

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



"Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana y antioxidante de *Chenopodium graveolens* (Willd)"

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

Lluvia Esmeralda Félix Rodríguez

Tijuana, B.C.

Enero 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 043

Tijuana, Baja California, a 09 de enero de 2020

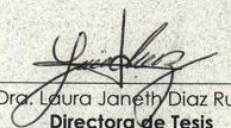
C. Lluvia Esmeralda Felix Rodriguez
Pasante de Química Farmacobiólogo
Presente:

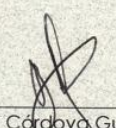
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
opción de Tesis

Es propuesto, por la Dra. Laura Janeth Díaz Rubio y el Dr. Iván Córdova Guerrero quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana y antioxidante de *Chenopodium graveolens* (Willd)" el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

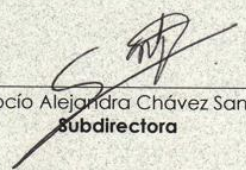
- I.- RESUMEN
- II. INTRODUCCIÓN
- III. PARTE EXPERIMENTAL
- IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V. CONCLUSIONES
- VI. REFERENCIAS
- VII. ANEXOS




Dra. Laura Janeth Díaz Rubio
Directora de Tesis


Dr. Iván Córdova Guerrero
Co- Director de Tesis


Dr. José Luis González Vázquez
Director


Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscay
Subdirectora

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a la Facultad de Ciencias Química e Ingeniería por permitirme desarrollarme como alumna para la formación de mi carrera profesional.

Al Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana (ITT), la Universidad Xochicalco y al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por abrirme las puertas para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi comité de tesis, la Dra. Berenice Vargas, la Dra. Lilia Angélica Hurtado, la Dra. Laura Díaz Rubio y Dr. Iván Córdova por sus consejos durante la ejecución de los experimentos y por todas esas enseñanzas brindadas.

A mis maestros por darme las herramientas y los conocimientos durante toda la carrera, así como el gusto por la investigación.

A Dios por haberme cuidado y guiado todos estos días y dado la esperanza que por más difícil que sea el camino no debemos rendirnos.

A mi familia, por su apoyo, sus consejos y sobre todo su paciencia hacia mí en los momentos más estresantes.

A mi novio Josué, por tu apoyo incondicional y amor, por las risas, los momentos de estrés y por salvarme de los fantasmas del laboratorio cuando tenía que ir yo sola a hacer experimentos.

A mis amigos, por apoyarme cuando decidí iniciar mi tesis, por comprender que muchas veces no podía pasar con ustedes porque tenía algún experimento pendiente.

A la Dra. Laura Díaz y al Dr. Iván Córdova por enseñarme e inculcarme la importancia de la investigación de los productos naturales, por permitirme ser parte de su grupo de investigación y sobre todo por estar a mi lado para la resolución de dudas, o nuevos retos presentados durante la ejecución de esta investigación.

Al Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales por formar parte de mi vida, A mis compañeros y amigos por los momentos brindados dentro del laboratorio a Víctor, Arturo, Eduardo, Rocío, Ana, Denise, Tania, Andrés, Diana, Manuel, Andrea, por la convivencia, los consejos, por su apoyo, sus enseñanzas y regaños, por todo eso y más gracias.

RESUMEN

Chenopodium graveolens es una planta olorosa originaria de México utilizada principalmente para tratar la diarrea, además de usarlo como desparasitante, como tratamiento para la disentería, la indigestión, la bilis, el empacho, el vómito; también como antiespasmódico y analgésico para trastornos gastrointestinales como el dolor de estómago. Es por eso que este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano de *Chenopodium graveolens* (Willd.) frente a cepas bacterianas y fúngicas de interés farmacológico, así como su actividad antioxidante.

Entre los resultados antioxidantes se obtuvo que el extracto de la partición de acetato de etilo presenta mejor actividad antioxidante en las técnicas de DPPH y ABTS al tener una CE_{50} de 0.0903 mg/ml y 0.9961 mg/ml respectivamente así como un alto contenido de polifenoles totales.

En la evaluación antimicrobiana no se presenta actividad por parte del extracto crudo y sus particiones frente a las cepas evaluadas.

Por otro lado de logro el aislamiento y caracterización de 2 componentes aislados de la partición de acetato de etilo, estos fueron caracterizados por las técnicas de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y espectrometría de resonancia magnética nuclear siendo estos 5-hidroxi-7-metoxi-2-fenilcroman-4-ona (Pinostrobin) y 2H-cromen-2-ona (Cumarina).

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	IV
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XIV
ÍNDICE DE ECUACIONES	XIV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XIV
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XV
1.INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVO GENERAL.....	7
4. GENERALIDADES	9
5. METODOLOGÍAS	15
5.1. GENERACIÓN DE EXTRACTOS	16
5.2. PERFIL FITOQUÍMICO CUALITATIVO POR PRUEBAS DE COLORIMETRÍA Y CCF	20
5.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	24
5.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	30
5.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	33
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
6.1. GENERACIÓN DE EXTRACTOS	41
6.2. PERFIL FITOQUÍMICO CUALITATIVO POR PRUEBAS DE COLORIMETRÍA Y CCF	42
6.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	46
6.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	54
6.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	58
7. CONCLUSIONES.....	68
8. BIBLIOGRAFIA	70
9. APÉNDICES.....	74
9.1 ANEXOS.....	75
9.2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES	86

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>CHENOPODIUM GRAVEOLENS</i> .	10
FIGURA 2. MATERIAL VEGETAL....	23
FIGURA 3. PRIMER DÍA DE MACERACIÓN	16
FIGURA 4. ÚLTIMO DÍA MACERACIÓN	23
FIGURA 5. ELIMINACIÓN DE SOLVENTE EN ROTAVAPOR.....	16
FIGURA 6. PARTICIÓN HEXÁNICA.	24
FIGURA 7. SECADO DE PARTICIÓN HEXÁNICA.	17
FIGURA 8. PARTICIÓN CON ACETATO DE ETILO.....	25
FIGURA 9. ELIMINACIÓN DE ACETATO DE ETILO.....	18
FIGURA 10. PARTICIÓN ACUOSA.....	25
FIGURA 11. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ACUOSO.	19
FIGURA 12. DIAGRAMA DE PARTICIÓN.....	19
FIGURA 13. CCF EXTRACTOS SIN REVELAR.....	28
FIGURA 14. CCF EXTRACTOS REVELADO CON VAINILLINA.....	21
FIGURA 15. REACCIÓN DE ACETILACIÓN.	29
FIGURA 16. EVOLUCIÓN DE REACCIÓN DE ACETILACIÓN.....	22
FIGURA 17. LAVADO ÁCIDO DEL CRUDO DE LA REACCIÓN.....	29
FIGURA 18. LAVADOS CON CuSO_4	23
FIGURA 19. CEPA B-1.	31
FIGURA 20. CEPA B-2.	24
FIGURA 21. CEPA B-3	24
FIGURA 22. TINCIÓN GRAM B-1.	32
FIGURA 23. TINCIÓN GRAM B-2	25
FIGURA 24. TINCIÓN GRAM B-3	25
FIGURA 25. PLACA DE BBL CRYSTAL.....	26
FIGURA 26. DILUCIÓN DE EXTRACTOS.....	26
FIGURA 27. IMPREGNACIÓN DE DISCOS.....	27
FIGURA 28. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES.	30
FIGURA 29. INICIO DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA.	33
FIGURA 30. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LA REUNIÓN 6.	34
FIGURA 31. CCF REUNIÓN 8 CON <i>N</i> -HEXANO/ACETATO DE ETILO AL 30%	35
FIGURA 32. SEGUIMIENTO DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3.....	36
FIGURA 33. DIAGRAMA DE FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO.	37
FIGURA 34. 2DO RECORRIDO EXTRACTOS REVELADO VAINILLINA	43
FIGURA 35. CCF <i>N</i> -HEXANO/ACETATO DE ETILO 30%.	51
FIGURA 36. CCF <i>N</i> -HEXANO/ACETATO DE ETILO 50%	44
FIGURA 37. ESPECTRO INFRARROJO DE EXTRACTO ACUOSO.....	44
FIGURA 38. ESPECTRO INFRARROJO REACCIÓN 1 ACETILACIÓN.	45
FIGURA 39. ESPECTRO INFRARROJO REACCIÓN 2 ACETILACIÓN.	45
FIGURA 40. ANTIBIOGRAMA CONTROL DE B-1: <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	46
FIGURA 41. ANTIBIOGRAMA CONTROL DE B-2: <i>STAPHYLOCOCCUS WARNERI</i> .	47
FIGURA 42. ANTIBIOGRAMA CONTROL DE B-3: <i>AEROCOCCUS URINAE</i> .	47
FIGURA 43. B-1 VS EXTRACTO 000.....	55
FIGURA 44. B-1 VS EXTRACTO 001.....	48

FIGURA 45. B-1 VS EXTRACTO 002.....	55
FIGURA 46. B-1 VS EXTRACTO 003.....	48
FIGURA 47. B-2 VS EXTRACTO 000.....	56
FIGURA 48. B-2 VS EXTRACTO 001.....	49
FIGURA 49. B-2 VS EXTRACTO 002	56
FIGURA 50. B-2 VS EXTRACTO 003.....	49
FIGURA 51. B-3 VS EXTRACTO 000.....	57
FIGURA 52. B-3 VS EXTRACTO 001.....	50
FIGURA 53. B-3 VS EXTRACTO 002.....	57
FIGURA 54. B-3 VS EXTRACTO 003.....	50
FIGURA 55. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	52
FIGURA 56. <i>CANDIDA ALBICANS</i>	52
FIGURA 57. <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	52
FIGURA 58. <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i>	53
FIGURA 59. <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i>	53
FIGURA 60. CRISTAL REUNIÓN 4.....	66
FIGURA 61. PRECIPITADO REUNIÓN 11.....	59
FIGURA 62. CROMATOGRAMA REVELADO EN OLEUM.	59
FIGURA 63. CCF R4 Y EL CRISTAL AISLADO	60
FIGURA 64. ACOPLAMIENTOS COSY DE PD-1.....	62
FIGURA 65. ACOPLAMIENTOS HMBC DE PD-1.	63
FIGURA 66. ACOPLAMIENTOS HMBC DE PD-1.	63
FIGURA 67. ESQUELETO Y NUMERACIÓN DE LA CUMARINA	65
FIGURA 68. CROMATOGRAMA DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE REUNIÓN 8.	67

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>CHENOPODIUM GRAVEOLENS</i> .	11
TABLA 2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN CON N-HEXANO.	17
TABLA 3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN CON ACETATO DE ETILO.	18
TABLA 4. PRUEBAS COLORIMÉTRICAS.	20
TABLA 5. DISOLUCIÓN DE EXTRACTOS PARA DILUCIONES.	26
TABLA 6. CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO PARA ANTIBIOGRAMA.	27
TABLA 7. ANTIBIÓTICOS CONTROL PARA GRAM POSITIVO.	28
TABLA 8. ANTIBIÓTICOS CONTROL PARA GRAM NEGATIVO.	28
TABLA 9. ELUCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.	33
TABLA 10. ELUCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE LA REUNIÓN 6.	34
TABLA 11. GRADIENTES DE SOLVENTE UTILIZADOS EN LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3.	36
TABLA 12. DATOS ESPECTROMÉTRICOS PINOSTROMBINA.	38
TABLA 13. DATOS ESPECTROMÉTRICOS CUMARINA.	39
TABLA 14. DATOS FÍSICOS DE LOS EXTRACTOS.	41
TABLA 15. EVALUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EPAZOTE Y SUS PARTICIONES.	42
TABLA 16. ANTIBIÓTICOS CONTROL B-1: <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	46
TABLA 17. ANTIBIÓTICOS CONTROL DE B-2: <i>STAPHYLOCOCCUS WARNERI</i> .	47
TABLA 18. ANTIBIÓTICOS CONTROL DE B-3: <i>AEROCOCCUS URINAE</i> .	47
TABLA 19. RESULTADOS ANTIMICROBIANOS PRELIMINARES.	51
TABLA 20. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	51
TABLA 21. RESULTADOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO CRUDO.	54
TABLA 22. RESULTADOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO ACUOSO.	54
TABLA 23. RESULTADOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.	54
TABLA 24. RESULTADOS POLIENOLES DEL EXTRACTO HEXÁNICO.	55
TABLA 25. RESULTADOS POLIFENOLES.	55
TABLA 26. RESULTADOS DE EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH.	56
TABLA 27. RESULTADOS EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE ABTS.	57
TABLA 28. PESO REUNIONES COLUMNA 1.	58
TABLA 29. PRODUCTOS OBTENIDOS DE LAS REUNIONES 4,9 Y 11.	60
TABLA 30. DATOS DE RMN ^1H DEL COMPUESTO (PD-1) REALIZADOS EN CDCl_3 .	61
TABLA 31. DATOS DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO (PD-1) REALIZADOS EN CDCl_3 .	62
TABLA 32. DATOS DE RMN ^1H , ^{13}C Y CORRELACIONES COSY, HSQC Y HMBC DEL COMPUESTO (PD-1) REALIZADOS EN CDCl_3 .	64
TABLA 33. PESOS DE REUNIONES DE COLUMNA 2.	65
TABLA 34. DATOS DE RMN ^1H , ^{13}C Y CORRELACIONES HSQC Y HMBC DEL COMPUESTO (PD-2) REALIZADOS EN CDCl_3 .	66
TABLA 35. PESOS DE REUNIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3.	67

ÍNDICE DE GRÁFICAS, ECUACIONES Y ANEXOS

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. POLIFENOLES PRESENTES EN <i>CHENOPODIUM GRAVEOLENS</i>	55
GRÁFICA 2. DPPH DE <i>CHENOPODIUM GRAVEOLENS</i>	56
GRÁFICA 3. ABTS DE <i>CHENOPODIUM GRAVEOLENS</i>	57

ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH.	31
ECUACIÓN 2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. ESPECTRO INFRARROJO DE PARTICIÓN ACUOSA.....	76
ANEXO 2. ESPECTRO INFRARROJO DE REACCIÓN 1 DE ACETILACIÓN.	76
ANEXO 3. ESPECTRO DE INFRARROJO DE REACCIÓN 2 DE ACETILACIÓN.	76
ANEXO 4. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE REACCIÓN 1 DE ACETILACIÓN.	77
ANEXO 5. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE REACCIÓN 2 DE ACETILACIÓN.	77
ANEXO 6. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE PD-1.	78
ANEXO 7. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE PD-2.	78
ANEXO 8. ESPECTRO DE RMN BIDIMENSIONAL DE PD-1.....	79
ANEXO 9. ESPECTRO DE RMN PD-1	80
ANEXO 10. ESPECTRO RMN BIDIMENSIONAL PD-2	83
ANEXO 11. ESPECTRO DE RMN PD-2.	84

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C= grado centígrado

ABTS= 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico.

Ac=Extracto acuoso

B. C. = Baja California

CCF =Cromatografía de capa fina

CE50= Concentración efectiva media.

CuSO₄= sulfato cúprico

DMSO= Dimetil sulfoxido

DPPH= 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

g= Gramos

h= hora

HCl= ácido clorhídrico

L= Litros

mg=miligramo

mL=mililitros

nm= nanómetro

NM= No Medible

PBS= Phosphate Buffered Saline= Tampon fosfato salino

pH=potencial de hidrogeno

REP= Repetición

rxn= reacción

SMX/TMP= Trimetoprima con Sulfametoxazol

µg=microgramo

µL=microlitro

1. INTRODUCCIÓN

La Farmacognosia es una ciencia que se encarga de estudiar la historia, el cultivo, la recolección, preparación, preservación, comercialización, distribución, identificación y evaluación de los componentes químicos de origen natural. Adicionalmente, también se encarga del estudio y del uso tradicional de esos compuestos químicos o sus derivados y proporciona los elementos necesarios para determinar su actividad farmacológica y mejorar la salud y el bienestar del ser humano y otros animales. La farmacognosia no sólo se enfoca al estudio de sustancias con efectos terapéuticos *per se*, sino también de moléculas que sirvan como modelo estructural para la síntesis de nuevos compuestos más potentes; así como de materias primas para los procesos de hemisíntesis y obtener sustancias activas como hormonas esteroides, anestésicos locales y antibióticos; además de enfocarse también a la búsqueda de sustancias naturales que pueden ser aplicadas en la industria en general.(Cortez-Gallardo *et al.*, 2004)

La palabra farmacognosia etimológicamente significa “conocimiento de los fármacos”. Proviene del griego *pharmakon* que significa remedio y *gnosis* que quiere decir conocimiento.(Cortez-Gallardo *et al.*, 2004)

De manera general, la farmacognosia a través de la búsqueda y el aislamiento de nuevos principios activos con aplicación terapéutica, proporciona herramientas firmes para el progreso de otras ciencias como la farmacología, donde ha contribuido en gran parte al desarrollo de nuevos y potentes fármacos para el tratamiento de enfermedades que anteriormente carecían de un tratamiento adecuado. Estas investigaciones han adquirido tal magnitud que hoy en día representan un objetivo primordial en la lucha contra enfermedades “de moda” como la depresión, el cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), entre otras, mediante el uso de principios activos obtenidos de sustancias naturales. (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004)

En México alrededor de 4000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales. Dan cuenta de ello con amplitud la Historia Natural de la Nueva España (1571-1577), de Francisco Hernández, y los códices Florentino y de la Cruz-Badiano (Ocegueda, S., E. Moreno, 2005).

Los productos naturales han sido históricamente de importancia crucial en la identificación y el desarrollo de agentes antibacterianos. El interés en estos sistemas ha disminuido en los últimos años, pero la rápida aparición de cepas bacterianas resistentes ha forzado su reevaluación como una ruta para identificar nuevos esqueletos químicos con actividad antibacteriana para la elaboración de nuevos fármacos (Moloney, 2016). Desafortunadamente, la evolución en la producción de antimicrobianos se ha acompañado de un incremento marcado de la resistencia de bacterias, hongos, parásitos, incluso virus, a diferentes familias de estos. (Quiñones Pérez, 2017).

La resistencia a los antimicrobianos es un problema y amenaza mundial que tiene serias repercusiones en la salud humana, sanidad animal, vegetal y en el ambiente. Esta se puede generar bajo condiciones naturales o por el uso inadecuado y excesivo de los antimicrobianos (Yagui, 2018).

Cabe destacar que la resistencia antimicrobiana no solo es uno de los problemas de salud pública críticos, sino que se unen todas aquellas enfermedades que generan grandes gastos al sistema de salud como el cáncer, las enfermedades crónico-degenerativas, las cardiopatías que figuran en los primeros lugares de morbilidad en el mundo (OMS, 2010) convirtiéndose de igual manera importantes en materia de investigación para el desarrollo de nuevos métodos tanto de tratamiento como de prevención de las mismas convirtiéndose así la terapia antioxidante o el consumo de antioxidantes como los candidatos perfectos para su prevención. (Alberto J. Núñez Sellés, 2011; Vicente Sanchez-Valle, 2013)

Los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía, liberan radicales libres, por lo cual deben existir mecanismos de defensa contra estas especies químicas y así asegurar la vida. La formación de radicales libres mediante procesos naturales conduce a la oxidación de biomoléculas, dando lugar a diversas enfermedades. Los organismos fotosintéticos como las plantas, están expuestos a ambientes muy oxidativos, por lo que poseen un sistema antioxidante muy eficaz. (Echavarria *et al.*, 2018)

Cuando los mecanismos antioxidantes con los que cuenta el organismo humano fallan y son sobrepasados, el incremento excesivo de especies reactivas de oxígeno y el establecimiento del estrés oxidativo afectan a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. (Elejalde Guerra, 2001; Vicente Sanchez-Valle, 2013)

En la naturaleza con el paso del tiempo, las plantas han desarrollado mecanismos para el combate de los radicales libres tanto endógenos como exógenos. Uno de los componentes principales de las plantas son los antioxidantes, sustancias existentes en determinados

alimentos que actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento y otras enfermedades. (Echavarria *et al.*, 2018)

Entre los antioxidantes hay varias familias de principios activos como los polifenoles y los fitoestrógenos. Entre los primeros se encuentran los flavonoides y los taninos, ampliamente estudiados (Coronado Salvador Vega León Rey Gutiérrez T Marcela Vázquez F Claudia Radilla V, 2015)

Entre los flavonoides se pueden señalar sólo como ejemplo las antocianinas (rojo-azulado de las fresas), catequinas (té verde y negro), citroflavonoides (naranja, que da sabor amargo a la naranja, limón, toronja), isoflavonoides (genisteína y daidzeína presentes en soya y sus derivados). Protoantocianidinas en semillas de uva y vino tinto (Coronado Salvador Vega León Rey Gutiérrez T Marcela Vázquez F Claudia Radilla V, 2015).

Otro tipo de antioxidantes son los taninos (polifenoles) presentes en el vino, con su característica de astringencia. No sólo son útiles a la industria alimentaria sino también en la de cosméticos. Respecto a los fitoestrógenos (isoflavonas lignanos, flavonoides) se encuentran particularmente en las proteínas de la soya o sus derivados. Su uso más importante se asocia con la terapia de reemplazo hormonal para mujeres con síntomas de menopausia y osteoporosis durante el climaterio. Los compuestos relevantes son la genisteína y daidzeína que también se biosintetizan en abundancia en la cascarilla de semillas de linaza y centeno (Coronado Salvador Vega León Rey Gutiérrez T Marcela Vázquez F Claudia Radilla V, 2015).

Hasta el momento se conocen solo algunos de los compuestos de *Chenopodium graveolens* así como su capacidad de actuar a nivel biológico, por lo que este trabajo tiene como objetivo encontrar nuevas aplicaciones a los extractos generados así como la caracterización de los mismos.

2. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios de *Chenopodium graveolens* presentan actividad antioxidante y un efecto inhibitorio en el crecimiento y desarrollo de diversas cepas bacterianas y fúngicas de interés farmacológico.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de *Chenopodium graveolens* (Willd.) frente a cepas bacterianas y fúngicas de interés farmacológico, así como su actividad antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Generar extractos de diferente polaridad mediante metodologías de extracción por maceración y partición.
- ✓ Realizar la caracterización cualitativa mediante tamiz fitoquímico y CCF de los materiales vegetales obtenidos.
- ✓ Evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos frente a cepas bacterianas y fúngicas.
- ✓ Determinar la cantidad de polifenoles presentes en *Chenopodium graveolens*.
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante de *Chenopodium graveolens* mediante la técnica de DPPH y ABTS.
- ✓ Purificar y caracterizar estructuralmente metabolitos secundarios de los extractos de mayor bioactividad.

4. GENERALIDADES

Chenopodium es el segundo género más grande y uno de los taxonómicamente más complejos de la subfamilia Chenopodioideae en la familia Amaranthaceae. Mientras que las hojas de *C. album* son una fuente de vitaminas y micronutrientes, *C. quinoa* es importante para la harina sin gluten y el alto contenido de proteínas de sus granos. El hábito altamente polimórfico de las especies de este género ha causado muchas dificultades en su adecuada identificación taxonómica. Las dificultades surgen principalmente debido a la presencia de polimorfismos, variaciones paralelas entre diferentes especies, ocurrencia de plasticidad fenotípica y presencia de híbridos supuestos. (Devi & Chrungoo, 2017)

Chenopodium pertenece a la subfamilia Chenopodioideae, dentro de la familia Chenopodiaceae (Caryophyllales). Las Chenopodiaceae contienen aproximadamente 100 géneros y 1700 especies, distribuidas principalmente en regiones templadas y subtropicales de ambos hemisferios. (Fuentes-Bazan, Mansion, & Borsch, 2012). En este trabajo hablaremos acerca de *Chenopodium graveolens*.

Chenopodium graveolens, mejor conocido en México como "yerba del zorrillo" (Bye Jr., 1986), "epazote de zorrillo" y "Epazotl" (náhuatl), es una planta nativa de México y América Central usada ampliamente como un condimento alimenticio. (Déciga-Campos, Mata, & Rivero-Cruz, 2017)



FIGURA 1. *Chenopodium graveolens*.

Fotos de Pedro Tenorio Lezama 2000 obtenidas de
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/chenopodium-graveolens/fichas/pagina1.htm>

Chenopodium graveolens es una planta olorosa originaria de México, crece en ambientes con clima cálidos, semicálidos, semisecos, secos y templados. Es una hierba anual, erecta, a veces muy ramificada, de 20 cm a 1 m de altura, usualmente rojiza o verde. Sus hojas son más largas que anchas, de color verde a púrpura, presentan lóbulos o hendiduras y son pegajosas. Las flores son numerosas en las ramas. Los frutos son pequeños, numerosos, y las semillas de color café oscuro. Su uso principal mencionado por las comunidades indígenas es para la diarrea, además de usarlo como desparasitante, como tratamiento para la disentería, la indigestión, la bilis, el empacho, el vómito (Simon, 1996; UNAM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009) también como antiespasmódico y analgésico para trastornos gastrointestinales como el dolor de estómago (Meckes, Paz, Acosta, & Mata, 1998). Las partes más utilizadas son las hojas o las ramas foliadas, siendo preparadas como decocciones, infusiones y enemas de purga. (Déciga-Campos *et al.*, 2017)

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Chenopodium graveolens*.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Genero	Dysphania R. Br. Disfania
Especie	<i>Dysphania graveolens</i> (Willd.)

(United States Department of Agriculture (USDA) The PLANTS Database, 2019)

Chenopodium graveolens posee sinónimos en cuanto a su nombre científico, conociéndolo también como *Chenopodium graveolens* Willd., *Chenopodium graveolens* Willd. var. *neomexicanum* (Aellen) Aellen, *Chenopodium incisum* Poir., *Chenopodium incisum* Poir. var. *neomexicanum* Aellen, *Teloxys graveolens* (Willd.) W.A. Weber, *Dysphania graveolens* (Willd.) (United States Department of Agriculture (USDA) The PLANTS Database, 2019)

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Chenopodium graveolens*

Entre los componentes característicos identificados en *Chenopodium graveolens* se localizan: (+)-8a-Hidroxi elemol, (+)- 8a-Acetoxicriptomeridiol, Criptomeridiol, Pinostrombina, Estigmastrol, Estigmast-22-en-3-ol y Acetato de geranilo, Pinocembrina, Crisina y el 3 β -sitosteril glucósido, rutina, narcisina, melilotosida, una cumarina y negletina (Álvarez-Ospina, Rivero Cruz, Duarte, Bye, & Mata, 2013; Calzada, Velázquez,

Cedillo-Rivera, & Esquivel, 2003; González-Maciel *et al.*, 2015; Mata, Gel, Alvarez, & Ci, 1987).

En 2013, Álvarez-Ospina y col. Llevaron a cabo un estudio de la composición química del aceite esencial de ésta planta, identificando los compuestos:

- ⇒ α -tugeno
- ⇒ δ -3-Careno
- ⇒ p-Cimeno
- ⇒ Eucaliptol
- ⇒ *trans*-p-Menta-2-en-1-ol, β -Terpineol
- ⇒ Terpinen-4-ol
- ⇒ α -Terpineol
- ⇒ 2- α -Hidroxi-1,8-cineol
- ⇒ 6-Oxocineol
- ⇒ Isoteaspirano
- ⇒ Carvacol
- ⇒ Cumarina
- ⇒ 2-feniletil butirato
- ⇒ β -Cariofileno
- ⇒ γ -Elemeno
- ⇒ α -Cariofileno
- ⇒ Oxido de β -cariofileno
- ⇒ 6,10,14-Trimetilpentade-can-2-ona
- ⇒ Occidol
- ⇒ Ácido n-Hexadecanoico

Encontrado como mayoritarios a Eucaliptol, p-Cimeno, en un 42 y 16 % respectivamente (Álvarez-Ospina *et al.*, 2013).

Son pocos los estudios biológicos llevados a cabo con *Chenopodium graveolens*, mencionando algunos de ellos:

En el año de 1992 A. Rojas y su grupo de investigación llevaron a cabo experimentos con diversas cepas bacterianas, mostrando actividad frente a *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, y ninguna frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para este experimento utilizaron el extracto crudo obtenido mediante un percolado con metanol. También realizaron experimentos con tres compuestos puros obtenidos del epazote de zorrillo: Crisina, Pinostrombina y Pinocembrina; siendo Pinostrombina inactiva

frente a las cepas evaluadas, sin embargo Pinocembrina mostro buena actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*, siendo además Crisina potente contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Rojas, Hernandez, Pereda-Miranda, & Mata, 1992).

También se evaluó contra *Taenia crassiceps* mostrando que la actividad cisticida del extracto de metanol fue dependiente de la dosis y fue bien tolerada a las dosis probadas y no hubo anomalías en el comportamiento, el consumo de alimento / agua y la actividad general de los animales a lo largo del estudio, todo lo cual confirma la falta de toxicidad que antes se observaba *in vitro*. (González-Maciel *et al.*, 2015)

Debido a que *Chenopodium graveolens* es un cercano pariente de *Chenopodium ambrosoides*, se sugería presentara evidencia de alta toxicidad y genotoxicidad de sus extractos acuosos (Gadano, Gurni, López, Ferraro, & Carballo, 2002), sin embargo estudios realizados en ratones mostraron que *Chenopodium graveolens* no produjo un efecto tóxico en ninguna forma preparada (aceite, extracto e infusión). Anteriormente, el ascaridol, el carvacol y el óxido de cariofileno se habían demostrado como los principales metabolitos tóxicos aislados de *Chenopodium ambrosoides*. El extracto de *Chenopodium graveolens* no contiene ascaridol, y solo el aceite esencial tiene una concentración mínima de carvacol y óxido de cariofileno. Por lo tanto, *Chenopodium graveolens* difiere en toxicidad con *Chenopodium ambrosioides* (Déciga-Campos *et al.*, 2017; González-Maciel *et al.*, 2015)

En otro estudio se evaluó la actividad de los componentes aislados de *Chenopodium graveolens* mostrando fuerte actividad de Melilotosida contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Narcisina mostró selectividad contra *E. histolytica*. Los compuestos restantes mostraron una actividad débil contra ambos organismos (Calzada *et al.*, 2003).

Pinocembrina es un metabolito principalmente extraído de la fase de polaridad intermedia generada con acetato de etilo, este componente puro fue extraído y evaluado contra *Fasciola hepática*, contra huevos infectados de *Ascaridia galli* así como la tercera fase larvaria de *Stomoxys calcitrans* mostrando resultados favorables de mortalidad contra ellas (Maria Del Rayo Camacho, Berta Sanchez, Hector Quiroz, 1991) además que en estudios con humanos sanos se ha visto buena tolerancia a ella sin la presencia de efectos secundarios o tóxicos (Cao *et al.*, 2015).

Crisina demostró contribuir a la disminución de daño tisular ya que se encontró una restauración de los cambios patológicos inducidos del hígado, el cerebro y el riñón y, por lo tanto, la mejora en la desintoxicación del amoníaco. El mecanismo de defensa de la Crisina incluye la inhibición de las alteraciones morfológicas de los tejidos y los procesos

de peroxidación lipídica, todo lo cual resultó en la restauración de la alteración de la integridad estructural del tejido (Renuka *et al.*, 2016), posee además propiedades anticancerígenas, proapoptóticas, antiangiogénicas, antimetastásicas, inmunomoduladoras y antioxidantes. Los mecanismos moleculares subyacentes a las actividades pleotrópicas de la Crisina son diversos, que involucran combinaciones de vías de señalización celular en múltiples niveles de diversas enfermedades. La Crisina mitiga la neurotoxicidad, la neuroinflamación y el estrés oxidativo en los tejidos neuronales y mitiga las disfunciones cognitivas. (Mani & Natesan, 2018)

Recapitulando, se sabe que *Chenopodium graveolens* es ampliamente usado en el tratamiento de la diarrea, en 1998 Meckes y su grupo de investigación concluyó que el efecto relajante previamente detectado del extracto crudo de esta planta se debe en parte a la presencia de Crisina y pinostrobin, que inhiben las contracciones del músculo liso intestinal mediante un mecanismo mediado por calcio. Este mecanismo de acción a nivel de epitelio de la mucosa desempeña un papel en la acción del fármaco antidiarreico (Meckes *et al.*, 1998).

La importancia de los hallazgos realizados acerca de *Chenopodium graveolens*, así como un gran campo no explorado en el ámbito de la investigación nos abre las puertas a nuevas aplicaciones de esta planta.

5. METODOLOGÍAS

5.1. GENERACIÓN DE EXTRACTOS

Se realizó una maceración del material vegetal obtenido del Mercado Hidalgo en la ciudad de Tijuana B.C., con el nombre de Epazote de zorrillo. Para este proceso se colocaron 1658.1 g de material vegetal en un garrafón de vidrio expuesto a 15 L de metanol bajo agitación ocasional por 8 días.

Se extrajo el solvente concentrado, se llevó a un matraz bola de 2 L con un peso de 644.16 g donde se eliminó el solvente a presión reducida, recuperándose el metanol para una segunda maceración, así como el uso de Manifold para asegurar la eliminación total del solvente. Una vez seco el material vegetal, se adicionaron 12 L de metanol recuperado de la primera maceración. La segunda maceración tuvo una duración de 7 días.

Finalmente se obtuvieron 187.47 g de extracto crudo seco.



FIGURA 2. MATERIAL VEGETAL



FIGURA 3. PRIMER DÍA DE MACERACIÓN



FIGURA 4. ÚLTIMO DÍA MACERACIÓN

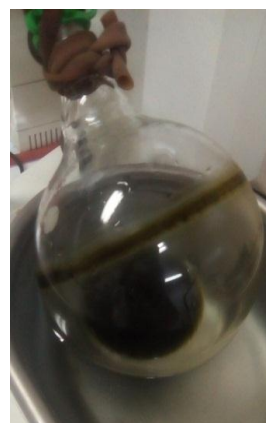


FIGURA 5. ELIMINACIÓN DE SOLVENE EN ROTAVAPOR.

5.1.2 PARTICIÓN POR GRADIENTE DE POLARIDAD

Se realizó una partición del extracto crudo utilizando solvente de diferentes polaridades. Para esto se pesaron 105.47 g de extracto crudo y se redisolvió en una mezcla metanol: agua (3:2) utilizando 350 mL (210 mL metanol: 140 mL agua).

El extracto crudo se colocó en un embudo de separación junto con el primer solvente para extracción, el cual es hexano, se agitaron y se dejó reposar para formar dos fases. Este proceso se repitió por triplicado en las siguientes proporciones:

TABLA 2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN CON n-HEXANO.

Repetición	Cantidad de n-Hexano utilizado (mL)
1	700
2	700
3	350

Se recolectaron las fases hexánicas, fueron llevadas a rota vapor y Manifold para la eliminación del solvente.



FIGURA 6. PARTICIÓN HEXÁNICA.



FIGURA 7. SECADO DE PARTICIÓN HEXÁNICA.

El proceso mencionado anteriormente fue repetido con el solvente de polaridad media acetato de etilo.

TABLA 3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN CON ACETATO DE ETILO.

Repetición	Cantidad de Acetato de etilo utilizado (mL)
1	700
2	400
3	400



FIGURA 8. PARTICIÓN CON ACETATO DE ETILO.



FIGURA 9. ELIMINACIÓN DE ACETATO DE ETILO.

Finalmente, la fase acuosa resultante de la partición anterior fue llevada a rotavaporación y mediante procesos conocidos de secado se obtuvo el extracto acuoso como se muestra en el diagrama de partición de la figura 11.



FIGURA 10. PARTICIÓN ACUOSA.



FIGURA 11. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ACUOSO.

Al terminar de secar cada partición se llevaron a una balanza para obtener su peso.

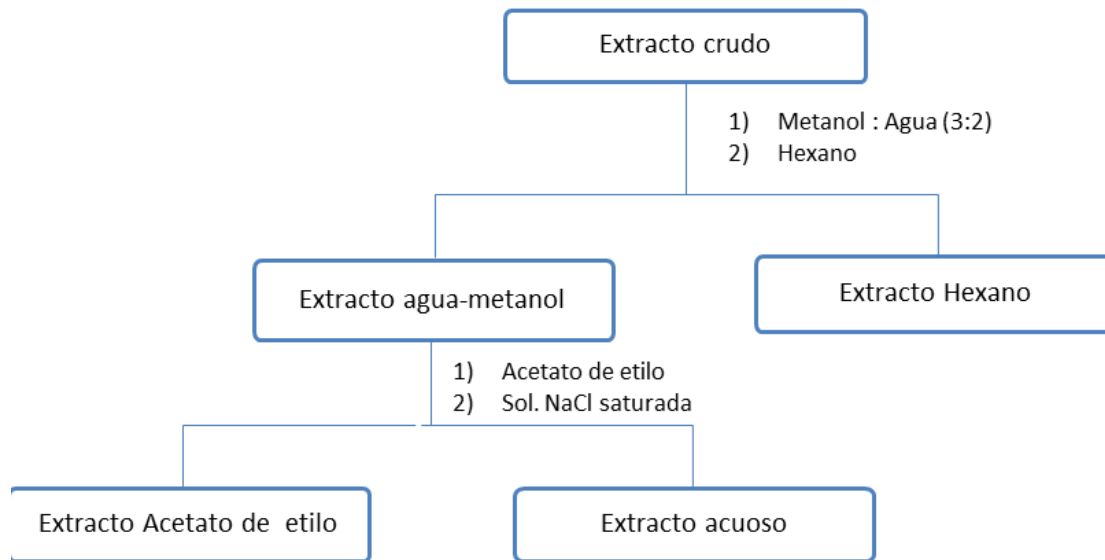


FIGURA 12. DIAGRAMA DE PARTICIÓN.

5.2. PERFIL FITOQUÍMICO CUALITATIVO POR PRUEBAS DE COLORIMETRÍA Y CCF

5.2.1 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

Se realizaron pruebas colorimétricas al extracto crudo y particiones para conocer de manera cualitativa los metabolitos secundarios mayoritarios. Para la determinación de cada diferente metabolito secundario fue necesaria la utilización de diferentes técnicas, las cuales se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 4. PRUEBAS COLORIMÉTRICAS.

Metabolito secundario	Método
Alcaloides	Mayer Dragendorff Wagner
Taninos	Cloruro férrico Gelatina
Esteroides y triterpenoides	Lieberman – Burchard
Flavonoides	Shinoda
Carbohidratos	Benedict
Saponinas	Espuma
Glucósidos antraquinónicos	Borntrager
Cumarinas	Erlich

Los ensayos fueron realizados utilizando una solución patrón de los extractos a una concentración de 1 mg/mL, en diferentes solvente según lo indicado en las metodologías.

5.2.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se realizaron diferentes CCF comparativas con el extracto crudo y las particiones obtenidas para conocer de manera cualitativa la presencia de metabolitos de interés y seleccionar algunos de ellos como candidatos para su aislamiento.

Las placas cromatográficas con fase estacionaria de sílice gel, fueron sembradas con los extractos utilizando como fase móvil la disolución binaria de *n*-hexano/acetato de etilo al 30%, y como métodos de visualización luz ultravioleta y los reveladores químicos de óleum y vainillina.

Los metabolitos identificados en la CCF comparativa se observan en la Figura 13 (de izquierda a derecha: extractos crudo, acuoso, acetato de etilo y hexánico).

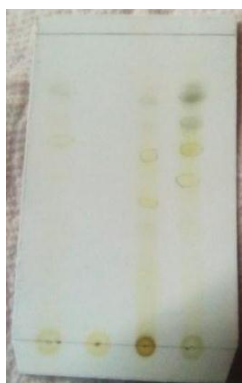


FIGURA 13. CCF EXTRACTOS SIN REVELAR.

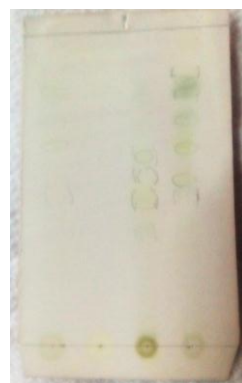


FIGURA 14. CCF EXTRACTOS REVELADO CON VAINILLINA

Se realizó otra CCF con los extractos aumentando la polaridad de la fase móvil de *n*-hexano/acetato de etilo al 50% y usando como revelador óleum. Con el perfil de resolución de la CCF y los resultados biológicos se determinó el extracto para el aislamiento de componentes mayoritarios, utilizando la separación cromatográfica por columna de tipo flash. Este proceso se describe en el apartado 5.5. Relacionado al aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios.

5.2.3 REACCIÓN DE ACETILACIÓN DE AZÚCARES

Se realizó una reacción de acetilación de azúcares procedentes del extracto acuoso para su caracterización fitoquímica. Para ello se colocaron en un matraz bola de 50 mL, 1 g de extracto acuoso, 3 mL de anhídrido acético y 5 mL de piridina. Se dejaron en agitación constante por 12 h a una temperatura de 25 °C.

Una vez pasadas las 12 h de reacción esta fue detenida con la adición de 60 mL de agua y pasado a un embudo de separación junto con 60 mL de diclorometano. Se agitó y se dejó separar en dos fases, este proceso se repitió por tres veces recolectando la fase orgánica para un siguiente lavado.



FIGURA 15. REACCIÓN DE ACETILACIÓN.



FIGURA 16. EVOLUCIÓN DE REACCIÓN DE ACETILACIÓN

La fase orgánica se lavó tres veces con HCl 1 M (ver figura 17), sulfato de cobre (ver figura 18) y solución salina sobresaturada (tres veces). La fase orgánica resultante fue secada con sal anhidra y filtrada para la eliminación de la sal. Posteriormente se eliminó el solvente con rota vapor y alto vacío con un Manifold. Una vez completamente seco se obtuvo el peso del crudo de reacción.



FIGURA 17. LAVADO ÁCIDO DEL CRUDO DE LA REACCIÓN



FIGURA 18. LAVADOS CON CuSO_4

El crudo de reacción fue analizado por técnicas instrumentales de espectroscopia infrarroja y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, así como cromatografía de capa fina para confirmar el progreso de la reacción.

5.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

5.3.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Las cepas fueron obtenidas de muestras clínicas de pacientes ya inoculadas en medio de cultivo HardyChrom agar. Las cepas presentaban las siguientes características morfológicas:

- ⇒ Cepa B-1: Obtenida de un agar HardyChrom, con una coloración rosa, diámetro de 1 mm. Se desconoce el origen de la muestra.
- ⇒ Cepa B-2: Obtenida de un agar sangre, colonia color amarilla, mucoide, con gamma hemolisis, forma circular. Obtenida de una muestra de oído.
- ⇒ Cepa B-3: Obtenida de un agar sangre, colonia color blanca, con alfa hemolisis, de forma circular. Obtenida de una muestra de oído.

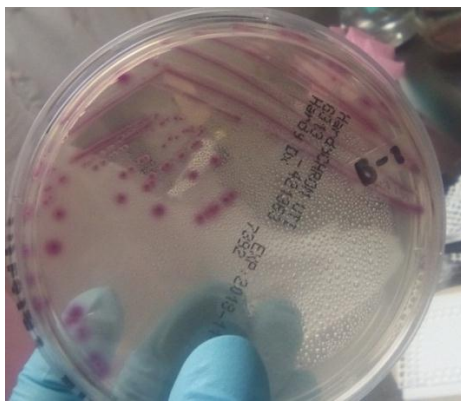


FIGURA 19. CEPA B-1

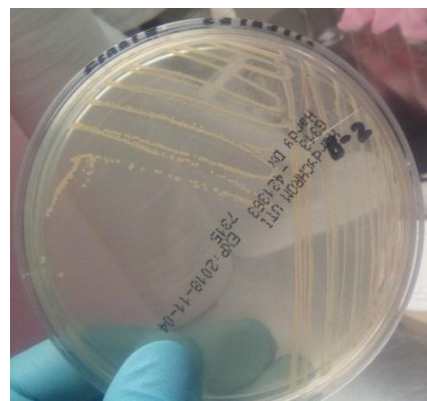


FIGURA 20. CEPA B-2.

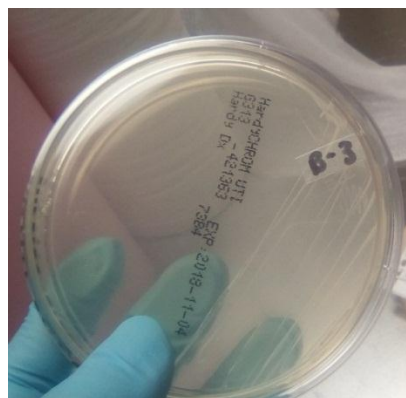


FIGURA 21. CEPA B-3

Las cepas fueron resembradas en medio de cultivo HardyChrom agar, así como en agar Sangre y MacConkey.

Se realizó tinción de Gram a cada una de las cepas colocando en un portaobjetos junto a una gota de agua destilada una muestra de la bacteria y realizando un expandido formando una capa delgada y se dejó secar.

Se colocaron las tinciones en el siguiente orden: cristal violeta (1 min), yodo (1 min), alcohol-cetona (15 s) y safranina (1 min); se dejó secar y se observó al microscopio a 100x con aceite de inmersión.

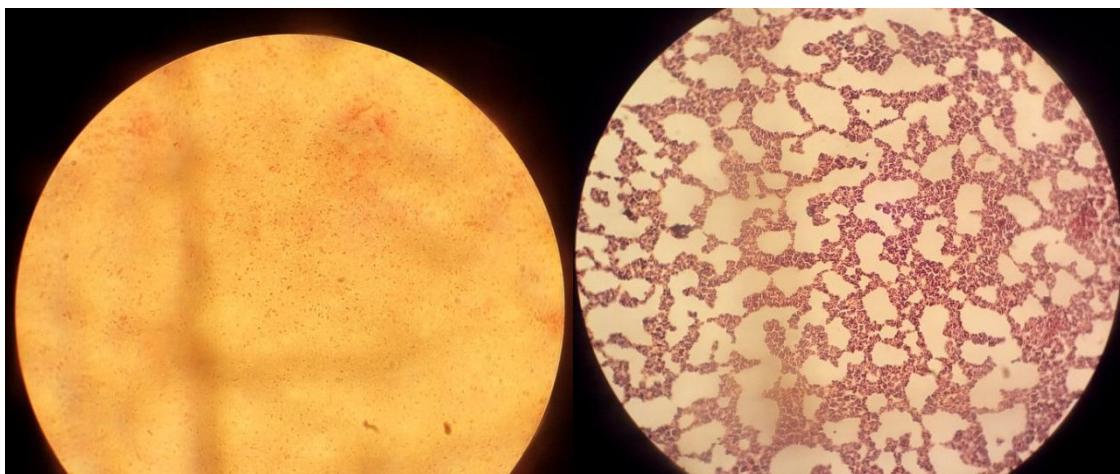


FIGURA 22. TINCIÓN GRAM B-1

FIGURA 23. TINCIÓN GRAM B-2

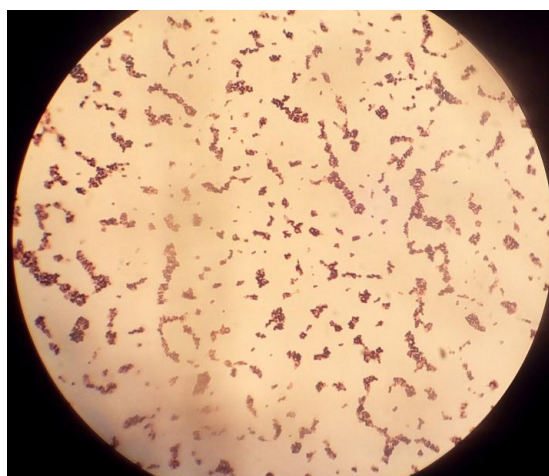


FIGURA 24. TINCIÓN GRAM B-3

Se realizó un inóculo al 0.5 de McFarland con una absorbancia dentro del rango 0.08-0.1 a una longitud de onda de 625 nm. Una vez realizada se colocó en su correspondiente placa de BBL CRYSTAL de acuerdo a su resultado en la tinción de Gram y se dejó inocular cada

pocillo de la placa, uniformemente. Una vez inoculados todos fue sellada y dejada en incubación a 37 °C en la incubadora por 24 h. El resultado fue visto en el visor de paneles para BBL CRYSTAL generando un código que fue puesto en el programa BBL CRYSTAL MIND el cual nos arroja el nombre del microorganismo evaluado.



FIGURA 25. PLACA DE BBL CRYSTAL

5.3.1.2 TÉCNICA DE KIRBY-BAUER

Se realizaron antibiogramas siguiendo la técnica de Kirby-Bauer para la identificación de halos de inhibición en el crecimiento bacteriano. Para ello se evaluaron el extracto crudo y las tres particiones realizando diluciones seriadas a partir de una concentración de 1 mg/mL. Para la dilución de los extractos fue necesaria la utilización de etanol y DMSO quedando de la siguiente forma:

TABLA 5. DISOLUCIÓN DE EXTRACTOS PARA DILUCIONES.

Clave	Extracto	Peso (mg)	PBS (mL)	Etanol (mL)	DMSO (mL)
000	Crudo	3.1	2.8	0.3	-----
001	Acuoso	3.2	3.2	-----	-----
002	Acetato de etilo	3.5	3.35	-----	0.15
003	Hexano	3.6	3.4	-----	0.2

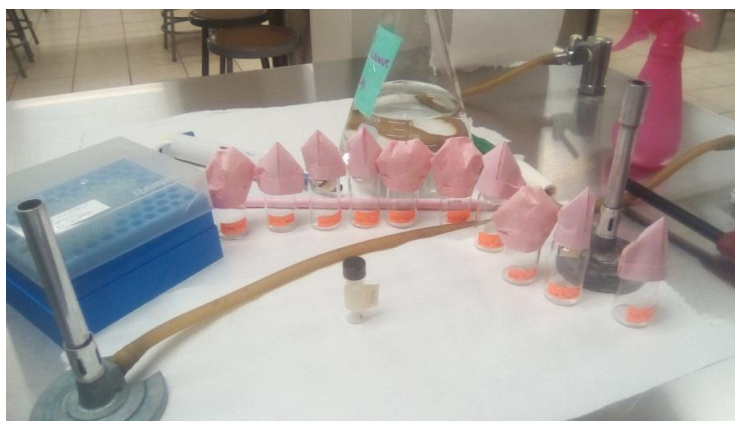


FIGURA 26. DILUCIÓN DE EXTRACTOS

En aquellos extractos en los que se utilizó etanol o DMSO se trabajó con disco control con el 100% de dicha sustancia y fue evaluada en contra de la cepa utilizada a fin de determinar si afecta o no los resultados. Las diluciones se realizaron en PBS (pH=7.41) quedando 10 viales con las siguientes concentraciones:

TABLA 6. CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO PARA ANTIBIOGRAMA.

Vial	Concentración (mg/mL)
1	1
2	1×10^{-1}
3	1×10^{-2}
4	1×10^{-3}
5	1×10^{-4}
6	1×10^{-5}
7	1×10^{-6}
8	1×10^{-7}
9	1×10^{-8}
10	1×10^{-9}

Se impregnaron los discos a utilizarse como portador de la concentración para el antibiograma con 30 μ L de cada vial y se dejaron secar. Por mientras se prepararon inóculos al 0.5 de McFarland de cada una de las cepas aisladas.

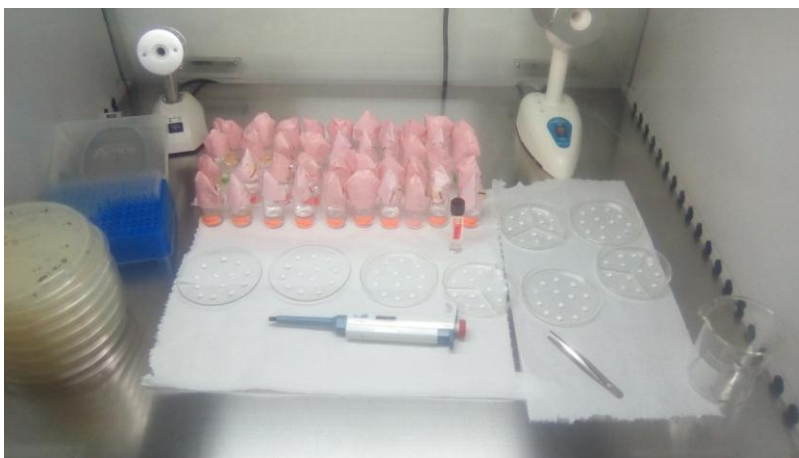


FIGURA 27. IMPREGNACIÓN DE DISCOS

Se sembraron cajas Petri con agar Mueller Hinton de 20 cm por hisopado completo de la caja. Posteriormente se colocaron los discos previamente impregnados con unas pinzas estériles y se dejaron incubar por 24 h a 37 °C. Los resultados se reportaron como sensible, intermedio o resistente de acuerdo al halo de inhibición.

Además se prepararon una caja con antibióticos control por cada microorganismo a evaluar, siguiendo el mismo procedimiento, pero utilizando los siguientes antibióticos:

TABLA 7. ANTIBIÓTICOS CONTROL PARA GRAM POSITIVO.

Antibiótico	Pocillo	Abreviatura
Ciprofloxacino	12	CIP
Eritromicina	10	E
Gentamicina	6	GM
SMX/TMP	8	STX
Nitrofurantoina	1	FM
Penicilina	3	P
Ampicilina	9	AM
Clindamicina	2	CC
Bacitracina	7	BAC
Estreptomicina	5	S
Vancomicina	11	VA
Tetraciclina	4	TE

TABLA 8. ANTIBIÓTICOS CONTROL PARA GRAM NEGATIVO.

Antibiótico	Pocillo	Abreviatura
Ciprofloxacino	12	CIP
Eritromicina	10	E
Gentamicina	6	GM
SMX/TMP	8	STX
Nitrofurantoina	1	FM
Ceftriaxona	3	CRO
Ampicilina	9	AM
Amikacina	2	AN
Amoxicilina/Ácido clavulánico	7	AMC
Estreptomicina	5	S
Vancomicina	11	VA
Tetraciclina	4	TE

5.3.2 BIOENSAYO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DISCO-PLACA

Se realizó la técnica disco-placa para la determinación de la capacidad antimicrobiana de *Chenopodium graveolens* tanto de su extracto crudo como de sus particiones.

Se utilizaron cepas provenientes del Cepario de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de UABC Tijuana, las cuales fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella typhimurium*.

Se realizó la dilución del extracto crudo, acuoso, el de acetato de etilo y el hexánico en metanol hasta la saturación del mismo y se tomaron 80µL con los que fueron impregnados cada uno de los sensidiscos a utilizar. También se prepararon los sensidiscos de control negativo impregnados con 80µL de metanol y se dejaron secar.

Se realizó el estándar de 0.5 de McFarland con cada cepa a utilizar tomando de 2-3 colonias aisladas de un cultivo de 24 h de cada cepa colocándolo en agua peptonada hasta obtener el estándar de cada una. Se sembró por hisopado completo de la caja Petri con agar Mueller Hinton y se dejó por 5 min.

Se colocaron en cada caja un sensidisco de metanol, un antibiótico, el extracto crudo y las 3 particiones.

Para *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* se utilizó penicilina, para *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella typhimurium* se utilizó ampicilina como control positivo. (CLSI, 2015)

Se dejaron en incubación por 24 h a 37°C y se realizó la observación y medición de los halos de inhibición.

5.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

5.4.1 TÉCNICA DE FOLIN-CIOCALTEU PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Se realizó la prueba de Folin-Ciocalteu para la determinación de polifenoles totales que posee el extracto crudo así como sus particiones. Para esto se preparó una solución inicial de 1 mg/mL del extracto a evaluar diluyéndolo en metanol. Se prepararon 9 tubos con muestra, se les adiciono 1.5 mL de agua destilada, 0.05 mL del extracto, 0.25 mL de reactivo de Folin. Se dejó reposar por 3 minutos y se le adiciono 1 mL de Carbonato de sodio al 7%, agitando levemente y dejándose reposar en oscuridad por 2 horas.

Una vez pasado el tiempo los tubos fueron leídos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Se calculó el promedio de la absorbancia obtenida y se sustituyó el valor de x con el promedio obtenido en la ecuación de la recta $y=0.0022x-0.0807$ dando como resultado la cantidad de polifenoles presentes en la muestra expresado en $\mu\text{g/mL}$

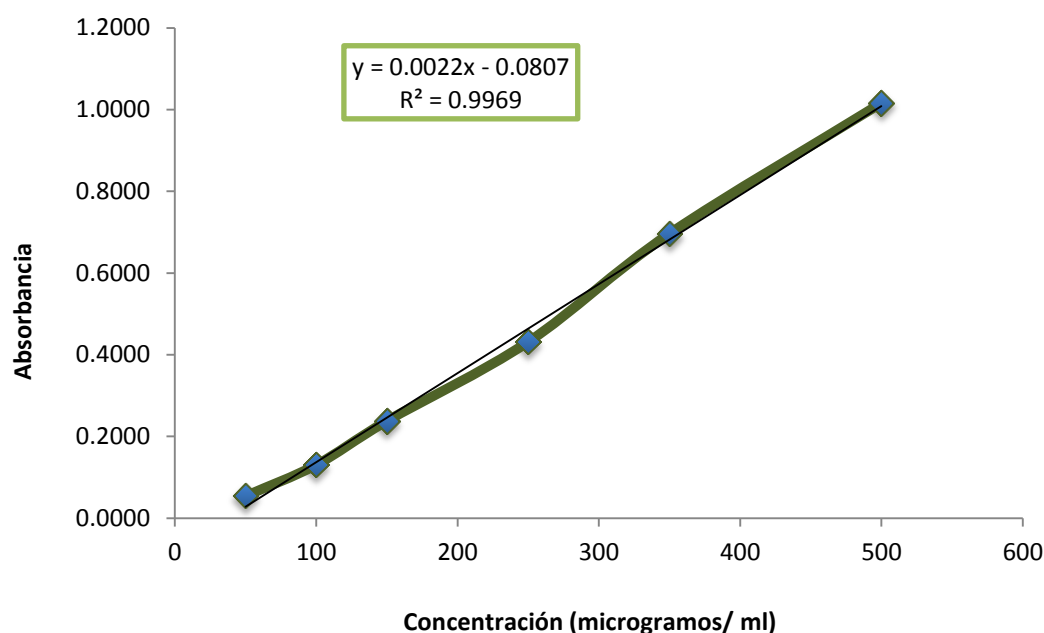


FIGURA 28. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES.

5.4.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH

Se preparó una disolución de 1mg/mL del extracto a evaluar diluyéndolo en metanol, posteriormente se realizaron 10 diluciones seriadas del extracto iniciando a una concentración de 1 mg/mL. Se preparó una solución de DPPH en metanol (7.5 mg/ 250 mL).

Se adicionaron 500 µL de DPPH a cada uno de los tubos, incluyendo el tubo control, se dejaron reposar en oscuridad por un periodo de 30 min. Se leyó la absorbancia un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. El ensayo se realizó por triplicado en cada experimento.

Los datos fueron colectados y se calculó el porcentaje de actividad antioxidante utilizando la Ecuación 1:

ECUACIÓN 1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH.

$$\% \text{ Actividad Antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{Am}{Ac} \right) \right] \times 100$$

Donde *Am* es la absorbancia promedio de la muestra y *Ac* es la absorbancia de la muestra control de DPPH.

Posteriormente se determinó la CE₅₀, mediante regresión lineal.

5.4.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE ABTS

Se preparó el radical catiónico ABTS con 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g de ABTS disolviéndose en 5 mL de agua destilada y se mantuvo en oscuridad por 18 horas previas al experimento. Una vez llegada la hora se preparó una disolución de 1 mg/mL del extracto a evaluar, realizando 10 diluciones seriadas por triplicado. La solución de ABTS con el radical ya formado se prepara a una concentración de 10 $\mu\text{L/mL}$, la cantidad depende de los tubos a preparar.

Una vez realizadas se tomaron 20 μL de cada tubo y fueron colocados en uno nuevo, se les adiciono 980 μL de la solución de ABTS ya preparada y se dejó en incubación en la oscuridad por 7 minutos. Una vez pasado el tiempo se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm.

Los resultados fueron registrados en una tabla, con los cuales se obtuvo el % Actividad Antioxidante y la CE_{50} de cada extracto. El porcentaje de actividad antioxidante se calculó con la siguiente ecuación:

ECUACIÓN 2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS.

$$\% \text{ Actividad Antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{Am}{Ac} \right) \right] \times 100$$

Donde Am es la absorbancia promedio de la muestra y Ac es la absorbancia de la muestra control de DPPH.

Para la obtención de la CE_{50} los datos se graficaron obteniendo su ecuación de la recta y su correlación.

5.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

5.5.1 COLUMNA CROMATOGRÁFICA EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Se realizó una separación cromatográfica por columna con el extracto de acetato de etilo, utilizando 5 g de este disuelto en 10 mL de diclorometano y sílica gel como fase estacionaria.

Después de dejar en reposo la columna con la fase estacionaria en *n*-hexano toda la noche, se sembró el extracto y se utilizó un sistema de elución por gradiente que se muestra en la tabla 9.

TABLA 9. ELUCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.

Elución	Fase móvil	Volumen (mL)
1	<i>n</i> -Hexano 100%	300
2	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 1%	200
3	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 3%	400
4	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 6%	300
5	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 10%	300
6	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 15%	300
7	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 25%	300
8	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 30%	300
9	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 40%	400
10	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 60%	300
11	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de etilo 80%	300
12	Acetato de etilo 100%	300
13	Metanol 100%	810



FIGURA 29. INICIO DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA.

Las eluciones fueron colectadas en tubos de ensayo enumerados para su posterior análisis en cromatografía de capa fina.

5.5.2 FRACCIONAMIENTO DE REUNIONES CROMATOGRÁFICAS

Después de obtener todas las reuniones de la columna cromatográfica del extracto de acetato de etilo, se seleccionó la 6 para fraccionamiento que conduzca con la identificación y purificación de metabolitos.

De la reunión 6 se sembraron 29.6 mg de muestra en una columna con sílica gel como fase estacionaria, y se continuó con la elución por gradiente que se muestra en la tabla 10. Todas las fracciones se monitorearon por CCF.

TABLA 10. ELUCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE LA REUNIÓN 6

Elución	Fase móvil	Volumen (mL)
1	<i>n</i> -Hexano 100%	140
2	<i>n</i> -Hexano: Acetato de etilo 1%	100
3	<i>n</i> -Hexano: Acetato de etilo 2%	100
4	<i>n</i> -Hexano: Acetato de etilo 4%	180
5	Acetato de etilo 100%	100
6	Metanol 100%	40

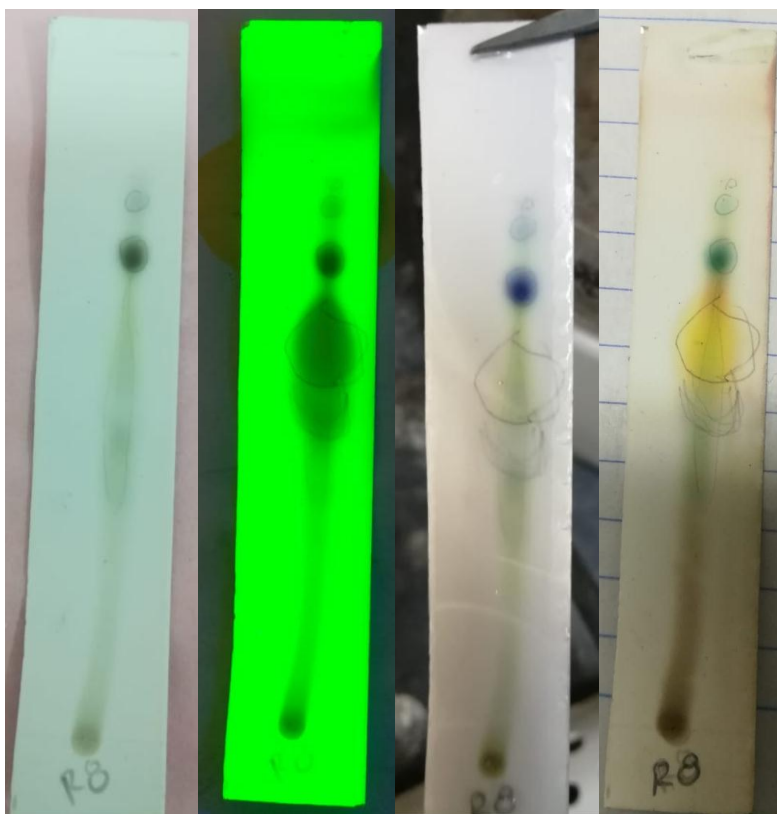


FIGURA 30. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LA REUNIÓN 6.

De las fracciones obtenidas por la elución con *n*-hexano-acetato de etilo al 4%, se identificó un compuesto puro, el cual fue conservado para su análisis estructural por medio de CG-EM y RMN.

5.5.3 COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3, REUNIÓN 8

Se realizó un fraccionamiento cromatográfico con la reunión 8 obtenida de la columna cromatográfica 1 del extracto de acetato de etilo. Se sembraron 211.5 mg disueltos en acetato de etilo sobre una columna con 25 cm de altura. Como fase móvil se utilizó un gradiente de polaridad creciente como se muestra en la tabla 11.



**FIGURA 31. CCF REUNIÓN 8 CON *n*-HEXANO/ACETATO DE ETILO AL 30%
(SIMPLE VISTA, CON LUZ UV, AL CONTACTO CON OLEUM, REVELADO CON OLEUM)**

TABLA 11. GRADIENTES DE SOLVENTE UTILIZADOS EN LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3.

Elución	Solventes	Volumen (mL)
1	<i>n</i> -Hexano 100%	200 mL
2	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 1%	200mL
3	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 3%	150 mL
4	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 6%	200 mL
5	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 10%	150 mL
6	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 15%	150 mL
7	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 25%	150 mL
8	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 30%	150 mL
9	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 40%	150 mL
10	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 60%	150 mL
11	<i>n</i> -Hexano/ Acetato de tilo 80%	150 mL
12	Acetato de etilo 100%	150 mL
13	Metanol 100%	75 mL



FIGURA 32. SEGUIMIENTO DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3.

Se reunieron las fracciones obtenidas y se realizó el cromatograma correspondiente.

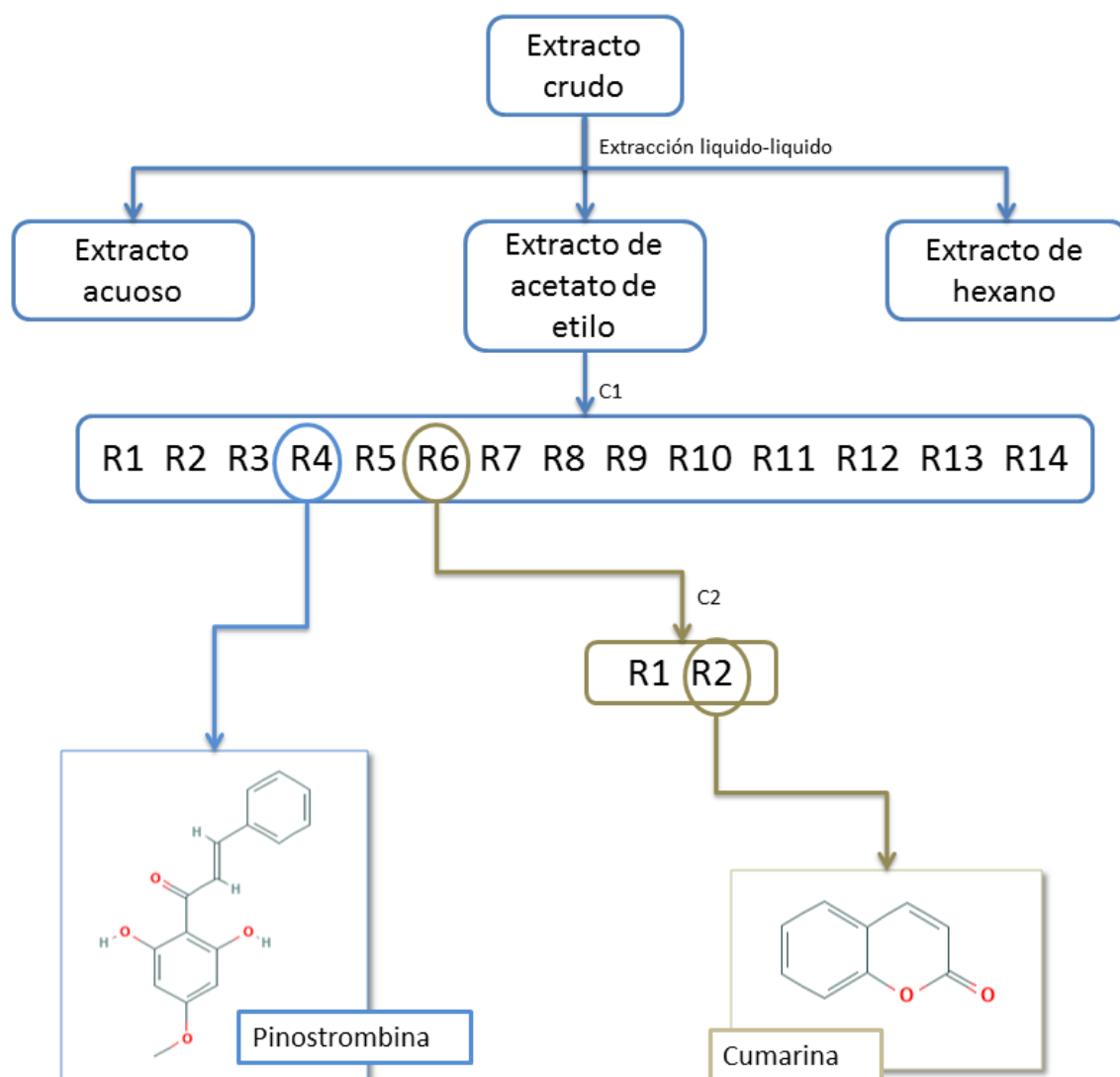
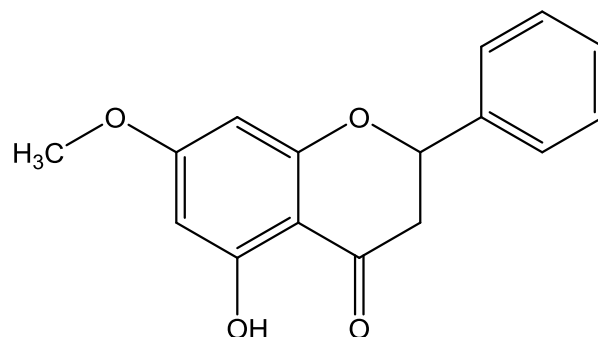


FIGURA 33. DIAGRAMA DE FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO.

Datos físicos y espectroscópicos de los metabolitos aislados de *Chenopodium graveolens***5-hidroxi-7-metoxi-2-fenilcroman-4-ona (Pd-1)****Nombre:** Pinostrobina**Fórmula molecular:** C₁₆H₁₄O₄**Aspecto físico:** cristales blancos (15 mg)**TABLA 12. DATOS ESPECTROMÉTRICOS PINOSTROBINA**

EM M/Z (%)=	270.29 [M ⁺] (26), 193.22 (52), 166.17 (43), 138.18 (61), 114.16 (14), 110.15 (52), 95.13 (100), 91.15 (23), 78.15 (57), 77.13 (71), 69.09 (74), 51.12 (59), 39.12 (36).
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ	2.87 (1H, dd, J ₁ = 17.2 Hz; J ₂ = 3.2 Hz, H-3b), 3.15 (1H, dd, J ₁ = 17.2 Hz; J ₂ = 12.8 Hz, H-3a), 3.83 (3H, s, 7-OMe), 5.46 (1H, dd, J ₁ = 12.8 Hz; J ₂ = 3.2 Hz, H-2), 6.09 (1H, d, H-6), 6.10 (1H, d, H-8), 7.49 (5H, m, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 12.04 (1H, s, 5-OH).
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ:	43.39 (t, C-3), 55.68 (c, C-7-OMe), 79.23 (d, C-2), 94.28 (d, C-8), 95.17 (d, C-6), 103.18 (s, C-10), 126.13 (d, C-2', C-6'), 128.87 (d, C-3', C-4', C-5'), 138.42 (s, C-1'), 162.80 (s, C-9), 164.18 (s, C-5), 168.01 (s, C-7), 195.73 (s, C-4).

Datos físicos y espectroscópicos de los metabolitos aislados de *Chenopodium graveolens*

2H-cromen-2-ona (Pd-2)

Nombre: Cumarina

Fórmula molecular: C₉H₆O₂

Aspecto físico: cristales ligeramente amarillos (15 mg)

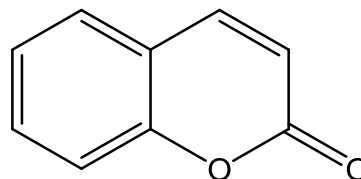


TABLA 13. DATOS ESPECTROMÉTRICOS CUMARINA.

EM M/Z (%)=	146.22 [M ⁺] (14), 118.20 (48), 90.18 (57), 89.17 (60), 74.15 (10), 63.15 (100), 62.16 (38), 39.15 (35), 37.14 (14).
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ	6.45 (1H, d, J= 9.2 Hz, H-3), 7.31 (1H, m, H-8), 7.36 (1H, d, H-6), 7.57 (2H, m, H-5, H-7), 7.73 (1H, d, J= 9.2 Hz, H-4)
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ:	116.73 (d, C-3), 116.90 (d, C-6), 118.86 (s, C-9), 124.40 (d, C-8), 127.84 (d, C-7), 131.81 (d, C-5), 143.37 (d, C-4), 154.09 (s, C-5), 160.71 (s, C-2).

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. GENERACIÓN DE EXTRACTOS

TABLA 14. DATOS FÍSICOS DE LOS EXTRACTOS.

Extracto	Peso (g)	Características físicas
Crudo	184.47	Extracto de coloración verdosa-negro, con olor característico, de consistencia suave.
Acuoso	52.92	Extracto pegajoso, de coloración café-amarillo, con olor dulce, de consistencia chiclosa.
Acetato de etilo	15.07	Extracto seco, de coloración negro, con olor característico.
Hexano	20.06	Extracto líquido, de coloración negro, con olor característico, consistencia suave.

NO TENGO FOTOGRAFÍAS DE LOS EXTRACTOS SECOS

6.2. PERFIL FITOQUÍMICO CUALITATIVO POR PRUEBAS DE COLORIMETRÍA Y CCF

6.2.1 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

TABLA 15. EVALUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EPAZOTE Y SUS PARTICIONES.

Metabolito secundario	Técnica	Crudo	Acuoso	Acetato de etilo	Hexano
Alcaloides	Wagner	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-
Taninos	Cloruro férrico	+	+	+	+
	Gelatina	-	-	-	-
Esteroides y triterpenoides	Lieberman – Burchard	+	-	+	+
Carbohidratos	Benedict	+	+	-	-
Saponinas	Espuma	-	+	-	-
Glucósidos Antraquinonas	Borntrager	-	-	-	-
Cumarinas	Erlich	+	+	+	-
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+
		Flavonas	Flavononas	Flavonas	Flavonas
		Naranja	Rosa	Naranja	Naranja

Se encontró la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides y taninos en los extractos evaluados, así como la presencia de Cumarinas en todos excepto el extracto hexánico.

Por otro lado, la presencia de esteroides y triterpenoides fue detectada de manera abundante en el extracto crudo y sus particiones con acetato de etilo y hexano, mientras que los metabolitos de tipo saponina fueron identificados únicamente en el extracto acuoso.

Cabe destacar que los extractos no presentan Glucósidos antraquinónicos ni alcaloides.

Los resultados concuerdan con estudios previos realizados de caracterización química de *Chenopodium graveolens* de algunos metabolitos aislados como (+)-8a-Hidroxi-10-epi-10,11-dihidro-10H-benzo[5,6-b]furan-3-ol, (+)-

8a-Acetoxicriptomeridiol, Criptomeridiol que son compuestos de origen terpénico; Pinostrobrina, pinocembrina, Crisina de origen flavónico y la presencia de cumarinas (Álvarez-Ospina, Rivero Cruz, Duarte, Bye, & Mata, 2013; Calzada, Velázquez, Cedillo-Rivera, & Esquivel, 2003; González-Maciél *et al.*, 2015; Mata, Gel, Alvarez, & Ci, 1987), así como los valores de las pruebas antioxidantes.

6.2.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se realizaron tres recorridos en CCF de los extractos obtenidos, utilizando como fase móvil *n*-hexano/acetato de etilo al 30 y 50 % y como reveladores químicos vainillina y óleum.

El tercer recorrido fue realizado con la fase móvil de *n*-hexano/acetato de etilo al 50% y con un revelado de óleum, sin embargo, se logra una mejor separación de los componentes utilizando la fase móvil al 30 %.

Después de analizar las placas cromatográficas, se identificó en el extracto de acetato de etilo una mancha de interés (ver imagen 33) para su separación y caracterización estructural.

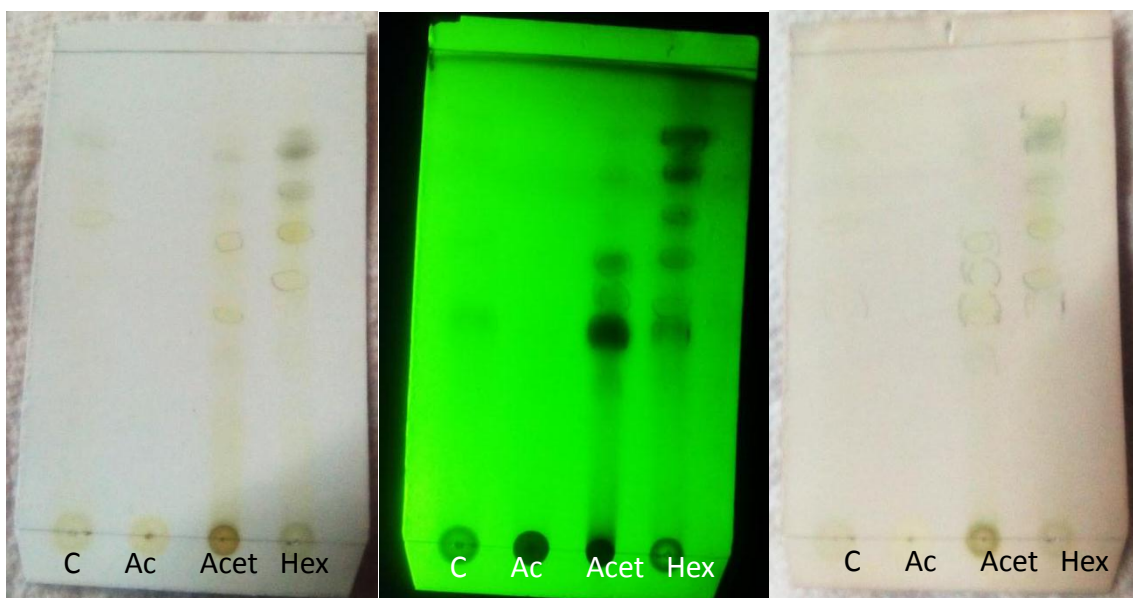


FIGURA 34. 2DO RECORRIDO EXTRACTOS REVELADO VAINILLINA

6.2.3 REACCIÓN DE ACETILACIÓN DE AZUCARES

Se obtuvo un peso de 0.3837 g de crudo de la reacción primera de acetilación, así como 0.7053 g de la segunda reacción. De ambas reacciones se realizó monitoreo por cromatografía de capa fina donde se observó la aparición de un compuesto no presente en el material de partida lo que sugiere sea el producto deseado.

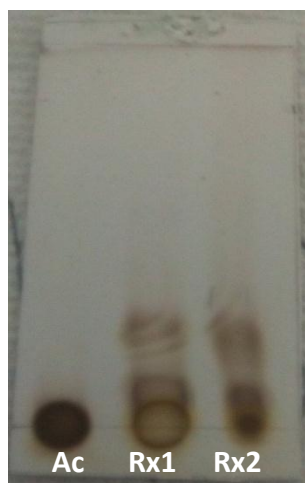


FIGURA 35. CCF *n*-HEXANO/ACETATO DE ETILO 30%



FIGURA 36. CCF *n*-HEXANO/ACETATO DE ETILO 50%

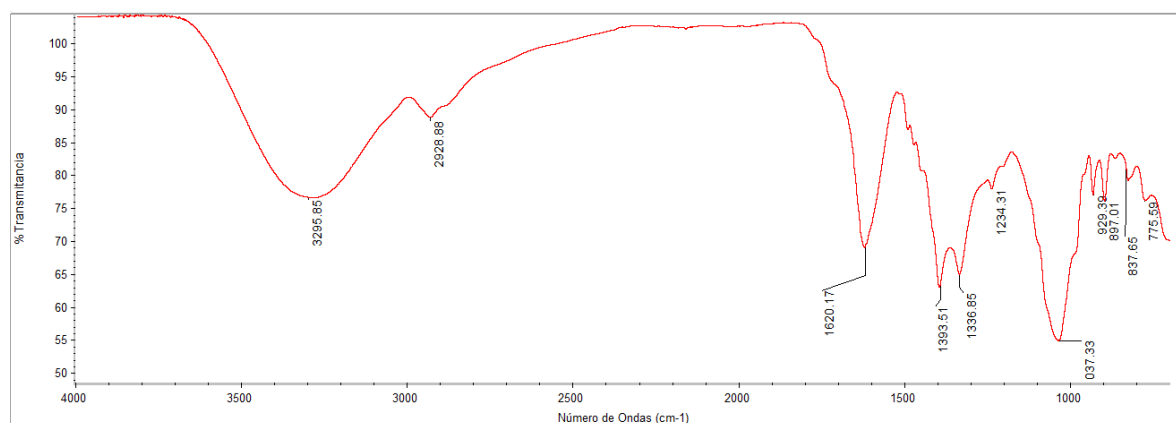


FIGURA 37. ESPECTRO INFRARROJO DE EXTRACTO ACUOSO.

Después de analizar por Espectroscopía infrarroja se observó la disminución de la banda a 3295 cm^{-1} característica de la presencia de grupos hidroxilo y la aparición de las bandas a 1744 cm^{-1} y 1747 cm^{-1} relacionadas con la presencia de grupos carbonilo.

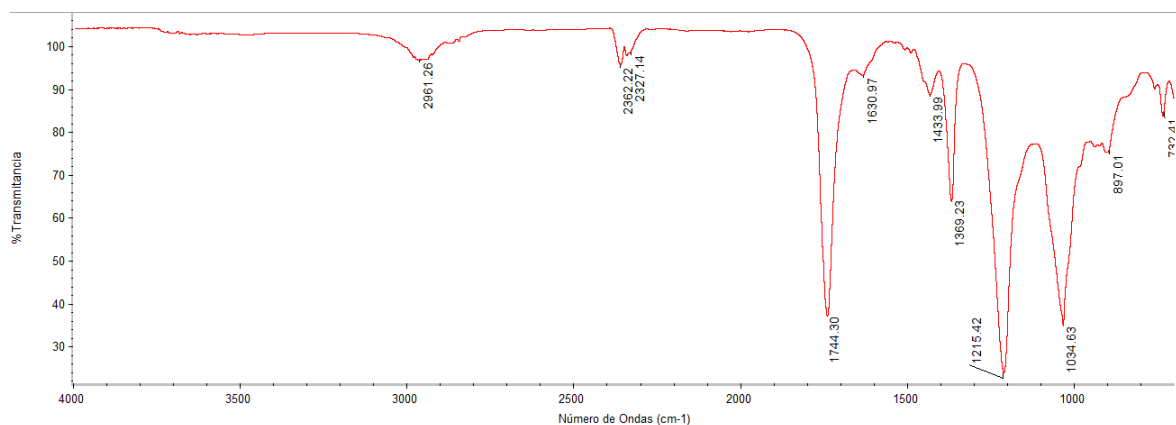


FIGURA 38. ESPECTRO INFRARROJO REACCIÓN 1 ACETILACIÓN.

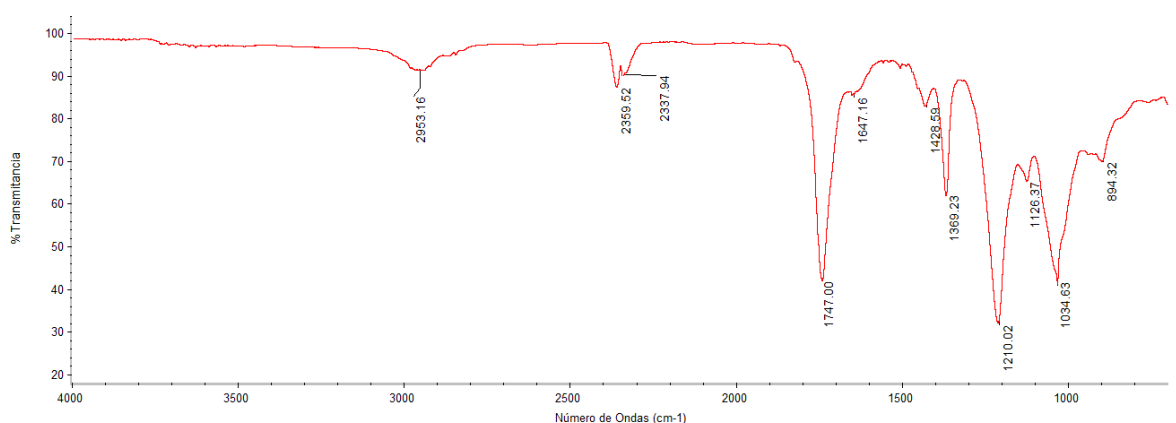


FIGURA 39. ESPECTRO INFRARROJO REACCIÓN 2 ACETILACIÓN.

El análisis del crudo de RX por CG-EM para obtener los cromatogramas y los espectros de masas (ver en Anexos) indicaron la presencia de varios posibles componentes que fueron acetilados, además de presentar a 43 m/z la señal característica de los grupos acetilo.

6.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

6.3.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Se obtuvieron 3 cepas clínicas con las siguientes características morfológicas colonial y microscópicamente:

- ⇒ B-1: Gram negativo, colonia color rosa, de 2-3 mm de diámetro, borde entero, circular, translúcida.
- ⇒ B-2: Gram positivo, colonia color amarilla, de 1-2 mm de diámetro, mate.
- ⇒ B-3: Gram positivo, Cepas color blancas, 0.5 mm de diámetro, mate, circular con borde entero.

De acuerdo a lo observado en el visor de BBL CRYSTAL se obtuvo los códigos correspondientes a B-1: *Escherichia coli*, B-2: *Staphylococcus warneri* y B-3: *Aerococcus urinae*.

Las cepas presentaron los siguientes resultados con sus antibióticos control.

TABLA 16. ANTIBIÓTICOS CONTROL B-1: *Escherichia coli*

Antibiótico		Diámetro cm	Sensibilidad
Ciprofloxacino	CIP	-----	R
Eritromicina	E	-----	R
Gentamicina	GM	-----	R
SMX/TMP	STX	2.8	S
Nitrofurantoina	FM	2.2	S
Ceftriaxona	CRO	3.15	S
Ampicilina	AM	-----	R
Amikacina	AN	2.1	S
Amoxicilina /Ácido clavulánico	AMC	1.9	S
Estreptomicina	S	1.2	R
Vancomicina	VA	1.2	R
Tetraciclina	TE	2.1	S



FIGURA 40. ANTIBIOGRAMA CONTROL DE B-1: *Escherichia coli*.

TABLA 17. ANTIBIÓTICOS CONTROL DE B-2: *Staphylococcus warneri*.

Antibiótico		Diámetro (cm)	Sensibilidad
Ciprofloxacino	CIP	2.8	S
Eritromicina	E	3.1	S
Gentamicina	GM	3.1	S
SMX/TMP	STX	3.2	S
Nitrofurantoina	FM	2	S
Penicilina	P	4	S
Ampicilina	AM	3.1	S
Clindamicina	CC	2.8	S
Bacitracina	BAC	-----	R
Estreptomicina	S	1.5	I
Vancomicina	VA	1.7	R
Tetraciclina	TE	2.6	S

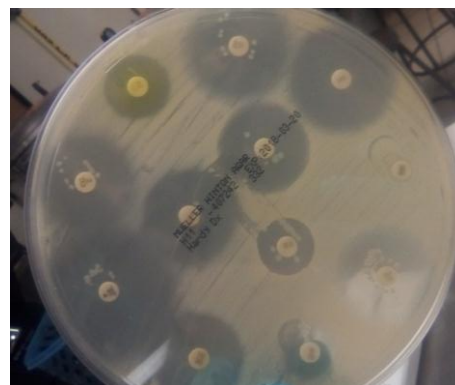


FIGURA 41. ANTIBIOGRAMA CONTROL DE B-2: *Staphylococcus warneri*.

TABLA 18. ANTIBIÓTICOS CONTROL DE B-3: *Aerococcus urinae*.

Antibiótico		Diámetro (cm)	Sensibilidad
Ciprofloxacino	CIP	3.3*	S
Eritromicina	E	NM	S
Gentamicina	GM	4	S
SMX/TMP	STX	NM*	S
Nitrofurantoina	FM	4.1*	S
Penicilina	P	NM	S
Ampicilina	AM	3.2	S
Clindamicina	CC	NM	S
Bacitracina	BAC	-----	R
Estreptomicina	S	2.4	S
Vancomicina	VA	2.8	S
Tetraciclina	TE	NM*	S

NM= No medible



FIGURA 42. ANTIBIOGRAMA CONTROL DE B-3: *Aerococcus urinae*.

Durante la observación de los antibiogramas realizados con las cepas se observó inhibición en algunos casos, sin embargo, algunas colonias fueron resistentes al antibiótico en el halo de inhibición. Se analizaron las colonias que presentaron resistencia por una identificación

en BBL CRYSTAL y por su morfología, y se pudo establecer que *Escherichia coli* fue la cepa resistente en B-2 y B-3.

6.3.1.2 TÉCNICA DE ANTIBIOGRAMA DE KIRBY-BAUER

No se presentó halo de inhibición en ninguna de las cepas evaluadas con ninguno de los extractos evaluados.

Cepa B-1: *Escherichia coli* vs Extractos



FIGURA 43. B-1 VS EXTRACTO 000.

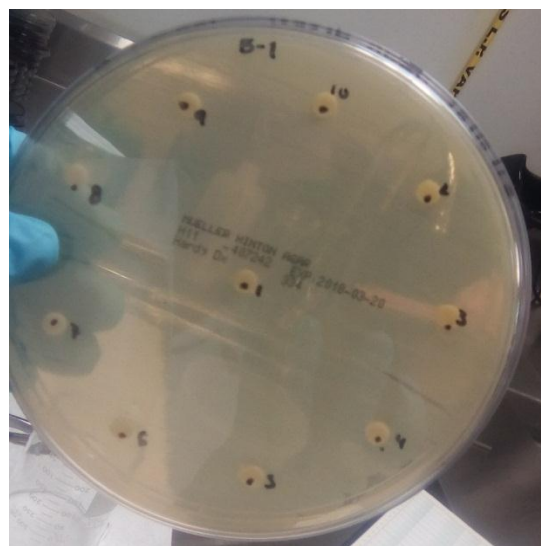


FIGURA 44. B-1 VS EXTRACTO 001



FIGURA 45. B-1 VS EXTRACTO 002

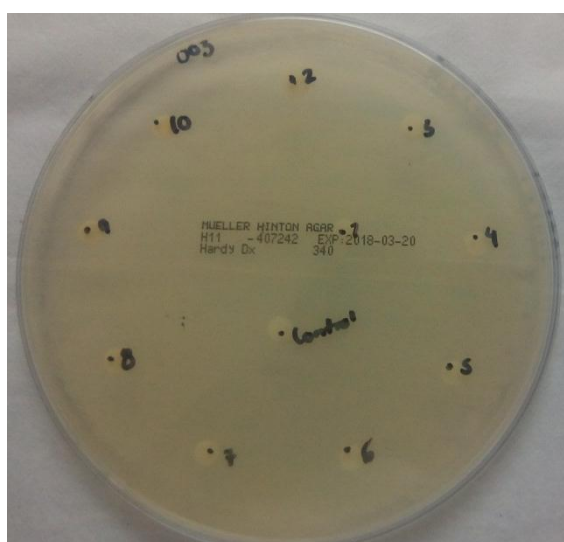


FIGURA 46. B-1 VS EXTRACTO 003

Extracto 000= crudo; Extracto 001= partición acuosa; Extracto 002= partición de acetato de etilo; Extracto 003= partición hexánica.

No hubo la presencia de halo de inhibición frente a *Escherichia coli*, con ninguno de los extractos.

Cepa B-2: *Staphylococcus warneri* vs Extractos



FIGURA 47. B-2 VS EXTRACTO 000



FIGURA 48. B-2 VS EXTRACTO 001

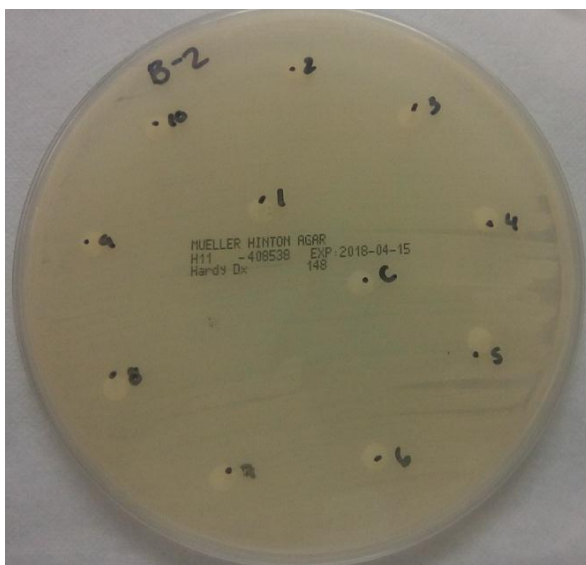


FIGURA 49. B-2 VS EXTRACTO 002

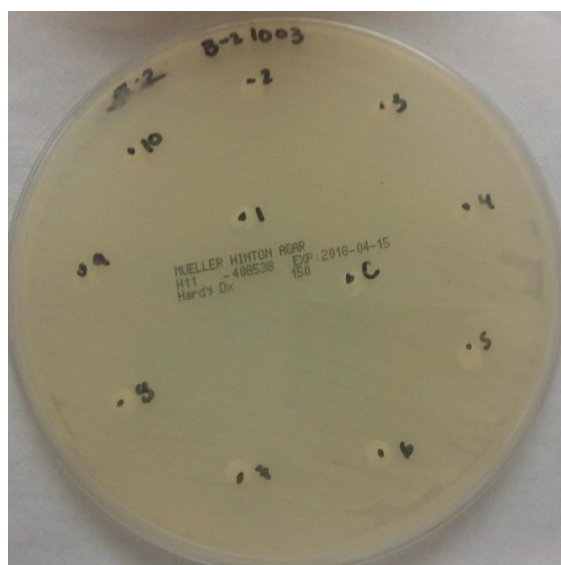


FIGURA 50. B-2 VS EXTRACTO 003

No hubo presencia de halos de inhibición frente a la cepa de *Staphylococcus warneri* de los extractos evaluados incluyendo los controles de Etanol (002) y DMSO (003).

Cepa B-3: *Aerococcus urinae* vs Extractos

FIGURA 51. B-3 VS EXTRACTO 000

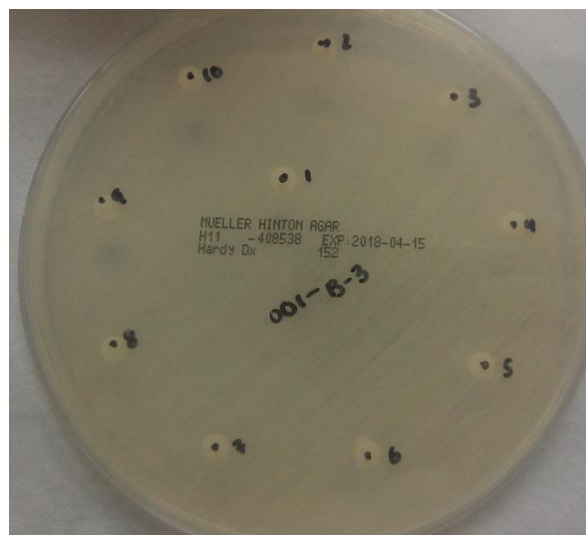


FIGURA 52. B-3 VS EXTRACTO 001



FIGURA 53. B-3 VS EXTRACTO 002

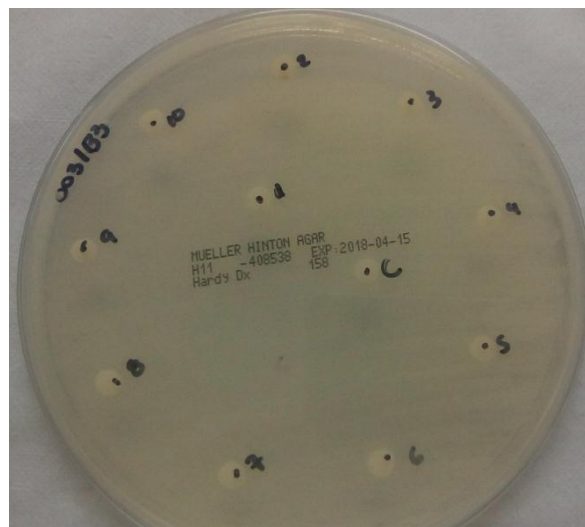


FIGURA 54. B-3 VS EXTRACTO 003

No hubo presencia de halos de inhibición con ninguno de los extractos evaluados frente a *Aerococcus urinae*, indicándonos que son resistentes a los componentes de dichos extractos.

TABLA 19. RESULTADOS ANTIMICROBIANOS PRELIMINARES.

Cepa	Ciprofloxacino	Eritromicina	Nitrofurantoina	E. crudo	E. acuoso	E. acetato de etilo	E. hexánico
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	R
<i>Staphylococcus warneri</i>	S	S	S	R	R	R	R
<i>Aerococcus urinae</i>	S	S	S	R	R	R	R

6.3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR LA TÉCNICA DE DISCO-PLACA

Después de 24 horas de incubación se revisaron los antibiogramas realizados obteniendo lo siguiente:

Pseudomonas aeruginosa: No hubo presencia de halo de inhibición por parte de ningún extracto, ni del control negativo ni el positivo.

Candida albicans: No hubo inhibición por parte del control positivo, solo hubo inhibición por parte del extracto de Acetato de etilo con un diámetro de 8 mm

Enterococcus faecalis: No hubo presencia de halo de inhibición por parte de ningún extracto, ni del control negativo ni el positivo.

Enterobacter aerogenes: Presencia de halo de inhibición de 19 mm de ampicilina, no hubo inhibición por parte de los extractos a excepción del acuoso que mostro 7 mm de diámetro de inhibición.

Salmonella typhimurium: Presencia de halo de inhibición de 22 mm de ampicilina, no hubo inhibición por parte de los extractos a excepción del acuoso que mostro 7 mm de diámetro de inhibición.

TABLA 20. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Cepa	Metanol	Antibiótico	E. crudo	E. acuoso	E. acetato de etilo	E. hexánico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Candida albicans</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	S	R	R	R	R
<i>Salmonella typhimurium</i>	R	S	R	R	R	R



FIGURA 55. *Pseudomonas aeruginosa*



FIGURA 56. *Candida albicans*



FIGURA 57. *Enterococcus faecalis*



FIGURA 58. *Enterobacter aerogenes*

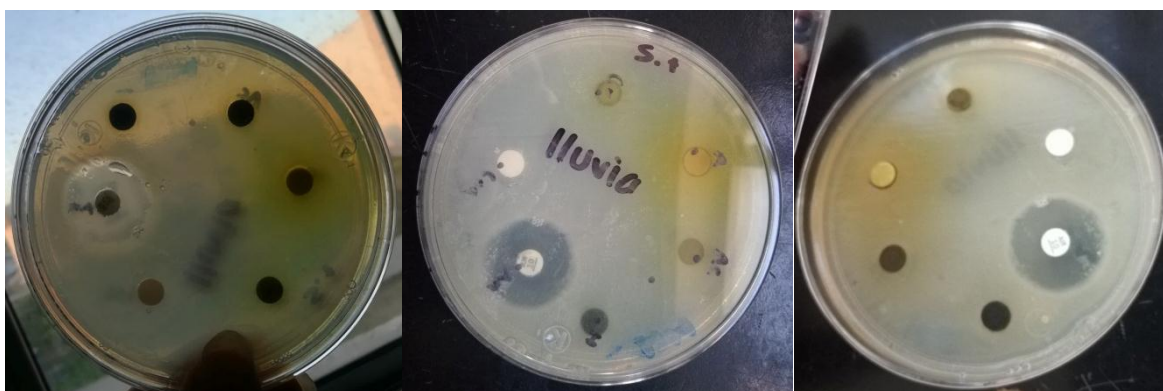


FIGURA 59. *Salmonella typhimurium*

Los ensayos antimicrobianos preliminares (ver tabla 19) mostraron que a concentraciones inferiores de 1 mg/mL no se tiene un efecto frente las cepas evaluadas, sin embargo, podría haberse debido a que la concentración era demasiado baja por lo que se planteó el incrementar la dosis de los sensidiscos.

Se realizaron más bioensayos antimicrobianos pero frente a cepas con resultado de inhibición conocido como *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* (Rojas *et al.*, 1992), mas sin embargo los resultados no fueron favorables al mostrar escasa o nula inhibición, por lo que se optó por utilizar cepas que son responsables de causar diarrea debido al conocimiento de su uso etnobotánicos, el resultado fue igual que con las cepas pasadas ya que no se mostró inhibición del crecimiento bacteriano.

Se plantea la posibilidad que *Chenopodium graveolens* más que actuar como un bactericida, actué como estimulante del crecimiento de la biota intestinal, lo que explicaría su uso en el tratamiento de padecimientos digestivos y los beneficios que le ha dado a quienes lo utilizan.

6.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

6.4.1 TÉCNICA DE FOLIN-CIOCALTEU PARA DETERMINAR COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Se evaluó la cantidad de polifenoles presentes en cada uno de los extractos obtenidos de *Chenopodium graveolens* por medio de la técnica de Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas, estos se expresan como $\mu\text{g}/100 \text{ g EAG}$.

TABLA 21. RESULTADOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO CRUDO.

	Experimento 1 ABS	Experimento 2 ABS	Experimento 3 ABS	Promedio de ABS	Cantidad Polifenoles ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ EAG)
A	0.008	0.011	0.016	0.0135	42.8182
B	0.014	0.01	0.012	0.012	42.1364
C	0.014	0.01	0.01	0.01133333	41.8333

TABLA 22. RESULTADOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO ACUOSO.

	Experimento 1 ABS	Experimento 2 ABS	Experimento 3 ABS	Promedio de ABS	Cantidad Polifenoles ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ EAG)
A	0.005	0.005	0.004	0.00466667	38.8030
B	0.005	0.005	0.004	0.00466667	38.8030
C	0.004	0.004	0.005	0.00433333	38.6515

TABLA 23. RESULTADOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.

	Experimento 1 ABS	Experimento 2 ABS	Experimento 3 ABS	Promedio de ABS	Cantidad Polifenoles ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ EAG)
A	0.067	0.1	0.093	0.08666667	76.0757
B	0.105	0.114	0.104	0.10766667	85.6212
C	0.079	0.11	0.089	0.09266667	78.8030

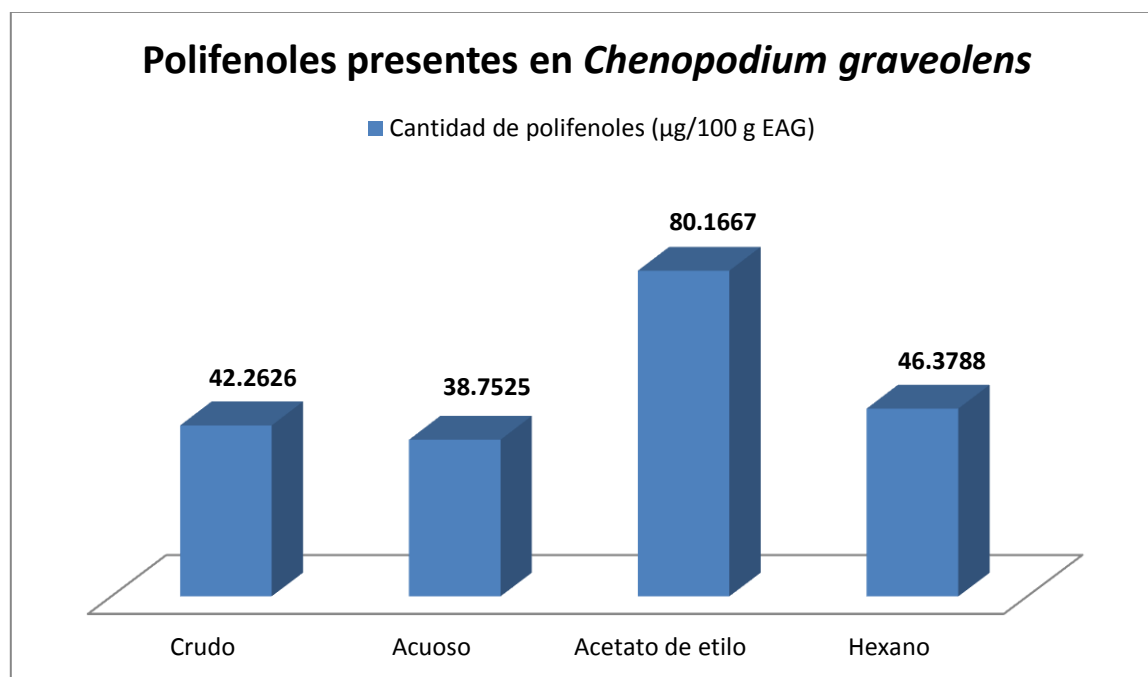
TABLA 24. RESULTADOS POLIENOS DEL EXTRACTO HEXÁNICO.

	Experimento 1 ABS	Experimento 2 ABS	Experimento 3 ABS	Promedio de ABS	Cantidad Polifenoles ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ EAG)
A	0.02	0.027	0.016	0.021	46.2273
B	0.02	0.024	0.02	0.02133333	46.3788
C	0.021	0.022	0.022	0.02166667	46.5303

TABLA 25. RESULTADOS POLIFENOS.

Extracto	Cantidad de polifenoles ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ EAG)	Desviación estándar
Crudo	42.2626	0.504
Acuoso	38.7525	0.087
Acetato de etilo	80.1667	4.916
Hexano	46.3788	0.151

Estos resultados indican que el extracto de acetato de etilo posee una mayor cantidad de polifenoles con respecto a los demás. El extracto acuoso mostró una menor cantidad de polifenoles inclusive menor que el extracto hexánico.



GRÁFICA 1. POLIFENOS PRESENTES EN *Chenopodium graveolens*

6.4.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH

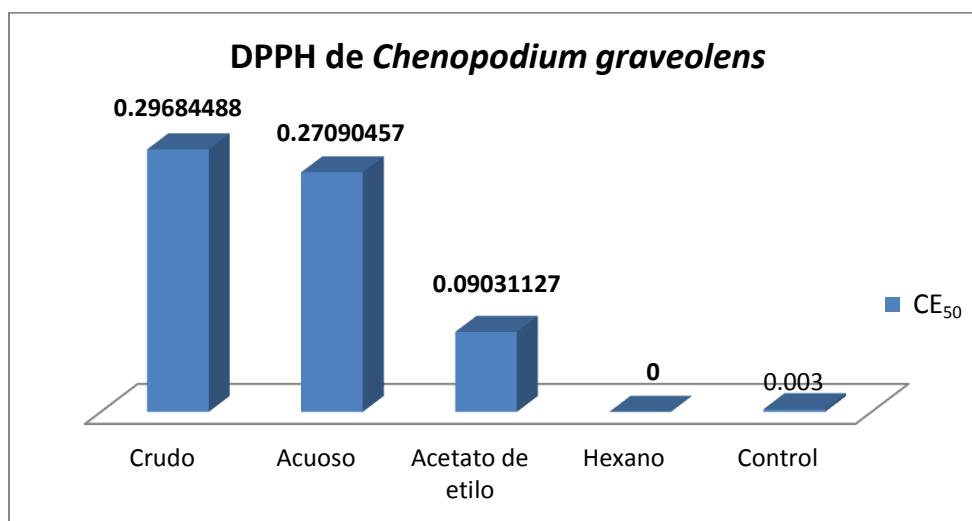
Se evaluó cada extracto por triplicado a fin de obtener la CE_{50} de cada uno por la técnica de DPPH. Obteniendo el resultado que se muestra en la tabla 26.

TABLA 26. RESULTADOS DE EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH.

Extracto	Experimento 1 (mg/mL)	Experimento 2 (mg/mL)	Experimento 3 (mg/mL)	CE_{50} promedio (mg/mL)	Desviación estándar
Crudo	0.2829	0.2861	0.3214	0.2968	0.021
Acuoso	0.2628	0.2791	0.2708	0.2709	0.008
Acetato	0.0876	0.0848	0.09851	0.0903	0.007
Hexano	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Control				0.003	

Los resultados obtenidos mostraron que el extracto de acetato de etilo presentó un mayor efecto antioxidante con respecto a los demás. De alguna manera era un resultado esperado debido a que fue el que presentó una mayor concentración de compuestos polifenólicos. El de menor actividad fue el extracto hexánico (menos del 20 %).

El control utilizado fue Quercetina que posee una CE_{50} de 0.003 mg/mL muy por debajo de las presentadas por el extracto crudo y sus particiones, por lo tanto no lograron superar al control.



GRÁFICA 2. DPPH DE *Chenopodium graveolens*

6.4.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE ABTS

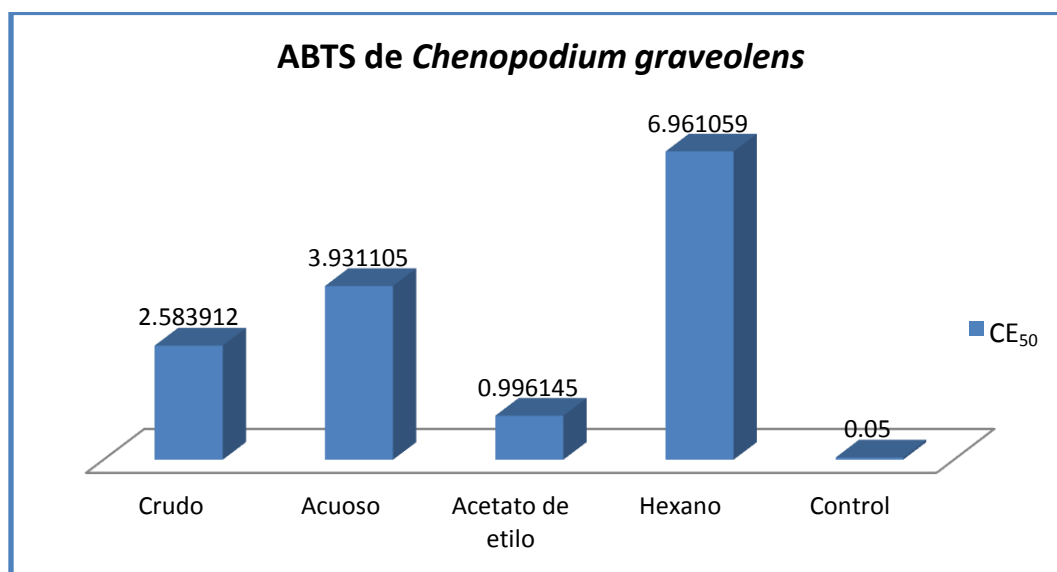
Se evaluaron cada uno de los extractos hasta la obtención de la CE_{50} obteniendo los resultados que se muestran en la tabla

TABLA 27. RESULTADOS EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE ABTS.

Extracto	Concentración	Experimento 1 (mg/mL)	Experimento 2 (mg/mL)	Experimento 3 (mg/mL)	CE_{50} promedio (mg/mL)	Desviación estándar
Crudo	2 mg	2.5863	2.5815		2.5839	0.003
Acuoso	2 mg	3.8207	3.9154	4.0571	3.9311	0.119
Acetato de etilo	1 mg	1.0302	0.9796	0.9786	0.9961	0.029
Hexano	5 mg	6.9274	6.9947		6.9610	0.048
Control	1 mg				0.05	

De los extractos evaluados con esta técnica de ABTS, la partición de acetato de etilo presentó una mayor actividad antioxidante, y una vez más el extracto de n-hexano fué el menos activo con una CE_{50} de casi 7 mg/mL. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en DPPH.

De igual manera se empleó el flavonoide Quercetina como control positivo teniendo una CE_{50} de 0.05 mg/mL.



GRAFICA 3. ABTS DE *Chenopodium graveolens*

6.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

6.5.1 COLUMNA CROMATOGRÁFICA EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Las 129 fracciones obtenidas de la columna cromatográfica del extracto de acetato de etilo, fueron monitoreadas por CCF y agrupadas en 14 reuniones. Después de eliminar el disolvente se obtuvieron sus respectivos pesos como se presentan en la tabla 28.

TABLA 28. PESO REUNIONES COLUMNA 1.

Reunión	Peso (mg)
1	5.4
2	6.7
3	2.4
4	54.4
5	16
6	29.7
7	203
8	211.5
9	164.8
10	81.5
11	155.7
12	341.8
13	224.6
14	213.3
15	2760

Durante el fraccionamiento de la columna cromatográfica se pudo observar la aparición de un precipitado blanco en los tubos de ensaye correspondientes a las fracciones de la reunión 11 (ver figura 61); además se observó la formación de cristales en la reunión 4 aislándose de esta 7.6 mg de un componente puro (ver figura 60). También en la reunión 9 se presentó un precipitado color amarillo.



FIGURA 60. CRISTAL REUNIÓN 4

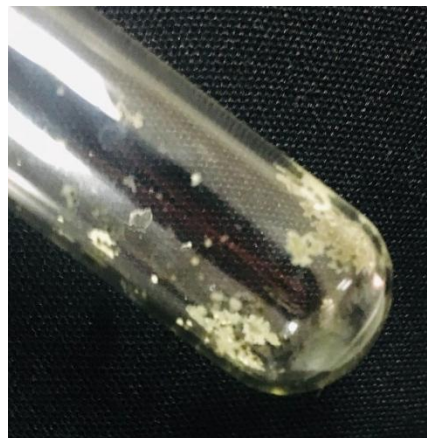


FIGURA 61. PRECIPITADO REUNIÓN 11

En el revelado con oleum la mancha amarilla de la reunion 2 paso de ser amarilla a ser de color café. Se intencificaron las manchas amarillas en la reunión 3, 4 y 5. Las manchas grises de la reunion 7 y 8 se tornaron un azul-verdoso. Y hubo la aparicion de manchas de color amarillas de la reunion 9 a la 14, así como la presencia de algunas manchas de color café y verde que antes eran de coloracion café.

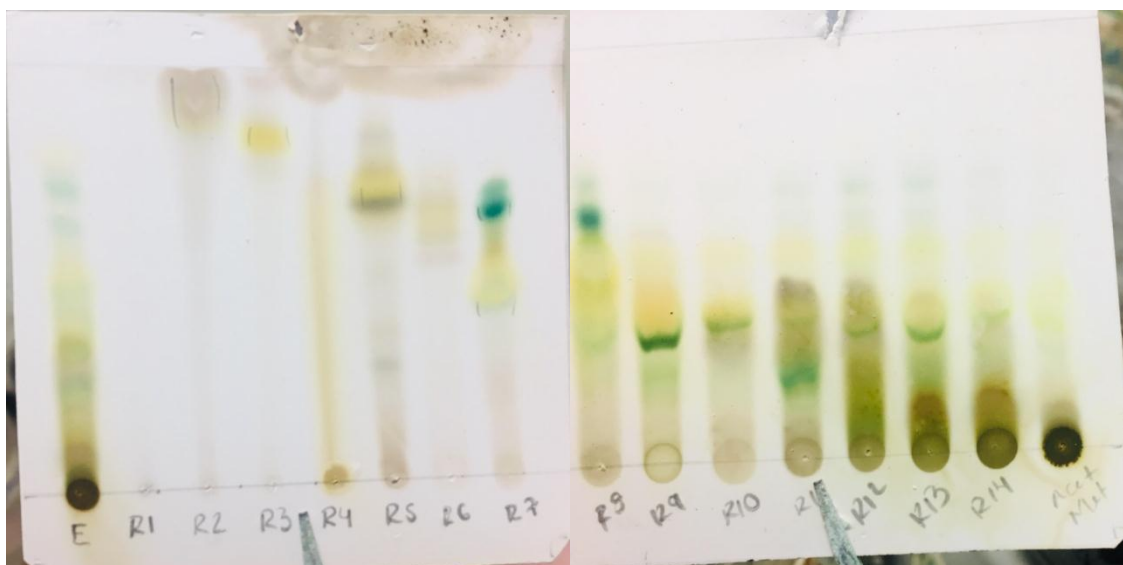


FIGURA 62. CROMATOGRAMA REVELADO EN OLEUM.

El revelado con oleum de la CCF comparativa de las reuniones, se presenta en la figura 62. Los pesos obtenidos de los productos que pudieron aislarse por precipitación o cristalización de las reuniones 4, 9 y 11 se indican en la tabla 29.

TABLA 29. PRODUCTOS OBTENIDOS DE LAS REUNIONES 4,9 Y 11

Compuesto	Reunión	Peso (mg)
Cristal transparente	R4	7
Precipitado amarillo	R9	11.4
Precipitado blanco	R11	1.07

Es importante mencionar que debido a la poca cantidad de compuesto aislado de la reunión 4, se realizó un percolado por columna de la misma reunión para obtener material suficiente que pueda ser utilizado en el análisis por CG-EM y RMN.

Para la purificación de este compuesto de la reunión 4, se realizaron varios lavados con *n*-hexano hasta eliminar la totalidad del color relacionado con posibles impurezas, dejando así un cristal de color blanco-cristalino que se formó principalmente en las paredes del recipiente utilizado.

Para confirmar la pureza relativa del compuesto aislado de R4, se realizó una CCF comparativa entre el cristal y R4 (ver figura 63).



FIGURA 63. CCF R4 Y EL CRISTAL AISLADO

Como puede observarse R4 presenta manchas ligeras que indican la presencia de componentes minoritarios. Sin embargo, predomina de manera mayoritaria el posible producto de interés.

PINOSTROMBINA (PD-1)

El cristal obtenido se llevó a un análisis por CG-EM presentando en el cromatograma dos picos con tiempos de retención de 7.32 y 7.44 min respectivamente. En el espectro de masas de ambos componentes se presentaron los mismos patrones de fragmentación, teniendo como ión molecular 270.29 m/z. Este compuesto se identificó como Pd-1. (ver Cromatograma en Anexos)

Se realizó una búsqueda en la base de datos del sistema de CG-EM buscando una molécula con un ion molecular y patrón de fragmentación similar, se localizó que la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-chalcona tiene un 82% de similaridad así como un patrón de fragmentación similar

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H mostró a campo alto con desplazamiento de 3.83 δ un singulete con integración para tres protones, correspondiente a los hidrógenos del metoxilo 7-OMe; a un desplazamiento de 3.15 y 2.87 δ se observaron dos dobles de dobletes con integración para un protón, lo cuales son asignables a los protones diastereotópicos alfa al carbonilo H-3a y H-3b ($J_1 = 17.2$ Hz, $J_2 = 12.8$ Hz y $J_1 = 17.2$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz respectivamente); por otro lado, el protón H-2, se observó como un doble de dobletes a un desplazamiento de 5.46 δ , con constantes de acoplamiento de $J_1 = 12.8$ Hz y $J_2 = 3.2$ Hz con H-3a y H-3b respectivamente; los protones aromático H-6 y H-8 del anillo A se observan como dobletes con integración para un protón (6.09 y 6.10 δ respectivamente). Todas las asignaciones pueden observarse resumidas en la siguiente tabla:

TABLA 30. DATOS DE RMN ^1H DEL COMPUESTO (Pd-1) REALIZADOS EN CDCl_3 .

Posición	δH	Posición	δH
2	5.46 (1H, dd, $J_1 = 12.8$ Hz; $J_2 = 3.2$ Hz)	2'	7.49 (5H, m)
3(a)	3.15 (1H, dd, $J_1 = 17.2$ Hz; $J_2 = 12.8$ Hz)	3'	7.49 (5H, m)
3(b)	2.87 (1H, dd, $J_1 = 17.2$ Hz; $J_2 = 3.2$ Hz)	4'	7.49 (5H, m)
6	6.09 (1H, d)	5'	7.49 (5H, m)
8	6.10 (1H, d)	6'	7.49 (5H, m)
7-OMe	3.83 (3H, s)	5-OH	12.04 (1H, s)

El espectro de RMN ^{13}C se observan 16 átomos de carbono, destaca la presencia a menor campo del carbono carbonílico (C-4) a 195.73 δ , seguido de los carbonos unidos a heteroátomo de oxígeno C-7, C-5 y C-9 con 168.01, 164.18 y 162.80 δ ; los carbonos α (C-3) y β (C-2) respecto al carbonilo a 43.39 y 79.23 δ respectivamente, así como el carbono,

correspondiente al metoxilo, a un desplazamiento de 55.68 δ . Todas las asignaciones pueden observarse resumidas en la siguiente tabla:

TABLA 31. DATOS DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO (Pd-1) REALIZADOS EN CDCl_3 .

Posición	δ_c	Posición	δ_c
2	79.23 (d)	10	103.18 (s)
3	43.39 (t)	7-OMe	55.68 (c)
4	195.73 (s)	1'	138.42 (s)
5	164.18 (s)	2'	126.13 (d)
6	95.17 (d)	3'	128.87 (d)
7	168.01 (s)	4'	128.87 (d)
8	94.28 (d)	5'	128.87 (d)
9	162.80 (s)	6'	126.13 (d)

En el experimento COSY se observó la correlación del protón 2 con los protones diastereotópicos H-3a y H-3b a tres enlaces.

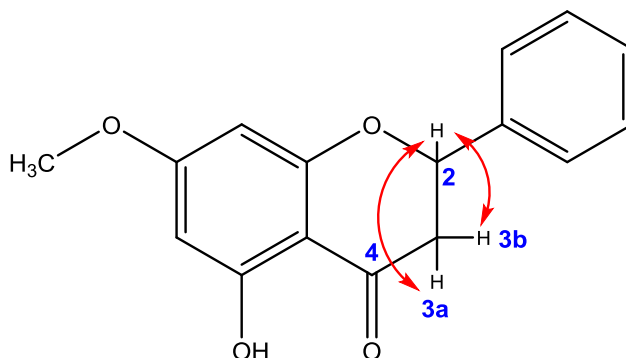


FIGURA 64. ACOPLAMIENTOS COSY DE Pd-1

Por otro lado, dentro de las correlaciones más importantes observadas en el experimento HMBC se destaca, dentro del anillo A, la del protón del hidroxilo 5-OH con C-6 y C-10 a tres enlaces, los protones del metoxilo (7-OMe) con C-7 a tres enlaces, y el protón H-8 con los carbonos C-6 y C-10 a tres enlaces, además con C-7 y C-9 a dos enlaces.

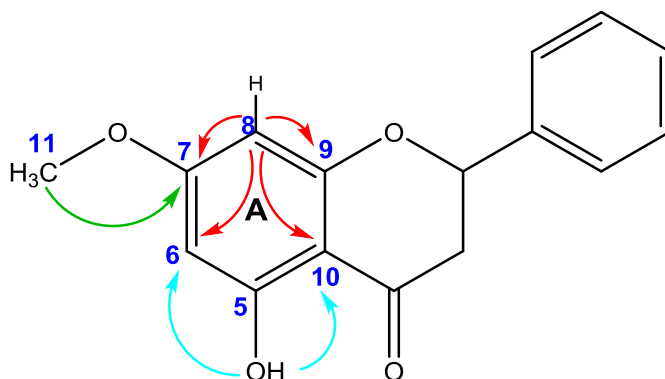


FIGURA 65. ACOPLAMIENTOS HMBC DE Pd-1.

En el anillo B, se observó el acoplamiento de los protones diaterotópicos con los carbonos C-4 y C-2 a dos enlaces, y a tres enlaces con C-1'; para el protón de la posición dos, se observó acoplamiento a tres enlaces con C-4, C-6' y C-2', y a dos enlaces con C-1'.

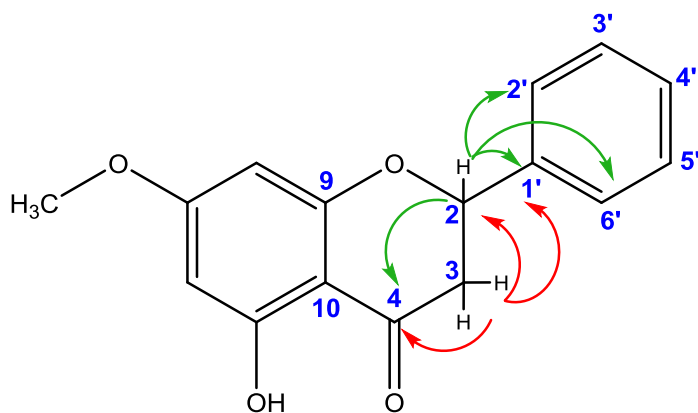


FIGURA 66. ACOPLAMIENTOS HMBC DE Pd-1.

TABLA 32. DATOS DE RMN ^1H , ^{13}C Y CORRELACIONES COSY, HSQC Y HMBC DEL COMPUESTO (Pd-1) REALIZADOS EN CDCl_3 .

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	1H RMN			HSQC	Bidimensionales	
		Multiplicidad	Integración	J (Hz)		COSY	HMBC
2	5.46	dd	1H	$J_1 = 12.8$ $J_2 = 3.2$	79.23 (d)	H-3a, H-3b	C-1', C-2', C-6', C-4
3	3a = 3.15 3b = 2.87	dd	1H	$J_1 = 17.2$ $J_2 = 12.8$	43.39 (t)	---	C-4, C-1', C-2
		dd	1H	$J_1 = 17.2$ $J_2 = 3.2$			
4	---	---	---	---	195.73 (s)	---	---
5	---	---	---	---	164.18 (s)	---	---
6	6.09	d	1H	---	95.17 (d)	---	---
7	---	---	---	---	168.01 (s)	---	---
8	6.10	d	1H	---	94.28 (d)	---	C-6, C-10, C-7, C-9
9	---	---	---	---	162.80 (s)	---	---
7-OMe	---	---	---	---	103.18 (s)	---	---
11	3.83	s	3H	---	55.68 (c)	---	C-7
1'	---	---	---	---	138.42(s)	---	---
2'	7.49	m	5H	---	126.13 (d)	---	C-2, C-1', C-3', C-4', C-6'
3'	7.49	m	5H	---	128.87 (d)	---	---
4'	7.49	m	5H	---	128.87 (d)	---	---
5'	7.49	m	5H	---	128.87 (d)	---	---
6'	7.49	m	5H	---	126.13 (d)	---	C-2, C-1', C-5', C-4', C-2'
5-OH	12.04	s	1H	---	---	---	C-6, C-10

6.5.2 COLUMNA CROMATOGRAFICA 2, REUNIÓN 6

De las 57 fracciones derivadas de R6 se obtuvieron 2 reuniones. En una de ellas se identificó por CCF un compuesto candidato a aislamiento. De estas se obtuvieron los siguientes pesos:

TABLA 33. PESOS DE REUNIONES DE COLUMNA 2.

Reunión	Peso (mg)
Reunión 1	12.5
Reunión 2	15.8

En la reunión 2 fue localizado el compuesto de interés, que fue secado y analizado por CG-EM y fue identificado como Pd-2.

CUMARINA (PD-2)

De acuerdo a lo obtenido en el CG-EM, Pd-2 mostró un tiempo de retención a los 4.24 min y en el espectro de masas se identificó un ion molecular de 147 m/z.

El análisis por resonancia magnética nuclear de protón permitió confirmar la estructura del compuesto debido a la presencia de dos señales a 7.73 y 6.45 ppm observadas como dobletes con integración para un hidrógeno, el cálculo de las constantes de acoplamiento mostró valores de $J = 9.2$ Hz, típicas de acoplamientos vecinales de tipo *cis* en el sistema $\alpha\beta$ -insaturado (H-3 y H-4); el resto de las señales aromáticas se presentan en la tabla 34.

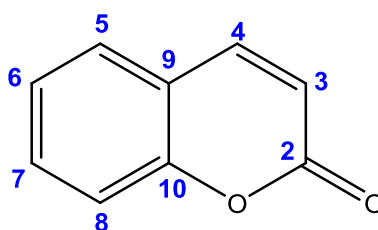


FIGURA 67. ESQUELETO Y NUMERACIÓN DE LA CUMARINA

Por otro lado, los experimentos de carbono 13 mostraron como señales más representativas las del carbonilo de la lactona a 160.71 ppm; en 116.73 y 143.37 ppm los desplazamientos correspondientes a los carbonos C-3 y C-4 del sistema vinílico; el resto de las señales aromáticas se presentan en la tabla 34.

TABLA 34. DATOS DE RMN ^1H , ^{13}C Y CORRELACIONES HSQC Y HMBC DEL COMPUESTO (Pd-2) REALIZADOS EN CDCl_3 .

Posición	^1H RMN				Bidimensionales	
	δH	Multiplicidad	Integración	J (Hz)	HSQC	HMBC
2	---	---	---	---	160.71 (s)	---
3	6.45	d	1H	$J=9.2$	116.73 (d)	C-2, C-9
4	7.73	d	1H	$J=9.2$	143.37 (d)	C-2, C-10
5	7.57	m	2H	---	131.81 (d)	C-4, C-7, C-10
6	7.36	d	1H	---	116.90 (d)	C-9
7	7.57	m	2H	---	127.84 (d)	C-5, C-10
8	7.31	m	1H	---	124.40 (d)	C-9
9	---	---	---	---	118.86 (s)	---
10	---	---	---	---	154.09 (s)	---

6.5.3 COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3, REUNIÓN 8.

Se recolectaron 55 fracciones de la columna realizada las cuales fueron revisadas por medio de cromatográfica de capa fina a fin de determinar las reuniones a formar.

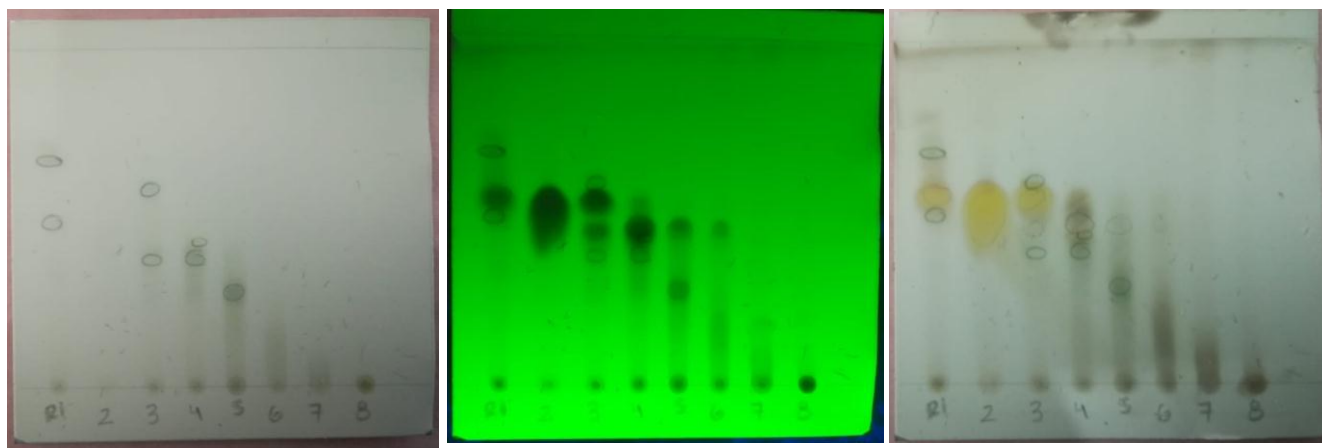
Las 55 fracciones fueron agrupadas en 8 reuniones debido a sus semejanzas ya sea en un revelado ultravioleta y/o con óleum. Todas ellas fueron secadas y almacenadas para la realización del posterior cromatograma.

A continuación se muestran las reuniones obtenidas:

TABLA 35. PESOS DE REUNIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA 3.

Reunión	Peso (mg)
1	9.3
2	83.4
3	100.3
4	4.4
5	1.4
6	4.09
7	2.45
8	2.52

Una vez obtenidos los pesos se realizó el cromatograma completo de la columna para la observación del patrón de separación.



**FIGURA 68. CROMATOGRAMA DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE REUNIÓN 8.
(RECORRIDO NORMAL, REVELADO EN LUZ UV, REVELADO CON OLEUM)**

7. CONCLUSIONES

La evaluación de compuestos polifenólicos por el método de Folin-Ciocalteu de los extractos obtenidos de *Chenopodium graveolens*, condujo como principal resultado que el extracto de acetato de etilo contiene la mayor cantidad de estos componentes.

Los resultados de actividad antiradicalaria por las técnicas de DPPH y ABTS mostraron que la partición de acetato de etilo presentó el mejor perfil antioxidante. Estos datos sugieren una correlación entre la concentración de compuestos polifenólicos de este extracto y su efecto de inhibición oxidativa.

En los bioensayos antimicrobianos de *Chenopodium graveolens* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus warneri* y *Aerococcus urinae*, se pudo determinar que los extractos derivados de esta planta son inactivos para inhibir el crecimiento de estas cepas.

En los experimentos antimicrobianos de *Chenopodium graveolens* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella typhimurium* se determinó inactivos los extractos evaluados para inhibir el crecimiento de estas cepas.

Del extracto de acetato de etilo se pudieron aislar los metabolitos secundarios **Pinostrobin** y **Cumarina**, ambos caracterizados estructuralmente por espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

8. BIBLIOGRAFÍA

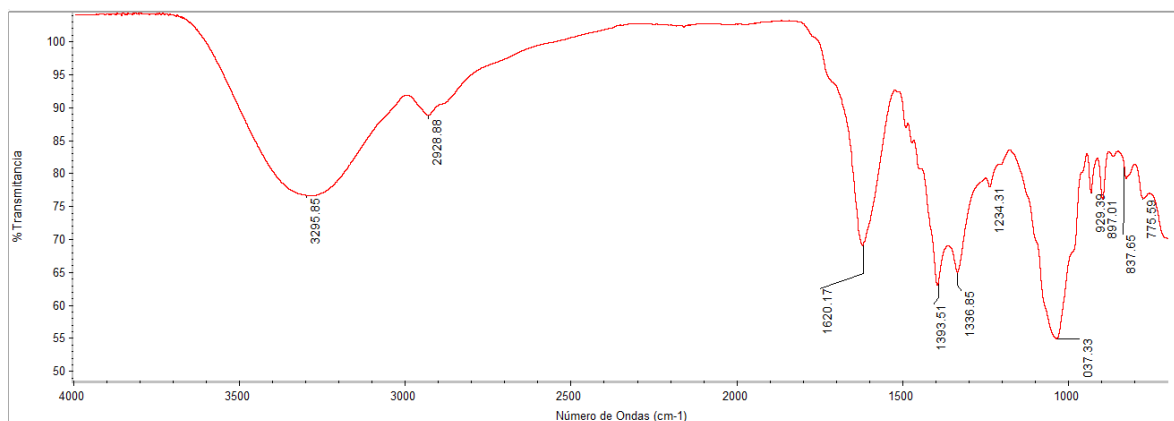
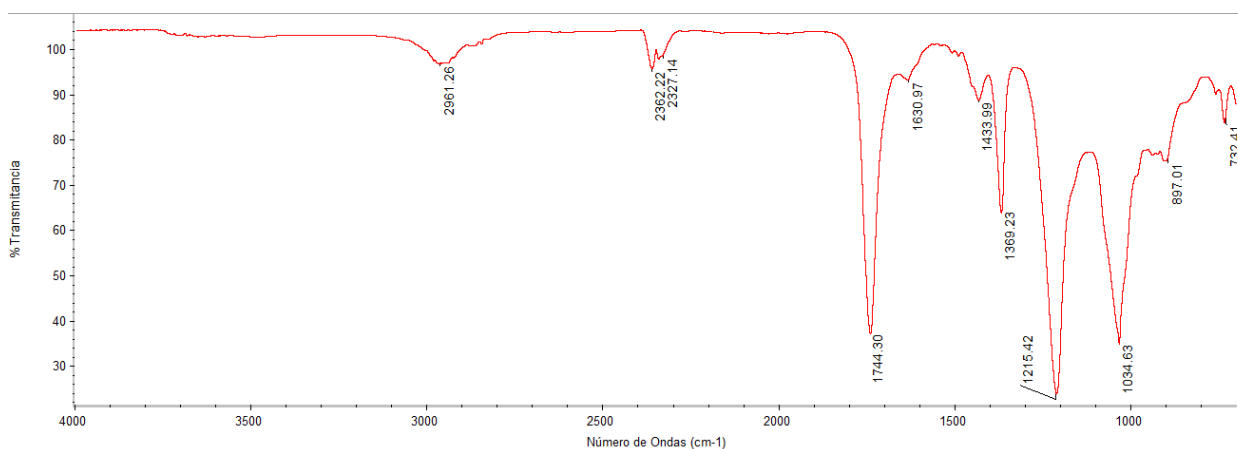
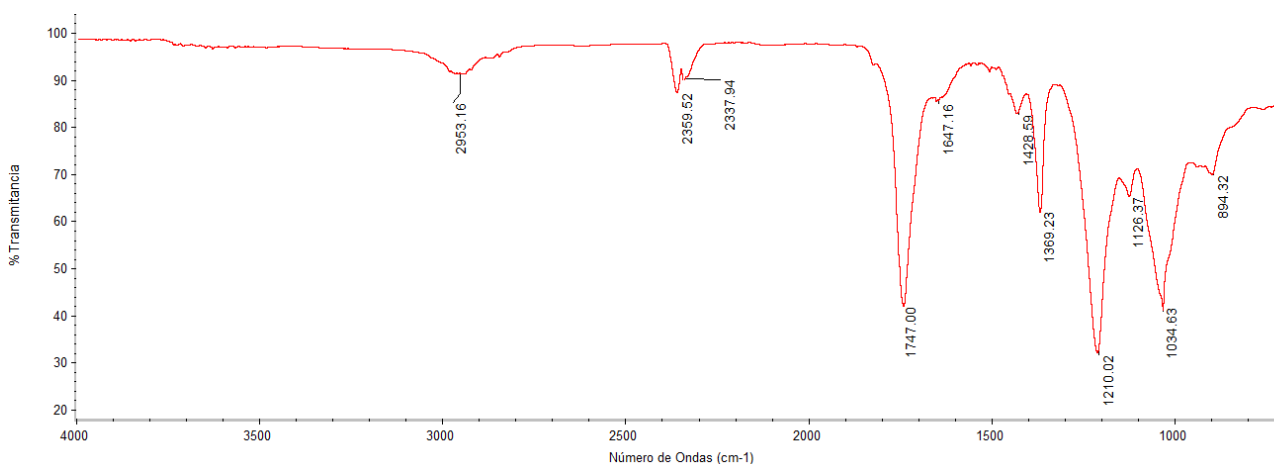
- Alberto J. Núñez Sellés. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37(5), 644–660. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662011000500013
- Álvarez-Ospina, H., Rivero Cruz, I., Duarte, G., Bye, R., & Mata, R. (2013). HPLC determination of the major active flavonoids and GC-MS analysis of volatile components of *Dysphania graveolens* (Amaranthaceae). *Phytochemical Analysis*, 24(3), 248–254. <https://doi.org/10.1002/pca.2405>
- Bye Jr., R. A. (1986). Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*, 40(1), 103–124. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4254834>
- Calzada, F., Velázquez, C., Cedillo-Rivera, R., & Esquivel, B. (2003). Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytotherapy Research*, 17(7), 731–732. <https://doi.org/10.1002/ptr.1192>
- Cao, G., Ying, P., Yan, B., Xue, W., Li, K., Shi, A., ... Hu, X. (2015). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of single and multiple-doses of pinocembrin injection administered intravenously in healthy subjects. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.041>
- CLSI. (2015). *M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Information Supplement*.
- Coronado Salvador Vega León Rey Gutiérrez T Marcela Vázquez F Claudia Radilla V, M. H. (2015). *Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana Antioxidants: present perspective for the human health*. *Rev Chil Nutr* (Vol. 42). Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
- Cortez-Gallardo, V., P Macedo-Ceja, J., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., & F Rodríguez-Landa, J. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*, 15(2), 123–136. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v15i2.381>
- Déciga-Campos, M., Mata, R., & Rivero-Cruz, I. (2017). Antinociceptive pharmacological profile of *Dysphania graveolens* in mouse. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 933–938. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.096>
- Devi, R. J., & Chrungoo, N. K. (2017). Evolutionary divergence in *Chenopodium* and validation of SNPs in chloroplast rbc L and mat k genes by allele-specific PCR for development of *Chenopodium quinoa* -specific markers. *The Crop Journal*, 5(1), 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.06.019>
- Echavarria, A., D'Armas Regnault, H., Lisbeth, N., Matute, L., Jaramillo, C., Rojas de

- Astudillo, L., & Benitez, R. (2018). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales / Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Ciencia Unemi*, 9(20), 29. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp29-35p>
- Elejalde Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 50–59. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010
- Fuentes-Bazan, S., Mansion, G., & Borsch, T. (2012). Towards a species level tree of the globally diverse genus *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 359–374. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.10.006>
- Gadano, A., Gurni, A., López, P., Ferraro, G., & Carballo, M. (2002). In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00418-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00418-4)
- González-Maciél, A., Palencia Hernández, G., González-Hernández, I. E., Ramos-Morales, A., Palomares-Alonso, F., Juárez Rocha, V., ... Jung-Cook, H. (2015). Cysticidal activity of extracts and isolated compounds from *Teloxys graveolens*: In vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitology*, 156, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.06.001>
- MARIA DEL RAYO CAMACHO, BERTA SANCHEZ, HECTOR QUIROZ, J. L. C. R. M. (1991). PINOCEMBRINE: A BIOACTIVE FLAVANONE FROM *TELOXYS GRAVEOLENS*. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 383–389.
- Mata, R., Gel, R. O., Alvarez, L., & Ci, R. M. (1987). Flavonoids and Terpenoids of *Chenopodium*. *Phytochemistry*, 26(1), 191–193.
- Meckes, M., Paz, D., Acosta, J., & Mata, R. (1998). The effects of chrysin and pinostrobin, two flavonoids isolated from *Teloxys graveolens* leaves, on isolated guinea-pig ileum. *Phytomedicine*, 5(6), 459–463. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80042-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80042-1)
- Moloney, M. G. (2016). Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.001>
- Ocegueda, S., E. Moreno, P. K. (2005). P L A N T A S UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL Y SU IDENTIFICACIÓN CIENTÍFICA. *CONABIO. Biodiversitas*, 62, 12–15. Retrieved from <https://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv62art3.pdf>
- OMS. (2010). OMS | Capítulo 1: Salud mundial: retos actuales. *WHO*. Retrieved from <https://www.who.int/whr/2003/chapter1/es/index3.html>
- Quiñones Pérez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales

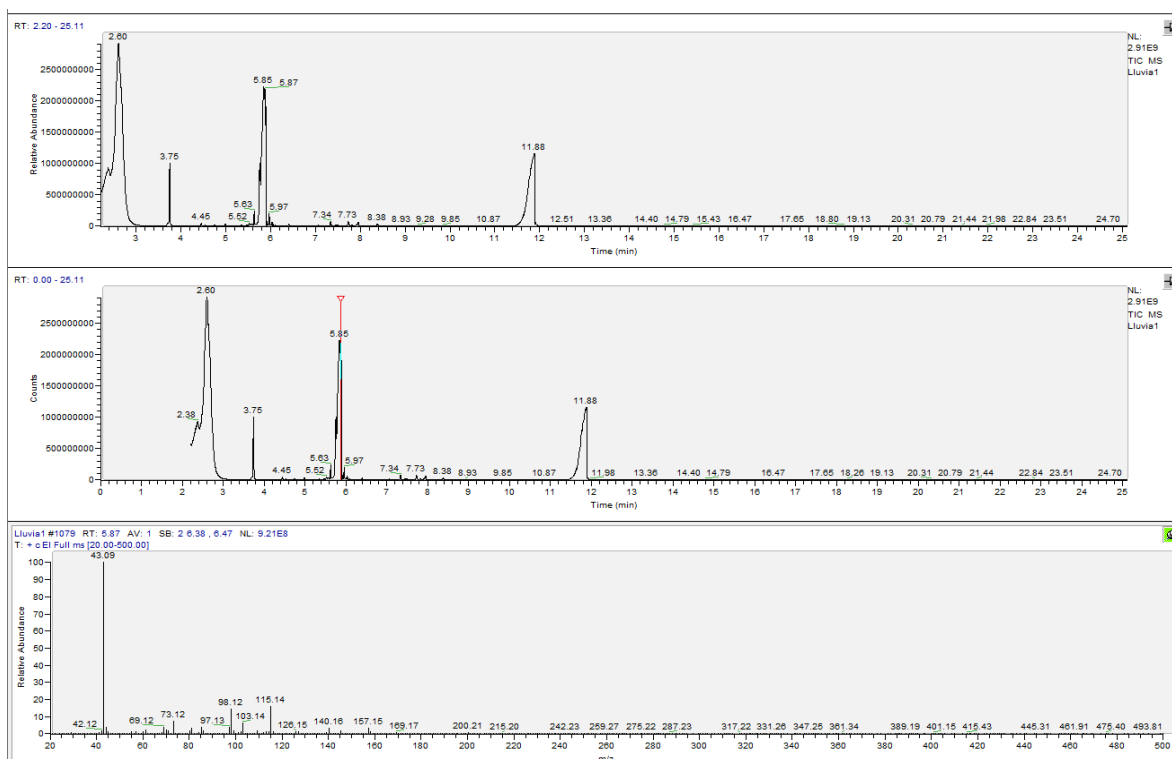
- ante el enfoque "Una salud" *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1–17. Retrieved from <http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu>
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., & Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90025-M](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90025-M)
- Simon, L. E. (1996). Notas sobre *Chenopodium* l. surgen. ambrosia a j . scott (*Chenopodiaceae*). 1. taxonomía. 2. fitogeografía: áreas disjuntas. *Anales Jardin Botanico de Madrid*, 54(1), 137–148.
- UNAM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Epazote de Zorrillo. Retrieved April 8, 2018, from [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Chenopodium graveolens&id=7647](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Chenopodium%20graveolens&id=7647)
- United States Department of Agriculture (USDA) The PLANTS Database. (2019). *Dysphania graveolens* (Willd.) Mosyakin & Clemants. Retrieved March 24, 2019, from <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=DYGR>
- Vicente Sanchez-Valle, N. M.-S. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedades. *Revista de Investigación Médica Sur*, 20(3), 161–168. Retrieved from <http://medicasur.org.mx/pdf-revista/RMS133-AR01-PROTEGIDO.pdf>
- Yagui, M. (2018). Resistencia antimicrobiana: nuevo enfoque y oportunidad. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 35(1), 7–8. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3594>

9. APÉNDICES

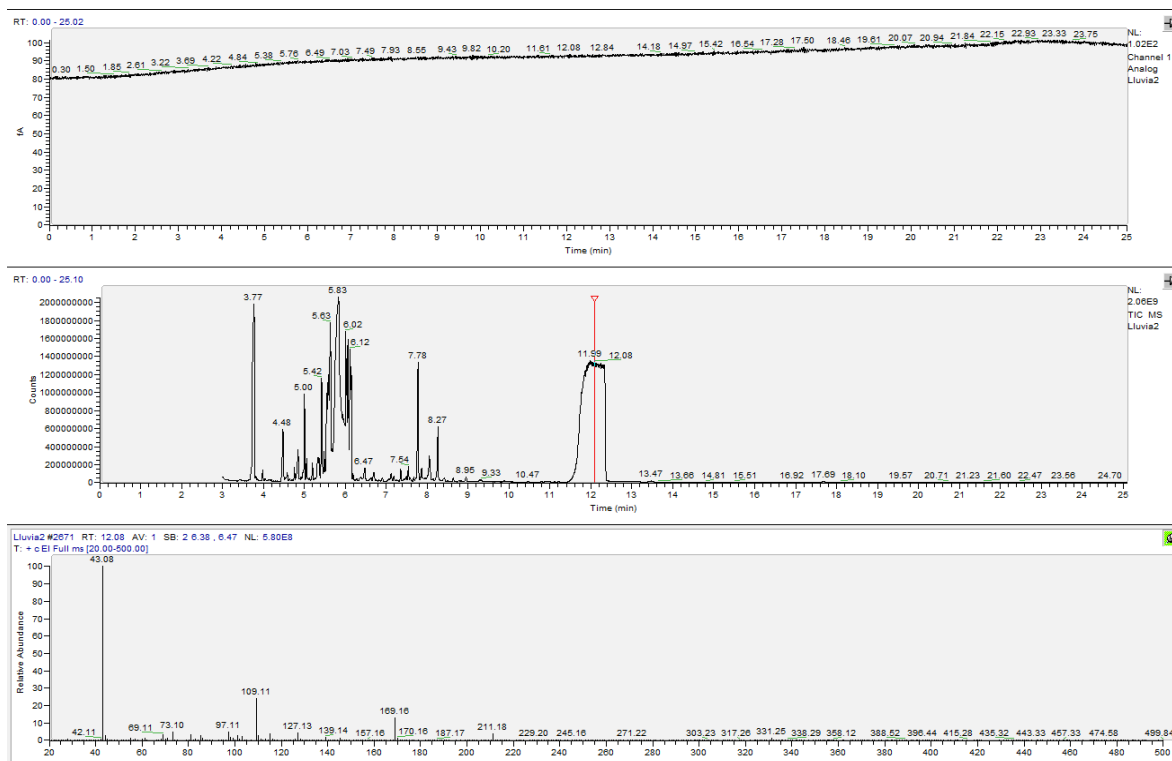
9.1 ANEXOS

ANEXO 1. ESPECTRO INFRARROJO DE PARTICIÓN ACUOSA.**ANEXO 2. ESPECTRO INFRARROJO DE REACCIÓN 1 DE ACETILACIÓN.****ANEXO 3. ESPECTRO DE INFRAROJO DE REACCIÓN 2 DE ACETILACIÓN.**

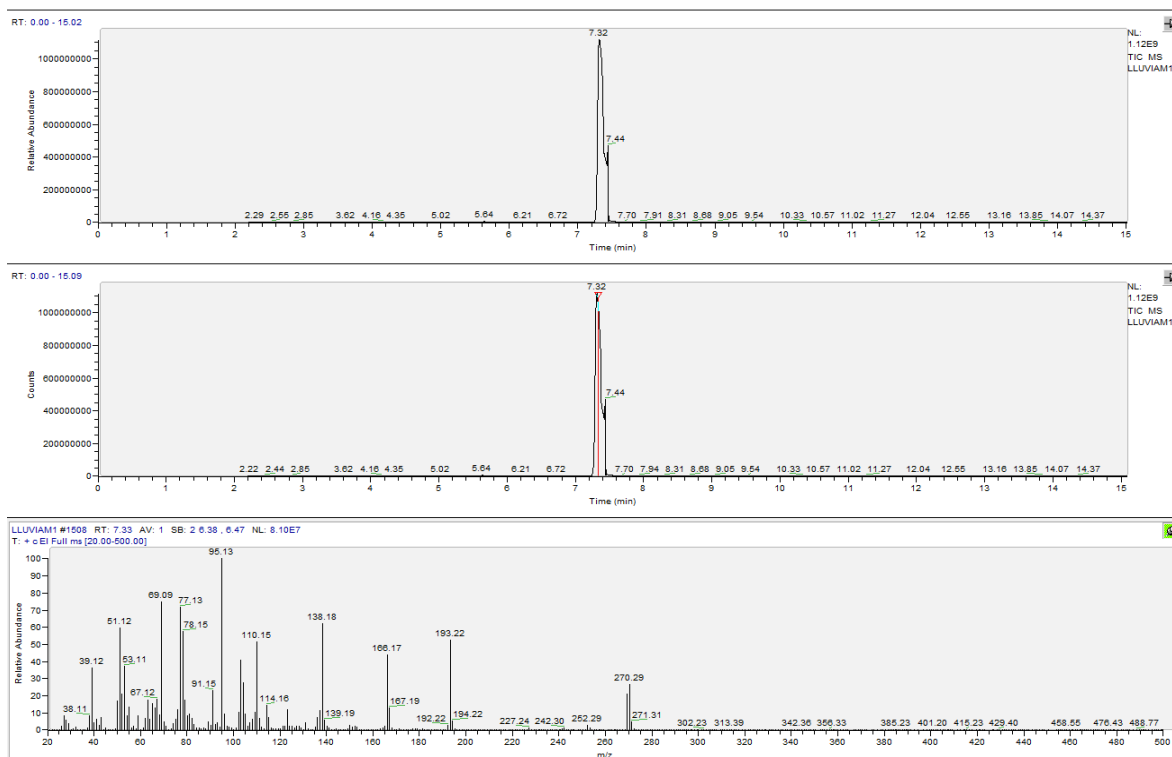
ANEXO 4. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE REACCIÓN 1 DE ACETILACIÓN.



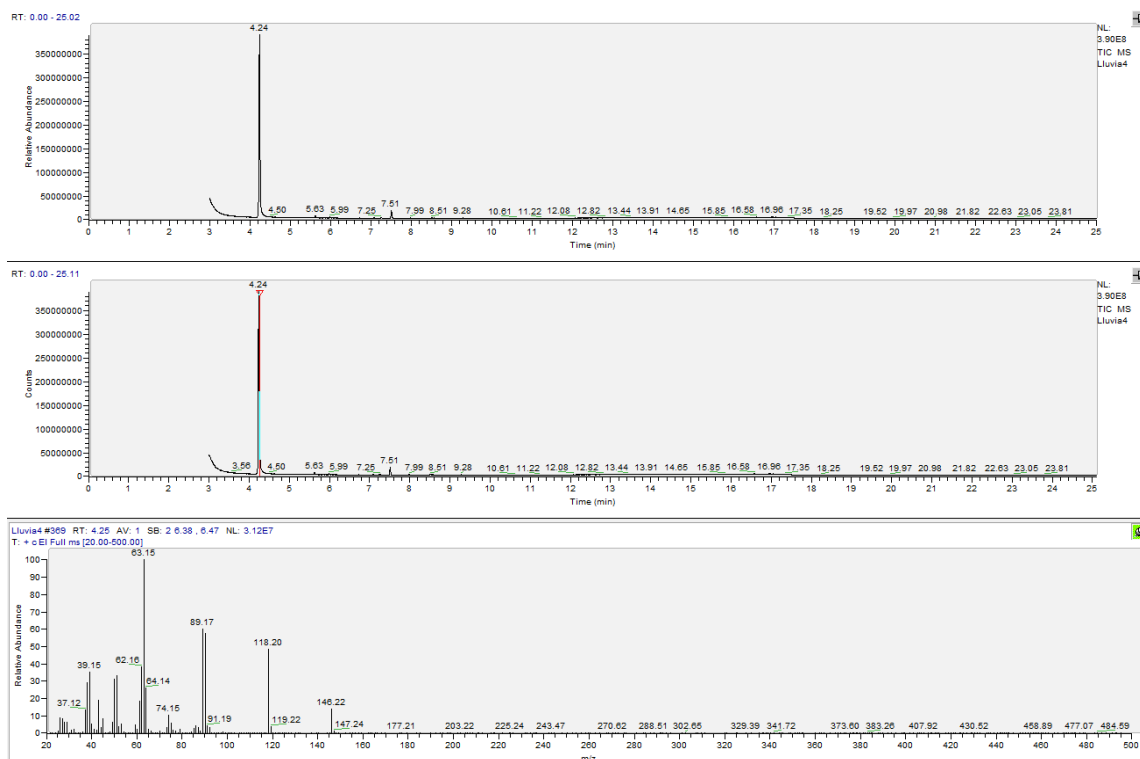
ANEXO 5. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE REACCIÓN 2 DE ACETILACIÓN.



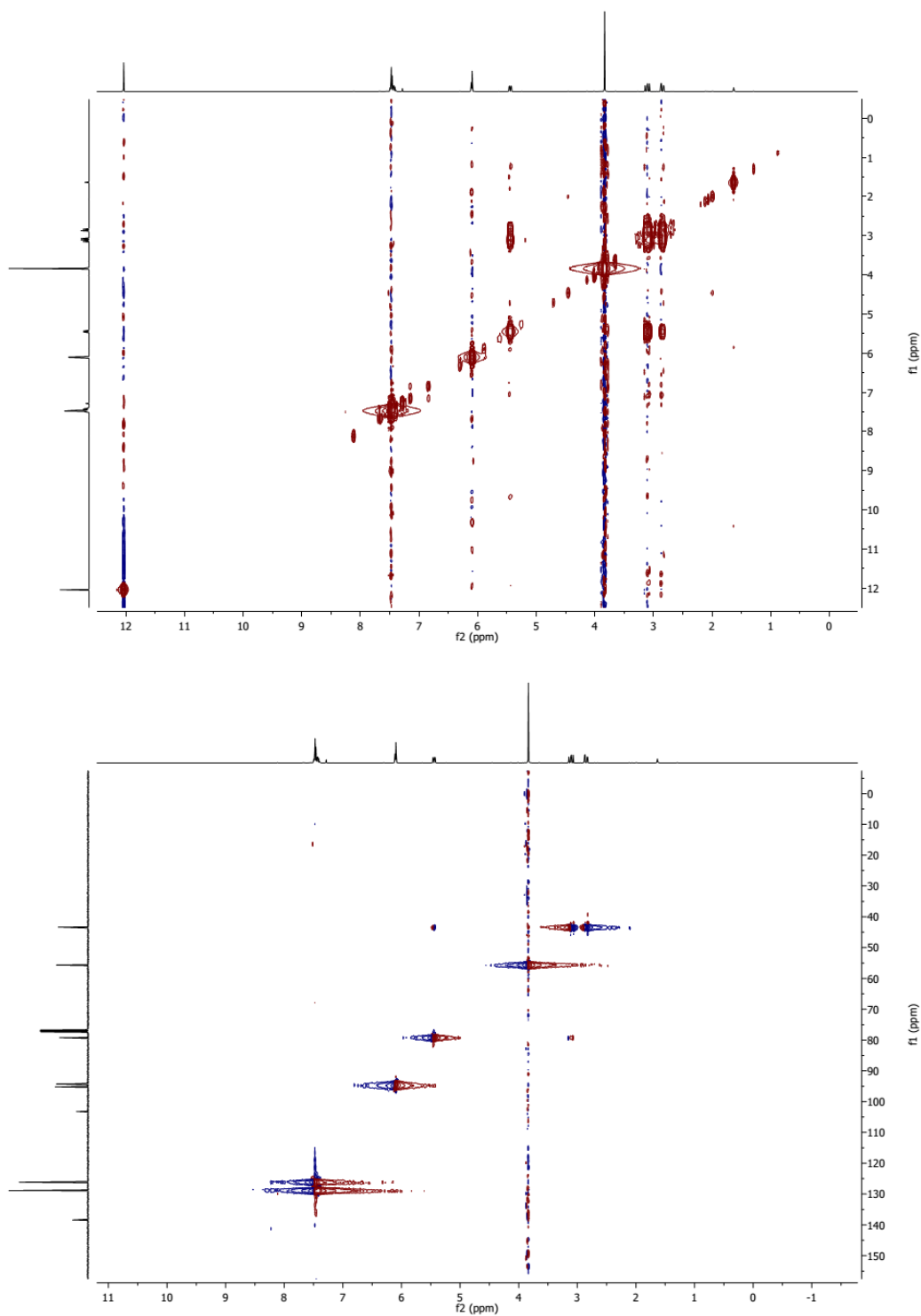
ANEXO 6. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE Pd-1.

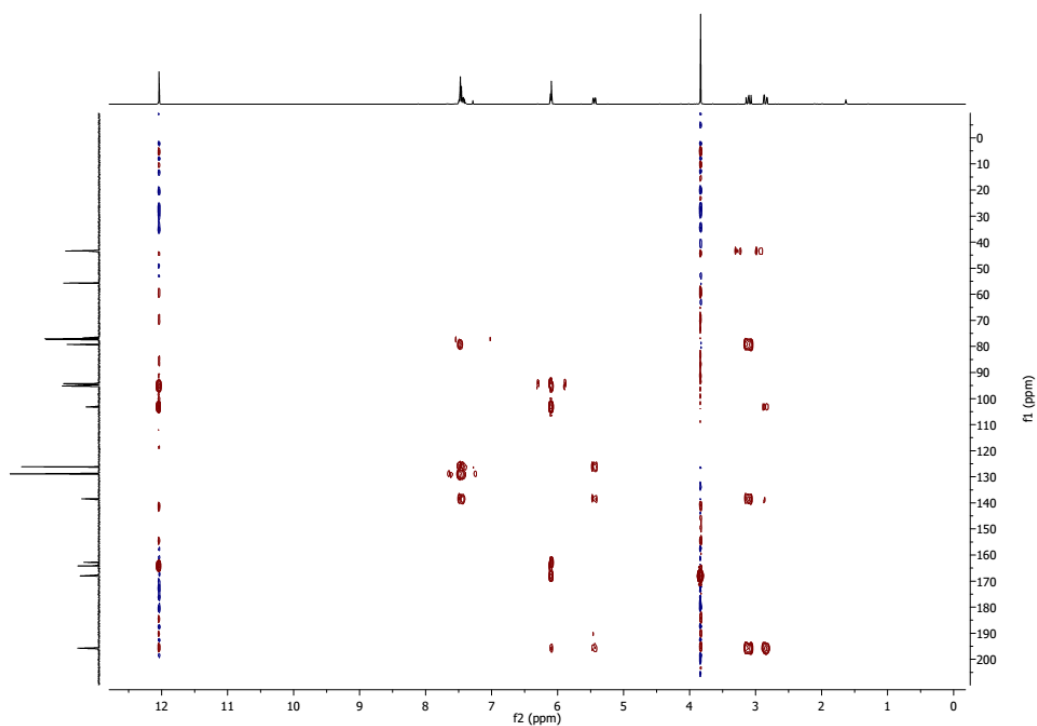


ANEXO 7. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE Pd-2.

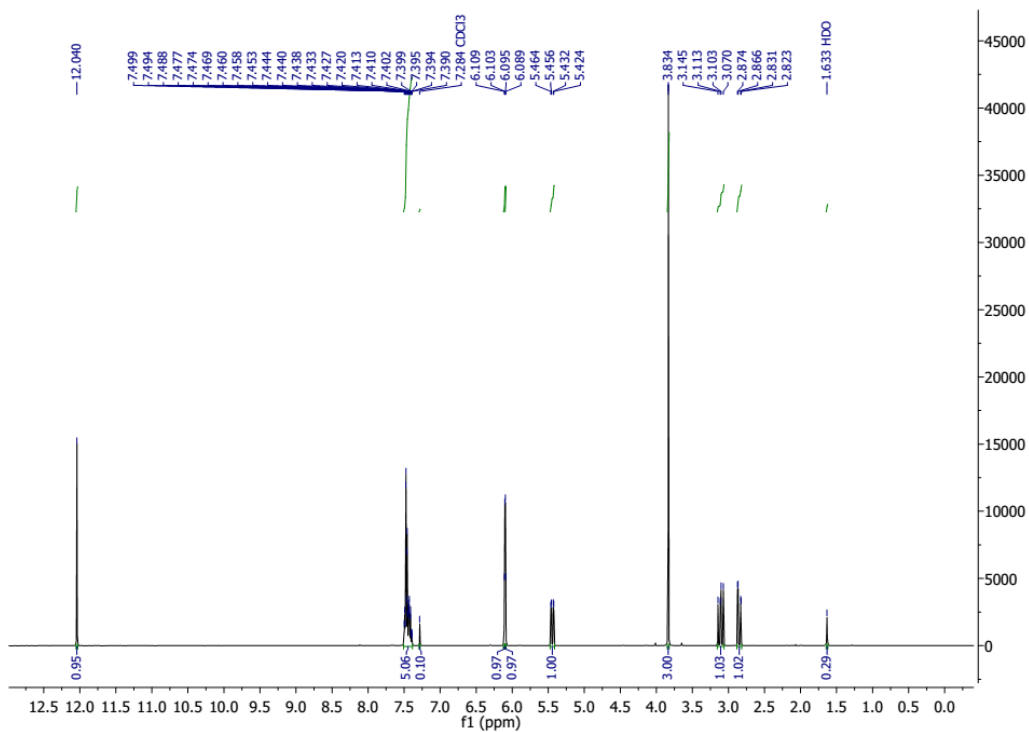


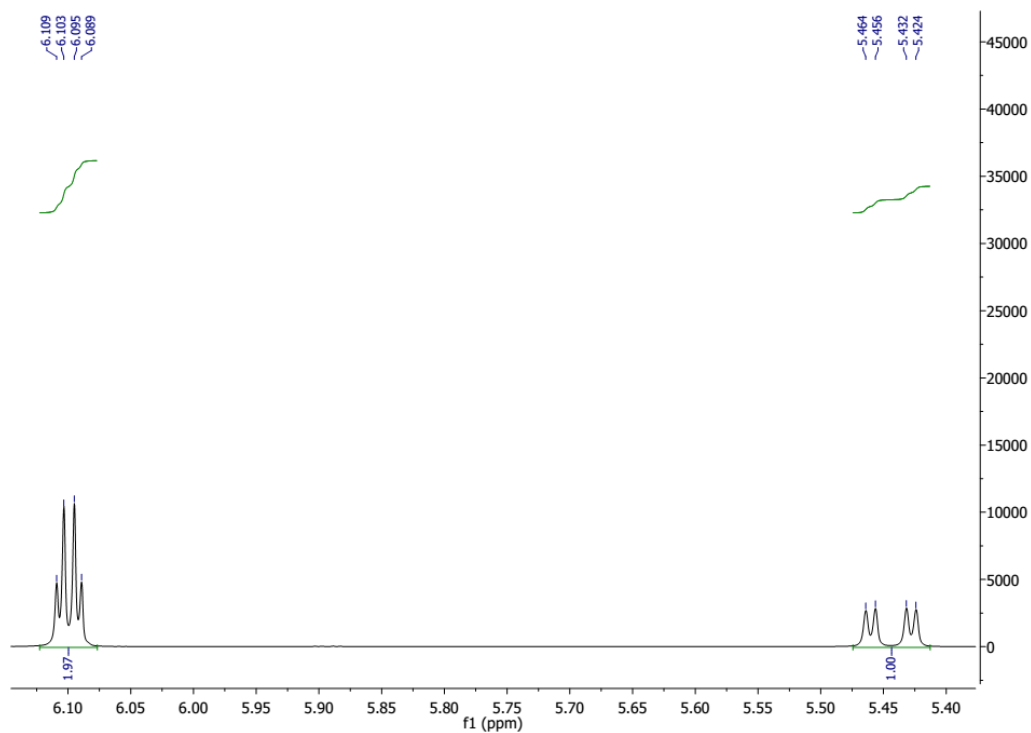
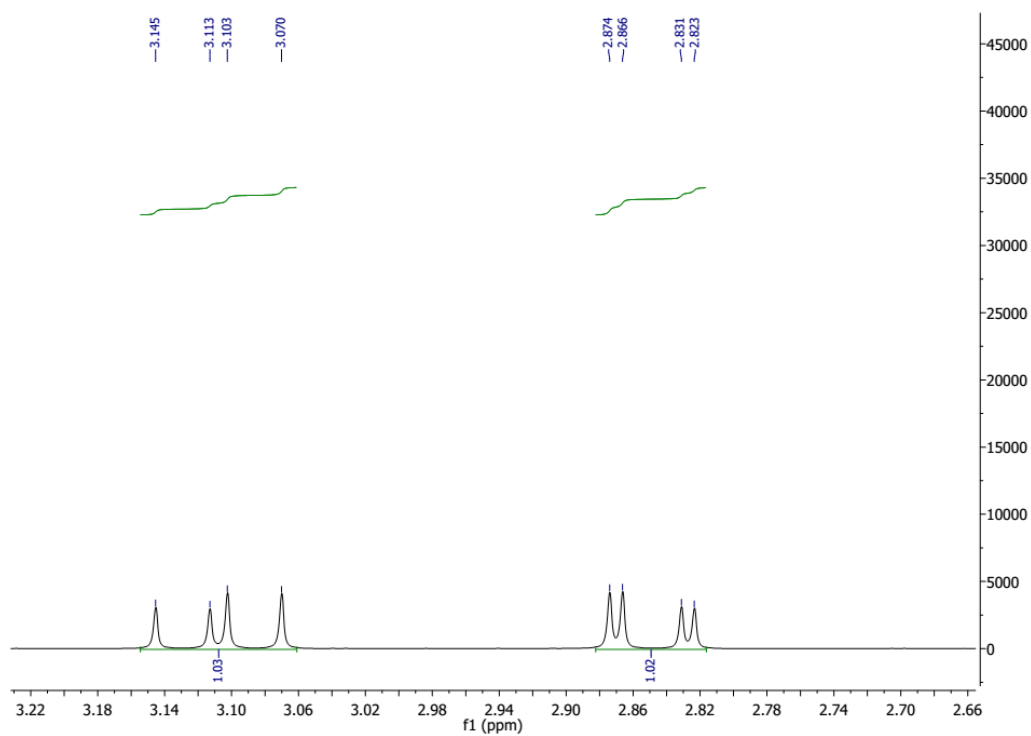
ANEXO 8. ESPECTRO DE RMN BIDIMENSIONAL DE Pd-1

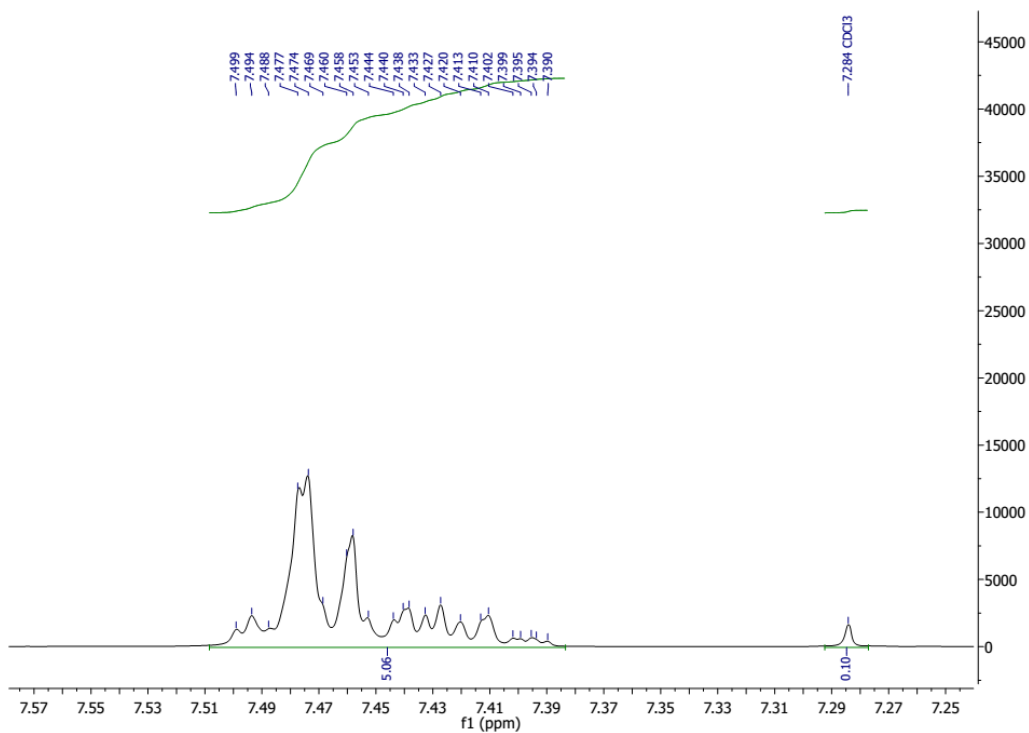
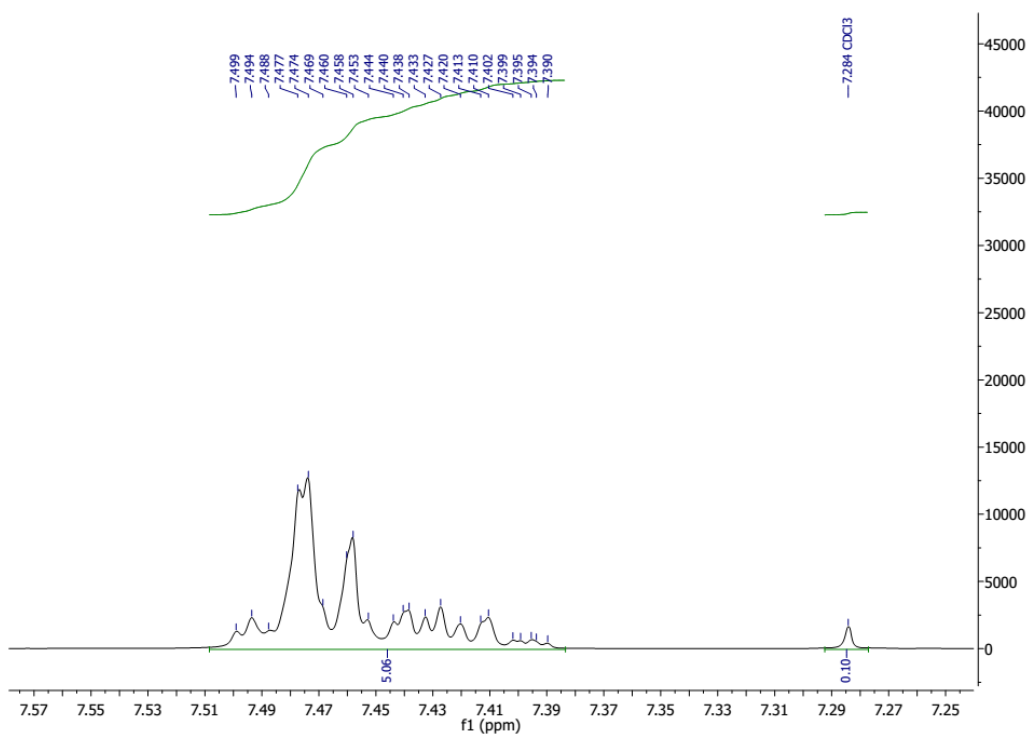




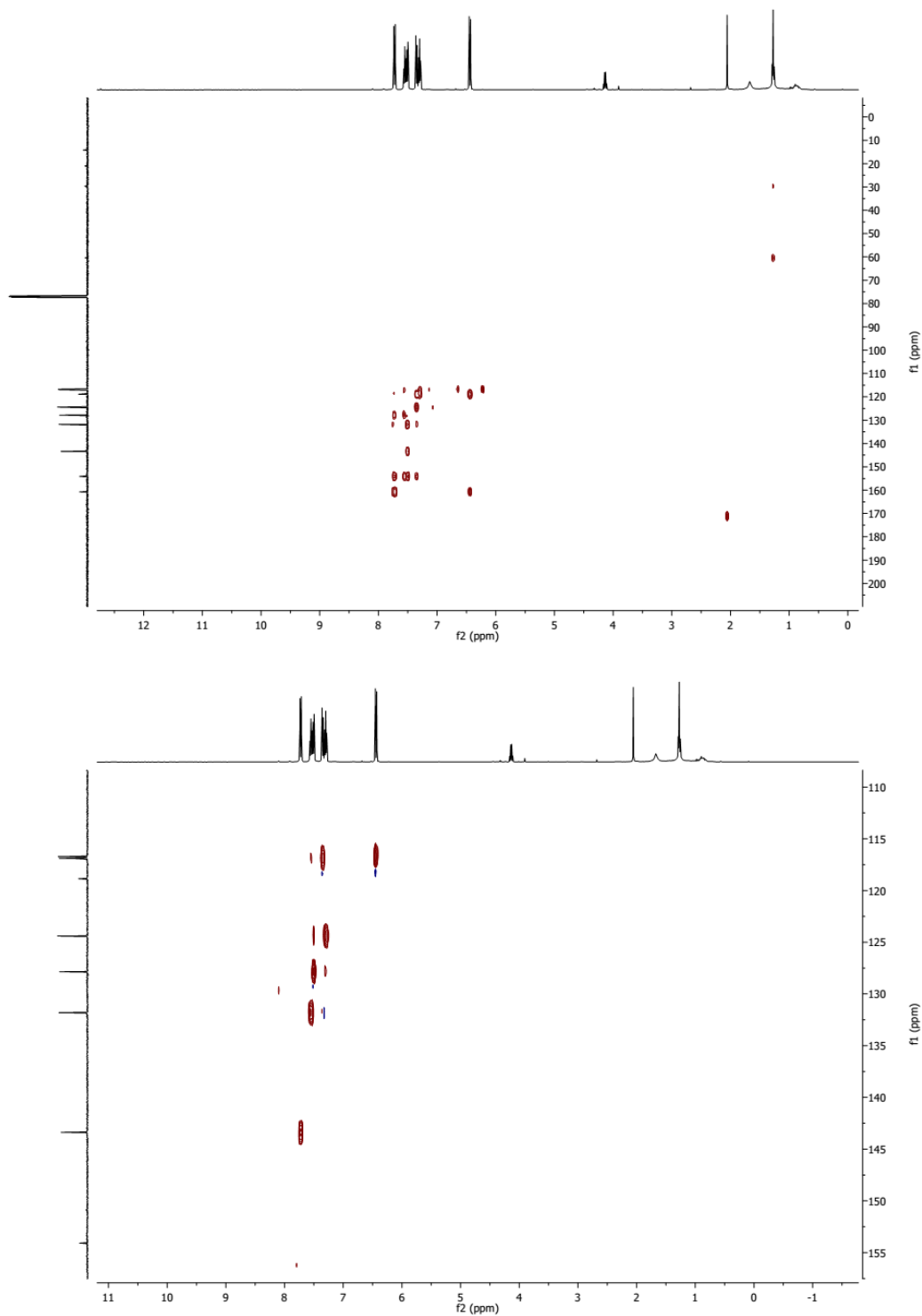
ANEXO 9. ESPECTRO DE RMN Pd-1



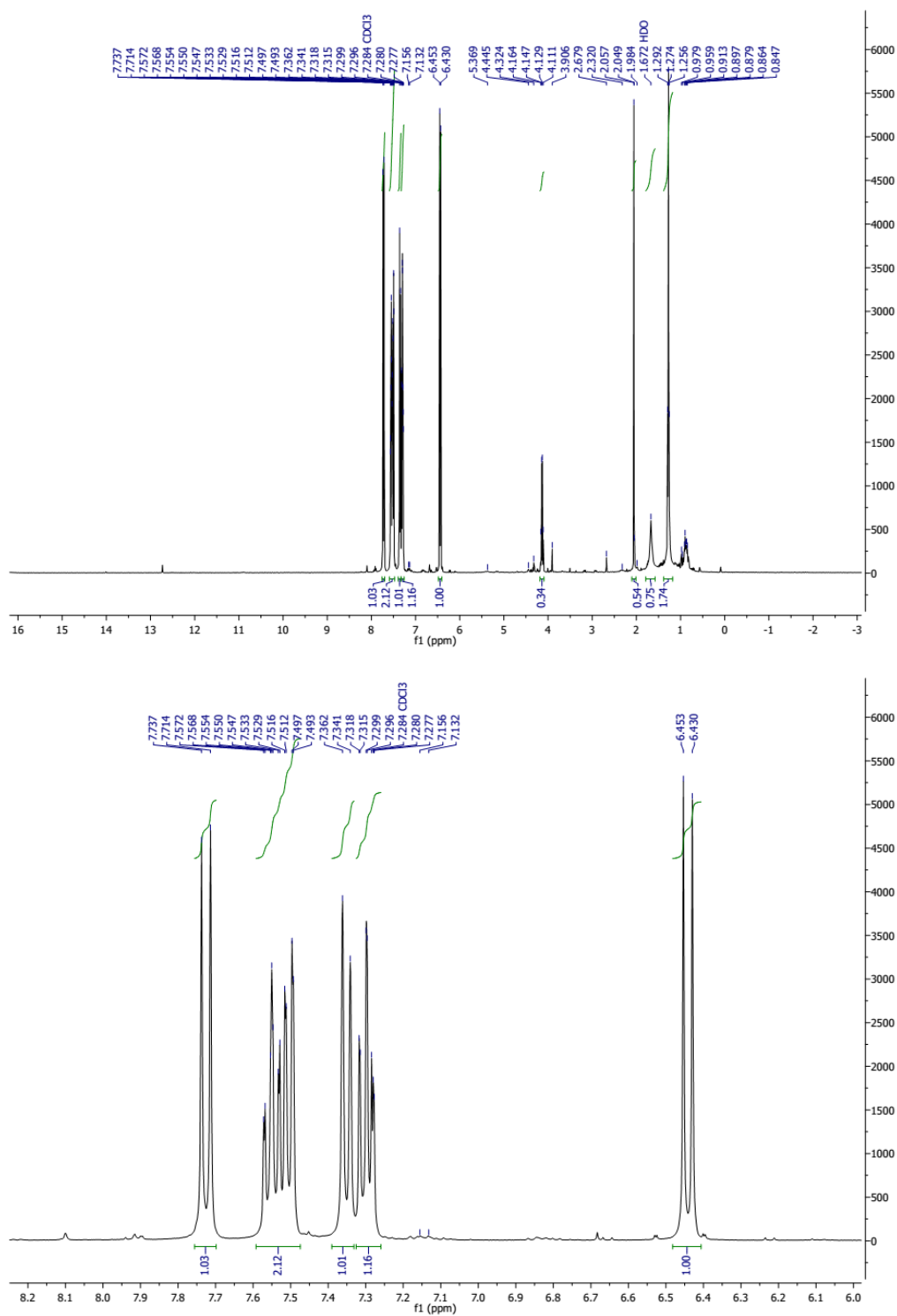


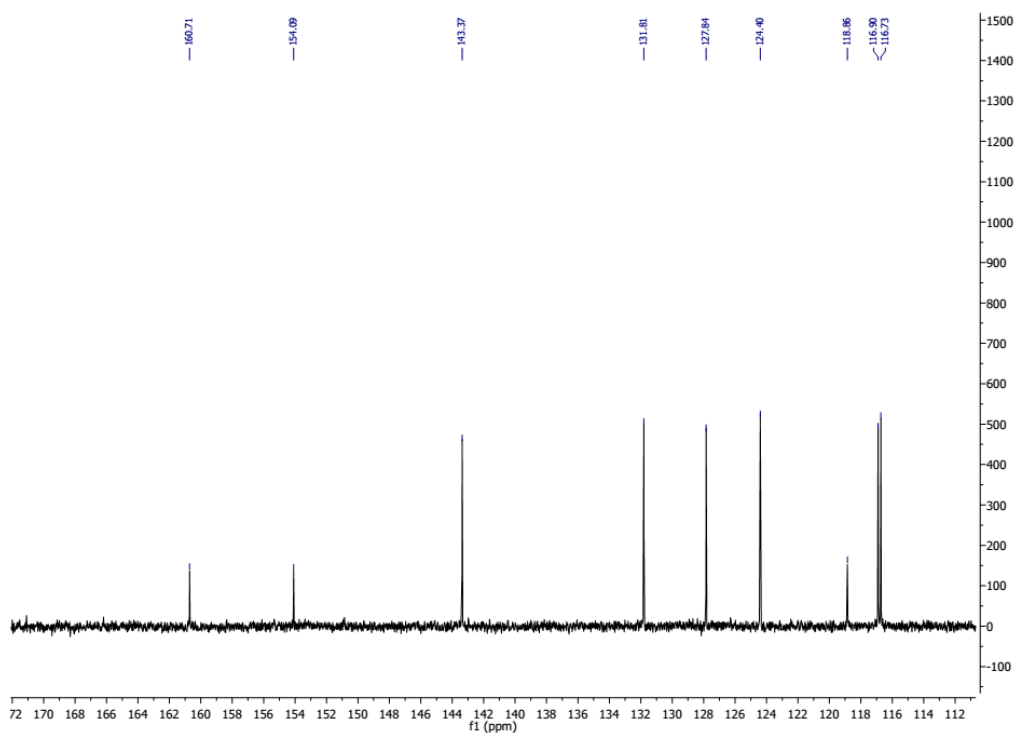
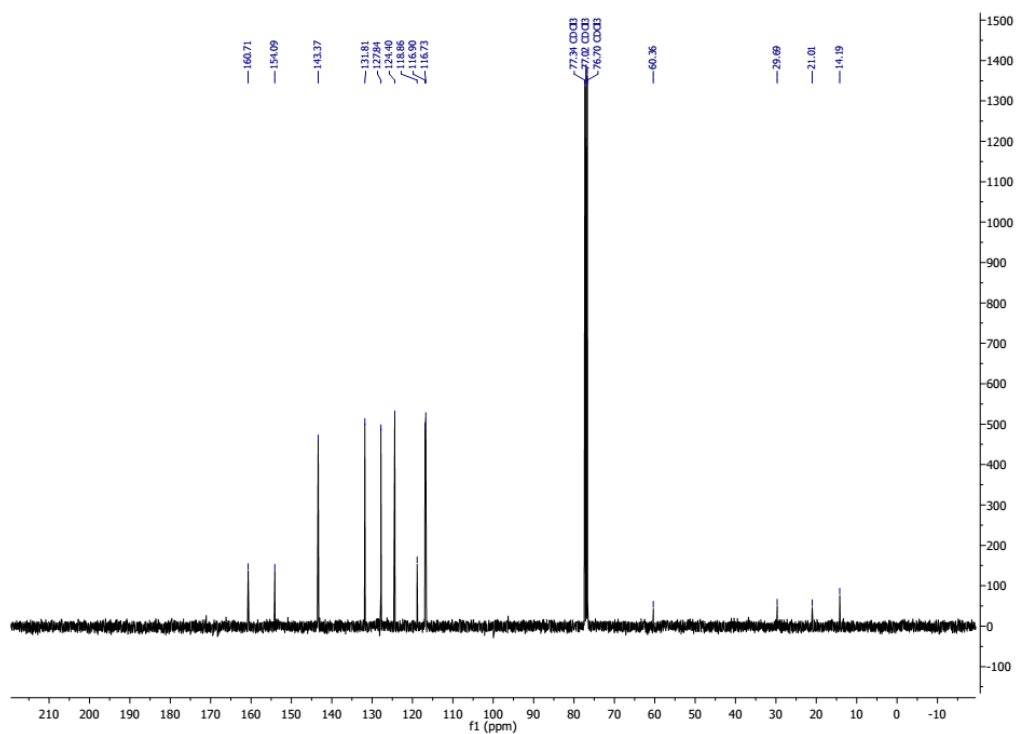


ANEXO 10. ESPECTRO RMN BIDIMENSIONAL Pd-2



ANEXO 11. ESPECTRO DE RMN Pd-2.





9.2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

INSTRUMENTACIÓN

ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Las mediciones de absorbancia de las pruebas antioxidantes se realizaron en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC, modelo Genesys 20, en celdas de cuarzo de 10 mm. Como disolvente se empleó metanol, etanol, acetona o agua destilada.

ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO

Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet is5. Los valores de transmitancia (ν) están expresados en cm^{-1} .

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para la obtención de los espectros de masas se empleó la técnica de ionización por impacto electrónico, utilizando un cromatógrafo de Gases Thermo Scientific modelo TRACE 1310 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo sencillo Thermo Scientific modelo ISQ LT.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz. Se utilizó CDCl_3 y DMSO como disolventes y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las siguientes abreviaciones se utilizaron para explicar las multiplicidades: s=singulete, d=doblete; t=triplete, q=cuarteto, dd=doble de doblete, m=multiplete.

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

CONDICIONES DE REACCIÓN

Los reactivos y los disolventes empleados fueron comprados de la más alta calidad comercial, y usados sin purificaciones posteriores. Todas las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se emplearon placas FLUKA Analytical de 0.2 mm con indicador fluorescente de 254 nm. Se empleó como agente visualizador luz ultravioleta a 254 nm y Oleum y vainillina como reveladores químicos.

CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

Se empleó sílica gel grado técnico con tamaño de partícula de 0.063-0.040 mm de marca Aldrich Chemistry. La preparación de las columnas consistió en el empaquetado con una mezcla de sílica gel y n-hexano, a la que posteriormente se le adicionaba en la parte superior el crudo de reacción por purificar. Los eluyentes habituales fueron mezclas de nHex/AcOEt en distintas proporciones, así como DCM y MeOH.

PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Se empleó el programa ChemDraw Professional 16.0 de Perkin Elmer para otorgarle los nombres sistemáticos a los productos sintetizados y la realización de las estructuras.