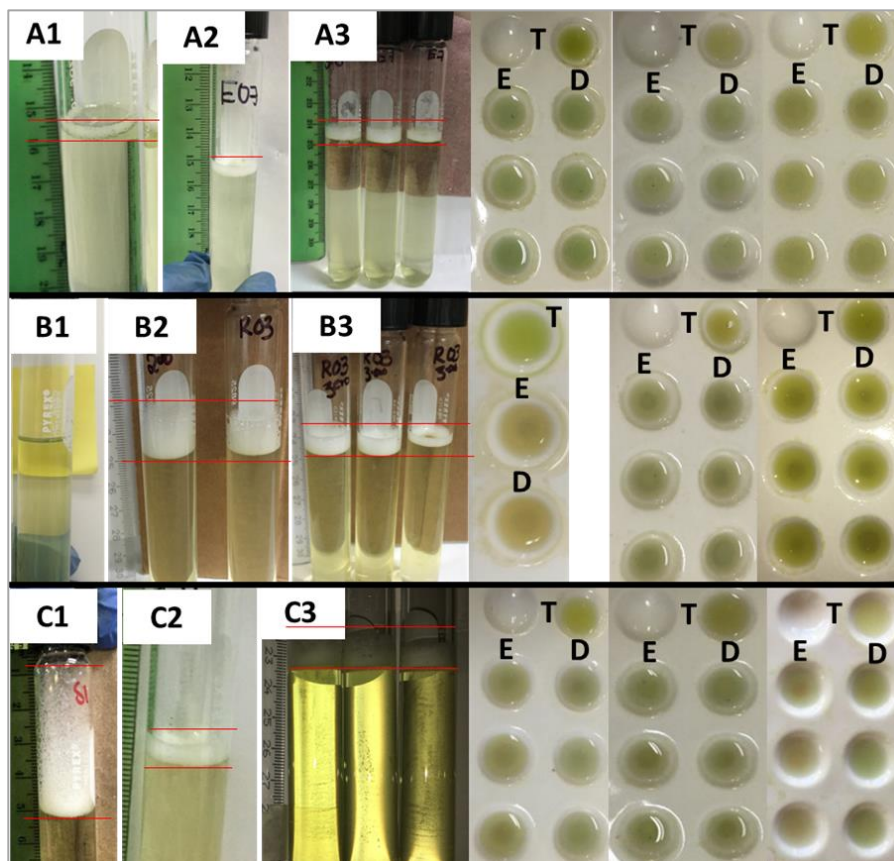


Figura 19. Ensayos químicos para saponinas *Dactyloctenium aegyptium* (A1-A3), *Cynodon dactylon* (B1-B3), *Cenchrus echinatus* (C1-C3). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= Testigo. D= Reacción de Lieberman-Bouchard. E= Reacción de Rosenthaler.

En la reacción de Lieberman-Bouchard se fundamenta en que los ácidos producen compuestos de dobles enlaces que presentan color verde (colesterileno), el grupo estructural de las saponinas poseen un núcleo de andostrano (grupo hidroxilo) que reaccionan con el anhídrido acético y el ácido sulfúrico, se produce la pérdida del agua y se da lugar a la protonización de las saponinas presentes en las muestras, en el medio anhidro se presenta en color verde azulado que indica la presencia de saponinas esteroidales (colestapolienos), y las coloraciones de rojo, magenta o púrpura es de saponinas triterpenoides (sus iones).

En la reacción de Rosenthaler, el ácido sulfúrico actúa como catalizador de la reacción, así como oxidante de las saponinas triterpénicas y reacciona con la vainillina que generan el compuesto que se observa con color, las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan color violeta. En las reacciones la prueba de espuma fue la más común para determinar la presencia de este grupo (Figura 20).

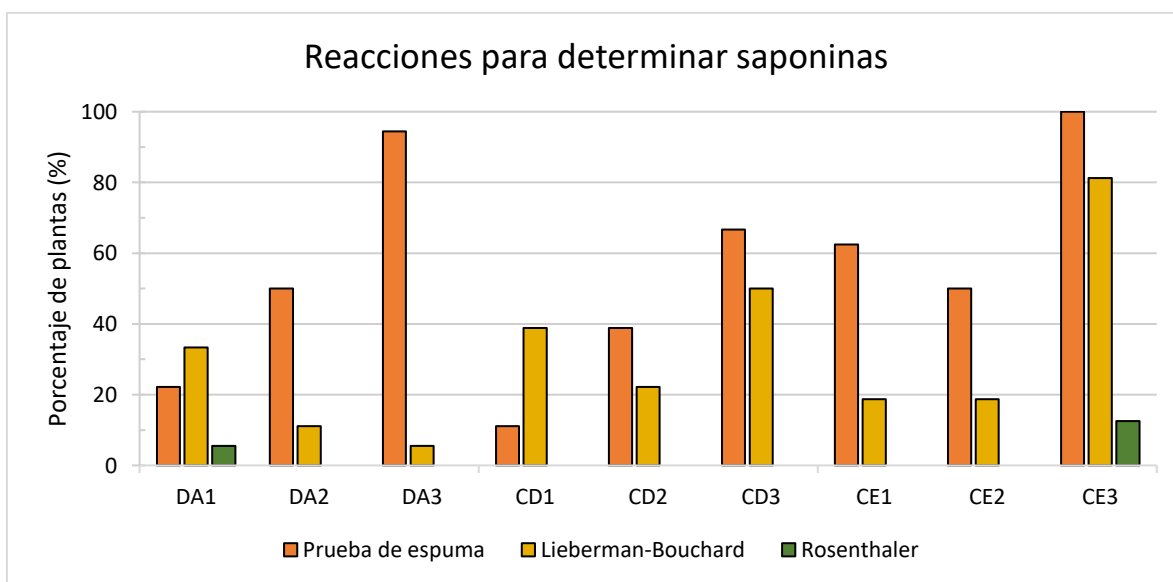


Figura 20. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron saponinas en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). Extracto etanólico de cinco días (1), extracto etanólico de 10 días (2) y extracto etanólico de 15 días (3).

3.4.8. Taninos

Si el extracto de la planta se realiza con etanol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. La reacción de gelatina es porque los taninos reaccionan con los grupos aminos libres de las gelatinas, lo cual modifica el sistema aromático que presentan los anillos polifenoles que se unen a la gelatina y los precipitada (Figura 21).

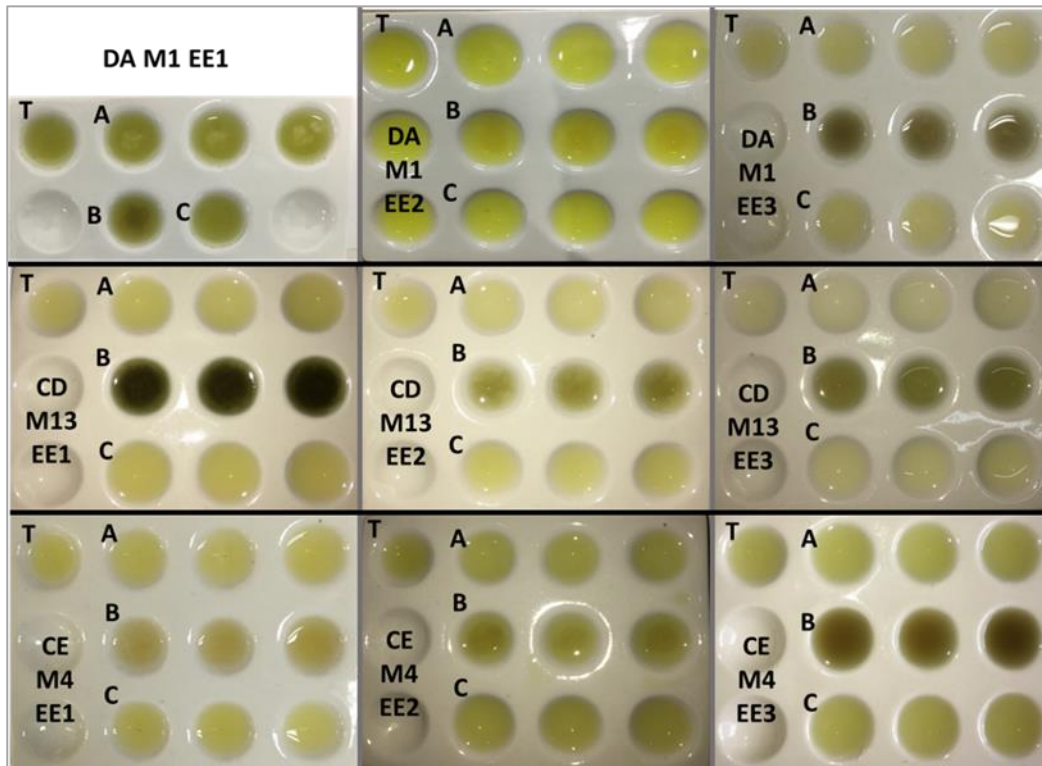


Figura 21. Ensayos químicos para determina taninos. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días. T= testigo. A=Reactivo de gelatina. B= Reacción de cloruro férrico. C= Ferrocianuro de potasio.

La reacción de cloruro férrico es usada también para determinar metabolitos fenolados, La reacción azul negruzca indica la presencia de taninos hidrolizables es decir los gálicos. Los taninos condensados dan precipitados pardo-verdoso tipo catecol. Las muestras resultaron positivas a este ensayo.

Los ensayos de ferricianuro de potasio al 1 %, con las sales férricas dan coloraciones negro-azuladas o verdosas. Produce un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco, e indica la presencia de tanino condensado, en este caso todas las muestras resultaron negativas para este ensayo, en la figura 22 se omite este ensayo por lo cual solo se observan

los resultados de las muestras que resultaron positivas para los reactivos de gelatina y cloruro férrico.

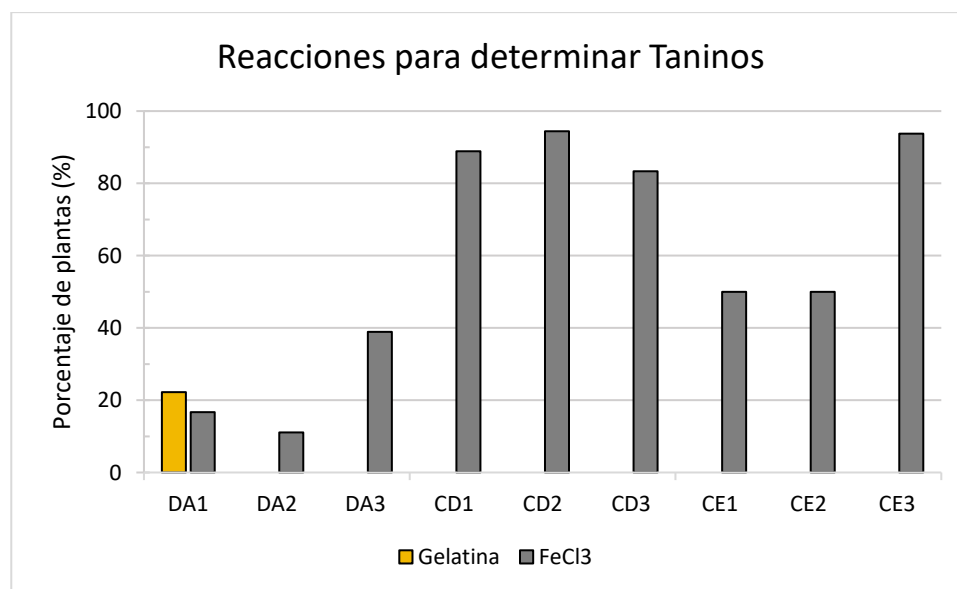


Figura 22. Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron taninos en los extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE) y *Fimbristylis cymosa* (FC). EE1=Extracto etanólico de 5 días. EE2= Extracto etanólico de 10 días. EE3=Extracto etanólico de 15 días.

3.4.9. Triterpenos

Los triterpenos son uno de los metabolitos más comunes que se pueden encontrar en las plantas, para ensayar las reacciones se usa la variante A de la reacción de Salkowski, la cual la coloración es de rojiza-grosella para saponinas triterpénicas y azul-verdosa para saponinas esteroidales. Todas las reacciones se basan en la reacción del colesterol con un ácido fuerte concentrado, formándose unas sustancias coloridas que son de color verde y sus iones (color rojo).

El ácido acético y el ácido anhídrido se utiliza como disolvente y deshidratante, mientras que ácido sulfúrico se utiliza como deshidratante y oxidante. Las sales de hierro (III) se usan para aumentar la reacción de color. Una coloración azul o verde indica la presencia de esteroides (figura 23); rojo, rosado o violeta = triterpenos; amarillo pálido = esteroides o triterpenos saturados.

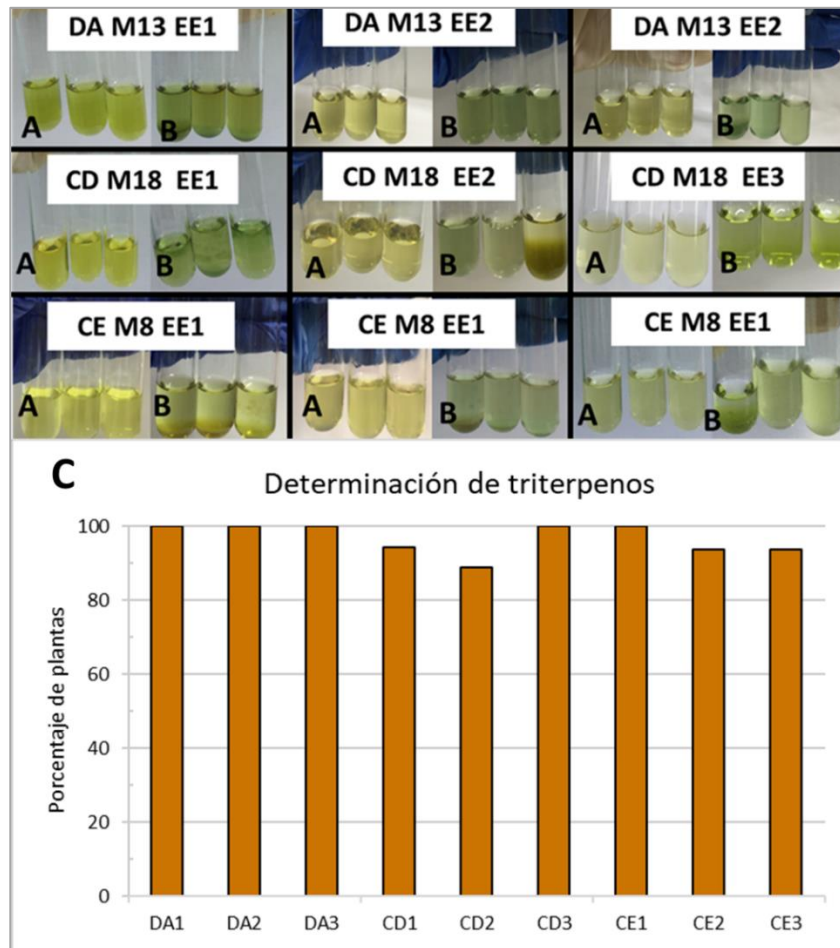


Figura 23. *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE). EE1=Extracto etanólico de 5 días (1). EE2= Extracto etanólico de 10 días (2). EE3=Extracto etanólico de 15 días (3). T= testigo. A= antes de la reacción. B= después de la reacción. C=Comparación de los porcentajes de plantas que presentaron triterpenos en los

extractos etanólicos de *Dactyloctenium aegyptium* (DA), *Cynodon dactylon* (CD), *Cenchrus echinatus* (CE).

Resultados de *Fimbristylis cymosa*

Esta planta fue la única que se recolectó, era una planta con apariencia de marchitez en sus inflorescencias, fue la única muestra que no presentó diferencia en la presencia de metabolitos en los tres extractos, los resultados del tamizaje fitoquímico se observan en la figura 24, al ser la única muestra se usó el sistema tradicional que es el sistema de cruces (Cuadro 6) para exhibir los resultados (Figura 24).

Cuadro 6. Resultado del tamizaje fitoquímico

Metabolito	Reacciones	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	++	++	++
	Hager	+++	++	++
Azúcares reductores	Fehling	+	++	++
	Benedict	+	+	++
	Ehrlich	+	+	+
	NH ₄ OH	-	-	-
Cumarinas	NaOH 10 %	++	++	++
	NaOH 5 %	+	+	-
	KOH 2 N	-	+	-
Flavonoides	Shinoda	++	+	+
	NaOH 10 %	+++	+++	+++
Glucósidos cardíacos	Keller-Killani	+	+	+
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-
Saponinas	Prueba de espuma	++	+++	+++
	Lieberman Bouchard	-	+	+
	Rosenthaler	-	-	-
	Gelatina	-	-	-
Taninos	FeCl ₃	+++	+++	+++
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-
Triterpenos		++	++	+++

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++) . Alta (+++).

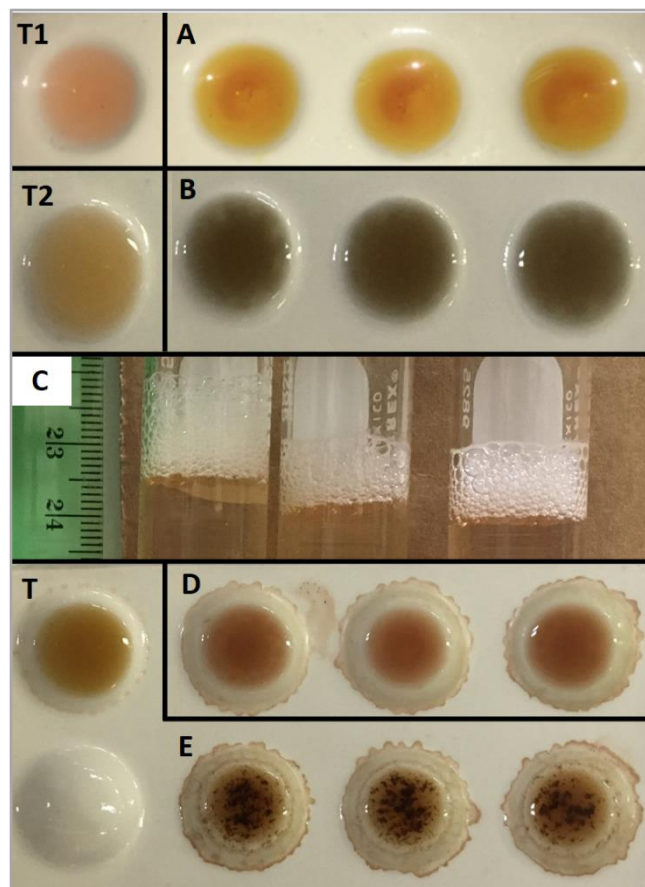


Figura 24. Ensayos químicos para determinar: A=Alcaloides (EE3). B=Taninos, reacción de cloruro férrico (EE1). C= Prueba de espuma (EE1). D=Cumarinas reacción de Ehrlich (EE2). E= Cumarinas reacción de NH_4OH (EE2). T= testigo (extracto etanólico).

Las gramíneas arvenses que se analizaron en este estudio no tienen importancia económica por lo cual no son consideradas para investigaciones, sin embargo, estas plantas están más exploradas en regiones de clima frío con la finalidad de analizar para determinar su producción de metabolitos y microorganismos que posiblemente participen en la síntesis de los compuestos químicos. El cuadro 7 presenta los metabolitos que previamente se han identificado en las gramíneas arvenses de climas tropicales a través de tamizaje fitoquímico y por HPLC en las plantas (mismas especies) que se analizaron en este trabajo.

Cuadro 7. Metabolitos secundarios identificados en gramíneas arvenses

Especies arvenses	Metabolito secundario		Referencia
<i>Dactyloctenium aegyptium</i> (Poaceae)	Saponinas	Antraquinonas	Janbaz y Saqib (2015)
	Glucósidos	Carbohidratos	Kumar <i>et al.</i> , (2015)
	Flavonoides	Terpenoides	Fatima <i>et al.</i> , (2018)
	Alcaloides	Proteínas	Rekha y Shivanna (2014)
	Taninos	Aminoácidos	Ahmed <i>et al.</i> , (2020) Naik <i>et al.</i> , (2016)
<i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)	Flavonoides	Triterpenoides	Al-Snafi (2016)
	Alcaloides	Saponinas	Balasundari y Boominathan (2018)
	Glucósidos	Taninos	Abdullah <i>et al.</i> , (2012)
	Terpenoides	Azúcares reductores	
<i>Cenchrus echinatus</i> (Poaceae)	Esteroides		
	Taninos	Quinonas	Hilario <i>et al.</i> , (2022)
	Alcaloides	Glucósidos	
<i>Fimbristylis cymosa</i> (Cyperaceae)	Flavonoides	Saponinas	Babu y Savithramma (2014)
	Glucósidos		

3.5. Conclusión

Las técnicas cromatográficas son muy útiles para la detección de fitoconstituyentes tanto cualitativamente como cuantitativamente. Sin embargo, cuando estas técnicas son no disponibles o inasequibles, la realización de pruebas de fitoquímica que son económicas, fáciles y requieren menos recursos, siguen siendo una buena opción para la descripción de la composición de los productos naturales.

Los resultados obtenidos en este trabajo conducen a fortalecer la hipótesis de la participación de los metabolitos secundarios en los mecanismos de defensa observados en las especies estudiadas. Así, se identificaron grupos de compuestos químicos con potencial bioplaguista como son los alcaloides y las saponinas ampliamente descritos como controladores de insectos y microorganismos, debido a su estructura química capaz de romper la capa lipídica que los protege. No podemos concluir cual especie es mejor para producir metabolitos debido a que no todas las muestras presentaron sus resultados diferentes, lo que se atribuye a su tipo de suelo, por ejemplo las misma intensidad de las coloraciones o precipitaciones entre

muestras eran diferentes, también sería interesante analizar procesos de estandarización para extraer los metabolitos, los factores que están involucrados en la presencia de los metabolitos en los extractos, esto porque se observó que en el extracto etanólico de 10 días no se presentaron metabolitos como los alcaloides y en los extractos de cinco días y de 15 días si resultaron positivos, no se puede atribuir al almacenamiento porque se infiere que los extractos de más días resultaran negativos y resultaron positivos, caso contrario paso con los flavonoides que a mayor días de maceración las intensidades de color de los ensayos químicos fueron menores. Además, se requiere la realización de pruebas específicas y complejas para aislar e identificar las moléculas presentes en el material vegetal analizado.

3.6. Referencias

- Abdullah, S., Gobilik, J., & Chong, K. P. (2012). Preliminary phytochemical study and antimicrobial activity from various extract of *Cynodon dactylon* (L.) Pers.(Bermuda) against selected pathogens. *Int J Pharm Sci*, 4(5), 227-230.
- Ahmed, M. I., Xu, X., Sulieman, A. A., Mahdi, A. A., & Na, Y. (2020). Effect of extraction conditions on phenolic compounds and antioxidant properties of koreeb (*Dactyloctenium aegyptium*) seeds flour. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 799-808.
- Al-Snafi, A. E. (2016). Chemical constituents and pharmacological effects of *Cynodon dactylon*-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(7), 17-31.
- Babu, H. R., & Savithramma, N. (2014). Screening of secondary metabolites of underutilized species of Cyperaceae. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 24, 182-187
- Balasundari, T., & Boominathan, M. (2018). Screening of bioactive compounds by GC-MS, antimicrobial activity and In silico studies in *Cynodon dactylon* L. Pers leaves. *World Journal of Science and Research*, 3(1), 07-15.

- Barba, J. 1997. Introducción al análisis de productos naturales; laboratorio de fitoquímica. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Benedict, S. R. (1909). A reagent for the detection of reducing sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 5(5), 485-487.
- Clay, K. (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual review of Ecology and Systematics*, 21(1), 275-297.
- Domínguez, X.A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Ed. Limusa, México.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3), 225–276.
- Fatima, I., Kanwal, S., & Mahmood, T. (2018). Evaluation of biological potential of selected species of family Poaceae from Bahawalpur, Pakistan. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 27. doi:10.1186/s12906-018-2092-1
- Fehling, H. (1849). Die quantitative Bestimmung von Zucker und Stärkmehl mittelst Kupfervitriol. *Annalen Der Chemie Und Pharmacie*, 72(1), 106–113.
- Harborne, B.J. 1984. *Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis*, 2a edition, Chapman and Hall, New York.
- Hilario, C. B. C., Arroyo Acevedo, J. L., Bedoya Castillo, M. P., Lázaro Huamán, B. A., Mendoza Chávez, K. E., & Cisneros Hilario, E. J. (2022). Seguridad y efecto protector de *Cenchrus Echinatus* en el cáncer de mama inducido en *Rattus*. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 22(3), 452-462.
- Janbaz, K. H., & Saqib, F. (2015). Pharmacological evaluation of *Dactyloctenium aegyptium*: An indigenous plant used to manage gastrointestinal ailments. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(2), 295-302.

- Kumar, V., Rauf, F. B., Sulthana, B., Satish, M. K., & Mangilal, T. (2015). Evaluation of antimicrobial activity of ethanolic extract of *Dactyloctenium aegyptium*. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 5(12), 338-343.
- Naik, B. S., Dangi, N. B., Sapkota, H. P., Wagle, N., Nagarjuna, S., & Sankaranand, R. (2016). Phytochemical screening and evaluation of anti-fertility activity of *Dactyloctenium aegyptium* in male albino rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(1), 51-57
- Rekha, D., & Shivanna, M. B. (2014). Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of fungal endophytes in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. and *Dactyloctenium aegyptium* (L.) P. Beauv. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(8), 573-591
- Ringuelet, J. A. and S. Z. Viña (2013). Introducción a los productos naturales vegetales. Compuestos fenólicos. Terpenoides. Intervención de los compuestos secundarios en las interacciones biológicas. En: *Productos naturales vegetales*, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 7, 66, 78, 91, 105, 109, 122, 191-239.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.
- Taiz, L. and E. Zeiger (2002). *Secondary Metabolites and Plant Defense*. In: *Plant Physiology*, Sunderland, MA. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 283-307.
- Trease, G.E. 1986. *Tratado de Farmacognosia*, 12ª edición, EMALSA, S.A. México, D.F

Capítulo 4 Conclusión

Las gramíneas arvenses están adaptadas a ambientes inhóspitos, produciendo metabolitos secundarios que favorecen su resistencia a factores bióticos y abióticos. Por tanto, su análisis puede ayudar a comprender su ecología y prospearlas como fuente de bioplaguicidas para la agricultura orgánica.

En este estudio, se identificaron los grupos químicos de metabolitos secundarios presentes en tres especies de gramíneas arvenses tropicales: *Cenchrus echinatus*, *Dactyloctenium aegyptium*, *Distichils spicata* y en la planta *Fimbristylis cymosa*. Considerando que la síntesis de compuestos químicos podría estar influenciada por microorganismos, este estudio establece información relevante de bioprospección para futuros trabajos para la búsqueda de microorganismos endófitos como fuentes inductoras de compuestos bioactivos con propiedades biológicas de utilidad en la agricultura, así como para la realización de investigaciones de expresión y regulación de genes involucrados con la síntesis de dichos metabolitos secundarios, para el control biológico de cultivos.

Capítulo 5 Anexo

Cuadro 8. Protocolo de tamizaje fitoquímico

Metabolito secundario	Método de identificación	Referencia
Alcaloides	A 10 ml del EEE se le adicionó 5 ml de HCl al 10 %, se calentó a ebullición, se enfrió y se filtró. El filtrado se dividió (se dejó una muestra como testigo) y se ensayaron las reacciones de: Dragendorff (Coloración o precipitación naranja/rojizo, marrón) Reactivo de Hager (Coloración amarilla y/o formación de cristales)	Barba, 1997; Domínguez, 1973
Azúcares reductores	Se tomaron 7 ml del EEE, se ajusta el pH a 11 con NaOH 10 % y se realizaron los ensayos de: Reacción de Fehling (Precipitado rojo) Reacción de Benedict (Precipitado o color verde/amarillo/rojo) Por cada reacción se preparó un blanco (reacciones sin muestra EEE=testigo)	Benedict, 1909; Fehling, 1849
Cumarinas	Se tomaron 1 ml del EEE para cada reacción. Testigo=EEE. Reacción de Ehrlich (Coloración naranja) Reacción de NH ₄ OH (Fluorescencia azul-violeta) Reacciones con soluciones alcalinas (puntos fluorescentes bajo luz UV)	Domínguez, 1973
Flavonoides	Se tomaron 1 ml del EEE para cada reacción. Testigo=EEE. Reacción de Shinoda (coloración naranja/roja/magenta) Reacción de NaOH 10 % (coloración amarilla/naranja/purpura/azul/café)	Barba, 1997; Harbone, 1989; Domínguez, 1973
Glucósidos cardíacos	Se tomaron 50 µl del EEE, se agregaron 200 µL de una solución de CH ₃ COOH con gotas de FeCl ₃ al 5 %, se agregaron 60 µl de H ₂ SO ₄ (Coloración aparición de un anillo marrón en la interface) Testigo=EEE. Reacción de Keller-Killani	Singh y Kumar, 2017; Nanna <i>et al.</i> , 2013
Quinonas	Se tomaron 1 ml del EEE para cada reacción. Testigo=EEE. Reacción NH ₄ OH (Coloración roja) Reacción H ₂ SO ₄ (Coloración roja)	Rondón <i>et al.</i> , 2018
Saponinas	Se tomaron 1 ml del EEE para cada reacción. Testigo=EEE. Prueba de altura y estabilidad de espuma Reacción de Lieberman Bouchard (Coloración Azul/verde/rosa/roja/magenta o violeta) Reacción de Rosenthaler (coloración violeta)	Barba, 1997; Domínguez, 1973)
Taninos	A 1 ml de EEE se agregó 2 ml de agua destilada y tres gotas de NaCl al 2 %, se calentó a ebullición por un minuto, se enfrió y se filtró. El filtrado se dividió, se dejó un testigo y se realizaron los ensayos de: Reactivo de gelatina (Precipitado blanco) Reactivo de FeCl ₃ al 1% (Coloración azul a negro, verde) Reactivo de C ₆ FeK ₄ N ₆ al 1% (Coloración azul)	Trease y Evans, 1987; Domínguez 1973
Triterpenos	Se tomaron 1 ml del EEE para cada reacción. Cloroformo, anhídrido acético y H ₂ SO ₄ (colores rojos, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase de la reacción indican que la prueba es positiva.	Barba, 1997; Domínguez, 1973

Cuadro 9. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Dactyloctenium aegyptium* muestras 1-6

Metabolito secundario	Reacciones	M 1			M 2			M 3			M 4			M 5			M 6		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	+	-	++	++	-	+	+	-	+	++	+	++	++	+	+	++	+	+
	Hager	++	-	++	++	-	++	+	-	+	++	-	++	++	-	+	++	-	+
Flavonoides	Shinoda	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	++	++	++	++	++	+	++	+	+	++	++	++	++	+	++	-	+	+
Azúcares reductores	Fehling	+	+	++	++	++	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	++	+
	Benedict	+	+	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++
Saponinas	Prueba de espuma	-	+	+	-	+	++	-	+	+	+	-	++	-	-	+	-	-	++
	Lieberman	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Bouchard																		
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	++	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	FeCl3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+++	-	+	-	+	+	+
	NaOH 5 %	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+++	-	+	+	+	+	+
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	Triterpenos	++	+	++	++	+	+	++	+	+	++	+	++	++	+	++	++	++	++

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++). Alta (+++).

Cuadro 10. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Dactyloctenium aegyptium* muestras 7-12

Metabolito secundario	Reacciones	M 7			M 8			M 9			M 10			M 11			M 12		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	++	+	++	++	-	+	++	-	+	+	-	++	+	-	++	+	-	+
	Hager	++	-	++	++	-	++	++	-	+++	-	-	++	-	-	++	-	-	++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
	NaOH 10 %	+	+	++	+	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
Azúcares reductores	Fehling	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+
	Benedict	+	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
Saponinas	Prueba de espuma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NE	-	-	NE	-	+	NE	-	+
	Lieberman	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bouchard	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-
	FeCl3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	NaOH 5 %	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	KOH 2 N	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Triterpenos		++	+	++	+	+	+	++	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++). Alta (+++). NE (no ensayado).

Cuadro 11. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Dactyloctenium aegyptium* muestras 13-18

Metabolito secundario	Reacciones	M 13			M 14			M 15			M 16			M 17			M 18		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+	+	-	+	+	-	+	++	+	++	+	+	++	+	+	++
	Hager	-	+	+++	+	-	+++	++	-	+++	+	-	++	+	-	++	-	+	++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
	NaOH 10 %	++	+	++	++	+	++	++	+	++	+	++	++	+	++	++	+	++	++
Azúcares reductores	Fehling	+	+	+	++	+	+	+	+	++	++	+	+	++	+	++	++	+++	++
	Benedict	++	++	+	++	++	++	+	+	-	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	++
Saponinas	Prueba de espuma	NE	-	+	NE	+	+	NE	+	+	NE	-	++	NE	++	+	NE	-	+
	Lieberman	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bouchard	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-
	FeCl3	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-
	Ferrocianuro de potasio	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	+	-	+	+	++	+	+	++	+	+	++	++	++	+	-	++	+	
	NaOH 5 %	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	++	+	+	++	+	
	KOH 2 N	-	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++	++	-	-	++	-
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	-	+	-	-	+	-	-	++	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Triterpenos		++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++). Alta (+++). NE (no ensayado).

Cuadro 12. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Cynodon dactylon* muestras 1-6

Metabolito secundario	Reacciones	M 1			M 2			M 3			M 4			M 5			M 6		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	+	++	++	++	+++	++	++	+++	++	-	++	+	+	+	++	+	++	
	Hager	+++	-	+	+++	++	++	+++	++	+	+++	+	+	+++	+	++	+++	++	+
Flavonoides	Shinoda	+	+++	+	-	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	NaOH 10 %	++	+	++	-	++	++	+	++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	
Azúcares reductores	Fehling	+	+	++	+	++	+++	-	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++
	Benedict	+	++	++	+	++	+++	+	++	++	++	+	++	++	+	++	++	+	++
Saponinas	Prueba de espuma	+	+	++	+	-	+	-	+	++	-	+	+	-	+	+	-	+	
	Lieberman	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
	Bouchard																		
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	FeCl3	+	+	+++	+	+	+	+	-	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H ₂ SO ₄	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE		
	NaOH 10 %	+	+	+++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	
	NaOH 5 %	+	+	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	KOH 2 N	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	
Triterpenos		+	++	++	+	++	++	+	++	++	-	-	+	+	+	+	+	+	

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++). Alta (+++). NE (no ensayado).

Cuadro 13. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Cynodon dactylon* muestras 7-12

Metabolito secundario	Reacciones	M 7			M 8			M 9			M 10			M 11			M 12			
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	
Alcaloides	Dragendorff	+	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	+	+	+	+	+	+
	Hager	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Flavonoides	Shinoda	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
	NaOH 10 %	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Azúcares reductores	Fehling	+	+	++	++	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	
	Benedict	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
Saponinas	Prueba de espuma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	+	-	
	Lieberman	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Bouchard	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Taninos	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	FeCl3	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	+	-	-	+	-	-	+	-	
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	NaOH 10 %	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
	NaOH 5 %	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	KOH 2 N	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Triterpenos		+	-	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++) . Alta (+++). NE (no ensayado).

Cuadro 14. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Cynodon dactylon* muestras 13-18

Metabolito secundario	Reacciones	M 13			M 14			M 15			M 16			M 17			M 18		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	++	+	-	++	++	-	++
	Hager	+	+	++	+	+	++	++	+	+	++	-	++	+	-	++	++	-	+
Flavonoides	Shinoda	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	++	++	+	++	++	+	+	++	+
	NaOH 10 %	+	++	+	+	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	++	+	++
Azúcares reductores	Fehling	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	Benedict	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+++	+++	++	++	++	++
Saponinas	Prueba de espuma	NE	-	+	NE	-	+	NE	-	+	NE	+	+	NE	-	+	NE	-	+
	Lieberman	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	Bouchard	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FeCl3	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	++
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	+	++	+	+	+	+	-	++	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
	NaOH 5 %	-	+	-	+	++	-	+	+	+	+	+++	+	++	++	+	+	+++	+
	KOH 2 N	+	+	-	+	+	-	-	++	+	+	++	+	+	++	-	+	++	+
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	
Triterpenos		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++). Alta (+++). NE (no ensayado).

Cuadro 15. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Cenchrus echinatus* muestras 1-6

Metabolito secundario	Reacciones	M 1			M 2			M 3			M 4			M 5			M 6		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	+++	+	++	+++	+	+++	+++	+	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++
	Hager	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+
Flavonoides	Shinoda	+	+	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
	NaOH 10 %	++	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Azúcares reductores	Fehling	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	++	++	+	++	++	+	++
	Benedict	++	++	++	++	++	++	++	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Saponinas	Prueba de espuma	+++	+	++	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lieberman	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	Bouchard	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FeCl3	+	+	++	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	++	+	+	++	++	++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
	NaOH 5 %	+++	++	+	+++	+	+	+	++	-	+	+	+	++	+	+	++	+	++
	KOH 2 N	-	++	-	++	++	+	++	-	-	++	+	+	++	+	-	++	+	-
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos		+	+	+	++	++	+	+	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++). Alta (+++).

Cuadro 16. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Cenchrus echinatus* muestras 7-12

Metabolito secundario	Reacciones	M 7			M 8			M 9			M 10			M 11			M 12		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	+	-	+++	-	-	++	+	-	++	++	-	+++	++	-	+++	+	-	++
	Hager	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	++	+	-	+	+
	NaOH 10 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	++	-	-	+	-
Azúcares reductores	Fehling	++	++	++	+	++	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
	Benedict	++	++	++	++	++	-	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Saponinas	Prueba de espuma	+	+	+	+	+	++	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
	Lieberman	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bouchard																		
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FeCl3	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+
	NaOH 5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+
	KOH 2 N	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-*	+	-	+	+	-	+	+	+
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Triterpenos		++	+	++	+	++	+	+	++	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++) . Alta (+++).

Cuadro 17. Resultado del tamizaje fitoquímico de *Cenchrus echinatus* muestras 13-16

Metabolito secundario	Reacciones	M 13			M 14			M 15			M 16		
		EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3	EE1	EE2	EE3
Alcaloides	Dragendorff	+	+	++	+	+	+++	+	+	+++	+	-	++
	Hager	+	+	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	NaOH 10 %	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Azúcares reductores	Fehling	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+++	+	++
	Benedict	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++
Saponinas	Prueba de espuma	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
	Lieberman	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
	Bouchard												
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FeCl3	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
	Ferrocianuro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cumarina	Ehrlich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH ₄ OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 %	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	++	++
	NaOH 5 %	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+
	KOH 2 N	+	+	-	+	+	+	+	++	+	+	++	+
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
Triterpenos		++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+

Nota: EE1: maceración de 5 días. EE2: maceración de 10 días. EE3 maceración de 15 días. Presencia del metabolito: Ausente (-). Baja (+). Moderado (++). Alta (+++).