

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



“Evaluación biológica y caracterización fitoquímica de extractos y metabolitos secundarios aislados de *Coccoloba barbadensis*”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

Adrián Eduardo Acosta Sansén

TIJUANA B.C.

NOVIEMBRE DEL 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

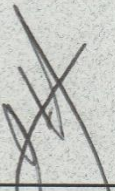
Folio No. 004.

Tijuana, B. C. 30 de agosto de 2016.

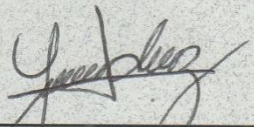
C. Adrián Eduardo Acosta Sansen
Pasante de Químico Farmacobiologo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la Opción: **Tesis**, es propuesto por los profesores **Dr. Iván Córdova Guerrero** y **M.C. Laura Janeth Díaz Rubio**, quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presenta, referido al tema: **“Evaluación biológica y caracterización fitoquímica de extractos y metabolitos secundarios aislados de *Coccoloba barbadensis*”**, el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

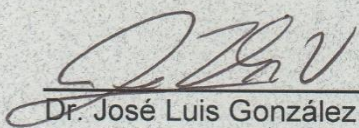
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- OBJETIVOS
- III.- GENERALIDADES
- IV.- METODOLOGÍA
- V.- RESULTADOS
- VI.- CONCLUSIONES



Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis



M.C. Laura Janeth Díaz Rubio
Co-Directora de Tesis



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mi familia, por el apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi vida, puesto que son los que han estado conmigo en las buenas y en las malas, y quienes me brindaron siempre palabras de aliento que me ayudan a seguir adelante cuando estas fueron necesarias.

Al Dr. Iván Córdova Guerrero, quien fue mi director de tesis y gran maestro, y que junto con Laura Díaz, me instruyeron a lo largo del tiempo que permanecí trabajando en el Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, brindándome consejos no solo académicos si no personales para superar los problemas derivados del trabajo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros, tanto de vida como de la carrera, por todos esos buenos momentos que hemos pasado durante todos estos años y por los que están por venir.

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, que me permitieron cursar mis estudios de licenciatura inculcándome valores para convertirme en un profesional.

A mi tío abuelo Oscar Covarrubias Herrera, quien fue la persona que me motivó a iniciar este proyecto y quien me apoyo también con la recolecta del material vegetal.

Por ultimo quiero agradecer a dos personas que formaron parte fundamental de mi infancia y que desafortunadamente no pudieron ser testigos de este logro, “María Dolores Sancen Covarrubias” y “Gildardo Acosta Ruiz”, cuyos fallecimientos a causa del cáncer despertaron en mí una curiosidad, curiosidad por entender el porqué de las cosas, en especial el porqué de esta enfermedad, para posteriormente buscar una cura o tratamiento y poder ayudar a las personas que cursan con esta patología.

RESUMEN

En este trabajo se expone la evaluación biológica y caracterización fitoquímica de *Coccoloba barbadensis*, la cual es una planta cuyas referencias etnofarmacológicas nos indican que posee muy buena actividad principalmente en el sistema gastrointestinal.

En la introducción se menciona brevemente la importancia de algunas de las enfermedades relacionadas con la edad, así como el papel que juegan las plantas medicinales en el tratamiento de ellas y la importancia de la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a partir de productos naturales.

En las generalidades se da un marco teórico sobre las plantas medicinales, y se da una descripción de la Familia Polygonaceae, dentro de la cual se encuentra el género *Coccoloba*, género al que pertenece la planta en estudio. Además de esto, se incluye la importancia de los radicales libres y las especies antioxidantes para la prevención de enfermedades.

En la metodología se incluyen todos los procedimientos, ya sea de evaluación química o biológica, mediante los cuales se llevó a cabo la presente investigación.

En la discusión de resultados se explica detalladamente el análisis de los resultados obtenidos tras la realización de los distintos procedimientos durante el desarrollo del proyecto.

Por último, en las conclusiones se hace un análisis de los objetivos planteados al comienzo de la investigación, en base a los resultados obtenidos. Además se mencionan algunas sugerencias derivadas del proyecto, para futuras investigaciones.

“La única fuente de conocimiento es la experiencia”

Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	7
Objetivo general	8
Objetivos particulares	8
GENERALIDADES	9
Historia de las plantas medicinales.....	10
Familia Polygonaceae	14
Género Coccoloba	16
<i>Coccoloba barbadensis</i>	17
Estudios del género <i>Coccoloba</i> en México y América.....	18
Importancia de especies antioxidantes en el control de los radicales libres y el estrés oxidativo para la prevención de enfermedades	20
Antioxidantes	23
METODOLOGÍA	27
TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL Y GENERACIÓN DEL EXTRACTO	28
Recolección del material vegetal.....	29
Proceso de maceración	30
Proceso de partición.....	31
PRUEBAS COLORIMÉTRICAS	32
Identificación preliminar de metabolitos secundarios del extracto crudo	33
Alcaloides	34
Taninos	35

Esteroides y triterpenoides	36
Flavonoides.....	37
Carbohidratos	38
Saponinas	39
Glucósidos antraquinónicos	40
AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	42
Cromatografía en capa fina	43
Separación de compuestos mediante cromatografía preparativa en placa	45
EVALUACIÓN QUÍMICA <i>IN VITRO</i> DE LOS EXTRACTOS	47
Determinación de fenoles totales	48
Determinación de actividad antioxidante mediante la reducción del radical libre DPPH.....	50
Determinación de actividad antioxidante mediante la reducción del radical catiónico ABTS.....	53
Determinación de actividad antioxidante mediante la decoloración oxidativa del β - Caroteno.....	56
EVALUACIÓN BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE LOS EXTRACTOS.....	58
Evaluación de actividad citotóxica por el método de la sulforodamina B	59
Evaluación de actividad antifúngica.....	62
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
GENERACIÓN DEL EXTRACTO Y PARTICIONES	64
Maceración.....	65
Particiones.....	65
PRUEBAS COLORIMÉTRICAS.....	66
Resultados de pruebas colorimétricas	67
EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA.....	69

Análisis cuantitativo de compuestos polifenólicos totales	70
Resultados de actividad antioxidante por las técnicas de reducción del radical DPPH, reducción del radical catiónico ABTS y el método de decoloración oxidativa del β -caroteno	71
Actividad citotóxica	73
Actividad antifúngica	75
 AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	 77
Resultados de ensayos cromatográficos para el aislamiento de metabolitos secundarios	78
Identificación de metabolitos secundarios mediante técnicas de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones de HMBC y COSY	82
CONCLUSIONES	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÉNDICES	92
 ANEXOS	 93
Espectro de masas	94
Espectro de RMN de H^1	95
Espectro de RMN de C^{13}	96
 TÉCNICAS EXPERIMENTALES	 97
Resonancia Magnética Nuclear	98
Espectroscopía de UV-Visible	98
Espectrometría de masas	98
Cromatografía de capa fina (CCF)	99
Cromatografía en preparativa	99
SOFTWARE	99

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Hojas, semilla e inflorescencia de <i>Coccoloba barbadensis</i> Jacq.....	4
FIGURA 2. Papiro de Ebers	11
FIGURA 3. Página correspondiente al Pen Tsao	11
FIGURA 4. Galeno de Pergamo	12
FIGURA 5. Transmisión de los conocimientos a misioneros españoles	12
FIGURA 6. Distribución mundial de la familia Polygonaceae	14
FIGURA 7. Fotografía de <i>Coccoloba uvifera</i> , planta perteneciente a la familia <i>Polygonaceae</i>	14
FIGURA 8. Estructura de los principales constituyentes aislados de <i>Polygonum sachalinensis</i>	16
FIGURA 9. Hoja de <i>Coccoloba barbadensis</i>	18
FIGURA 10. Metabolitos aislados de <i>Coccoloba uvifera</i>	18
FIGURA 11. Radical libre.....	20
FIGURA 12. Formación de las distintas especies reactivas de oxígeno.....	20
FIGURA 13. Neutralización de un radical libre por la acción de un antioxidante	23
FIGURA 14. Estructura de la enzima superóxidodismutasa.....	25
FIGURA 15. Estructura del α -tocoferol, forma más activa de la vitamina E.....	26
FIGURA 16. Estructura del ácido ascórbico	25
FIGURA 17. Ubicación del poblado Los Salazares, Nayarit.....	29
FIGURA 18. Maceración etanólica del tallo de <i>Coccoloba barbadensis</i>	30
FIGURA 19. Matrices que contienen las distintas particiones del extracto etanólico de tallo.	31
FIGURA 20. Estructura del alcaloide morfina.....	34
FIGURA 21. Estructura del ácido Gálico	34
FIGURA 22. Estructura química del colesterol.....	36
FIGURA 23. Estructura básica de un flavonoide	37
FIGURA 24. Estructura química de la glucosa.....	38
FIGURA 25. Estructura de la sarsapogenina	39
FIGURA 26. Estructura química de aloe-emodina.	40
FIGURA 27. Ejemplo de cromatografía en capa fina revelada con óleum.....	44

FIGURA 28. Cromatografía preparativa en placa previa a ser introducida a la cámara cromatográfica.	46
FIGURA 29. Colores obtenidos tras el ensayo de Folin-Ciocalteu.	48
FIGURA 30. Reducción del radical DPPH.	50
FIGURA 31. Generación del radical catiónico ABTS.	53
FIGURA 32. Estructura del β -caroteno.	56
FIGURA 33. Distribución de muestras para el bioensayo en placa de 96 pocillos.	65
FIGURA 35. Extracto metanólico de <i>coccoloba barbadensis</i> en rotaevaporador.	65
FIGURA 36. Extractos obtenidos de las distintas particiones de <i>coccoloba barbadensis</i>	65
FIGURA 37. Pruebas colorimétricas realizadas al extracto aeas-01.	68
FIGURA 38. Pruebas colorimétricas realizadas a los extractos aeas-01 (arriba), y aeas-02 (abajo).	68
FIGURA 39. Tubos tras la reacción de folin-ciocalteu correspondientes a los extractos aeas-01 (izquierda) y aeas-02 (derecha).	70
FIGURA 40. Crecimiento de los hongos sobre los que el extracto aeas-03 presentó actividad.	75
FIGURA 41. Crecimiento de los hongos sobre los que el extracto crudo presentó actividad.	75
FIGURA 42. Cambios que presentó la cepa de <i>Fusarium sp.</i> tras el cuarto día exposición a los extractos.	76
FIGURA 43. Misma placa de cromatografía de los compuestos aeas-02 y aeas-03 revelada con luz uv y óleoum respectivamente.	78
FIGURA 44. Sembrado de cromatografía preparativa en placa de aeas-02 (izquierda) y aeas-03 (derecha).	79
FIGURA 45. Cromatografía preparativa del extracto aeas-02 revelada con luz uv.	80
FIGURA 46. Cromatografía preparativa del extracto aeas-03, en la que se marcaron las regiones de interés en la parte superior.	81
FIGURA 47. Compuesto aislado de la cromatografía preparativa de AEAS-03.	81
FIGURA 48. Correlaciones de HMBC y COSY.	83
FIGURA 49. Estructura del metabolito aislado β -sitostenona.	84

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Ejemplificación de la gráfica con su respectiva ecuación de la recta para obtener la CE ₅₀	52
GRÁFICA 2. Ejemplificación de la gráfica con su respectiva ecuación de la recta para obtener la CE ₅₀	55
GRÁFICA 3. Resultados de actividad antioxidante por el método del radical DPPH.	71
GRÁFICA 4. Resultados de actividad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS.....	72
GRÁFICA 5. Resultados de actividad antioxidante por el método del β-caroteno.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Ensayos colorimétricos realizados.....	33
TABLA 2. Descripción de líneas celulares empleadas en el bioensayo.....	59
TABLA 3. Resultados de identificación preliminar de metabolitos secundarios por métodos colorimétricos.....	67
TABLA 4. Resultados de la cuantificación de fenoles totales por el método de folin-ciocalteu.....	70
TABLA 5. Resultados de las distintas técnicas antioxidantes.....	71
TABLA 6. Resultados de actividad citotóxica obtenidos frente a distintas líneas celulares cancerígenas.....	73

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el incremento en la esperanza de vida de la población, ha venido acompañada de un aumento en la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad, como lo son las enfermedades neurodegenerativas (Kadenbach y col., 2009; Torbjörn y col., 2013), el cáncer (Sosa y col., 2012), y ciertas patologías cardiovasculares (Ansley y Wang, 2012), mismas que se ha demostrado que son resultado de procesos multifactoriales, en los cuales, las vías de diferenciación celular se ven afectadas y en donde se ha demostrado también que el estrés oxidativo juega un rol determinante.

De las enfermedades anteriormente citadas, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la principal causa de mortalidad a nivel mundial con 8.2 millones de muertes en el año 2012.

Debido a la alta mortalidad asociada con el cáncer y a los serios efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia, algunos pacientes con cáncer optan por buscar métodos complementarios o alternativos de tratamiento. Por consecuencia, las investigaciones más recientes giran en torno a la búsqueda o el desarrollo de fármacos quimioterapéuticos que no posean efectos tóxicos, o bien, que se reduzca la intensidad de éstos (Unnati y col., 2011).

Las plantas medicinales han sido utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades en seres humanos y animales desde tiempos inmemoriales. Cabe resaltar que más del 50% de los fármacos modernos en uso clínico, son de origen natural y algunos de ellos poseen la habilidad de controlar células cancerígenas o bien, de erradicarlas. Sin embargo, en la actualidad sólo algunas plantas medicinales han atraído el interés de los científicos para investigar sus efectos sobre el cáncer.

La búsqueda de agentes anticancerígenos obtenidos de productos naturales se acentuó en la década de 1950 con el descubrimiento y desarrollo de los alcaloides de la vinca, la vinblastina y la vincristina, la primera utilizada para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y la segunda para el tratamiento de distintos tipos de leucemias, incluidas la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoblástica aguda. Años más tarde se logró el aislamiento de la podofilotoxina, un compuesto fenólico que logra inhibir la mitosis en células cancerígenas, y el cual sirvió como precursor para dos fármacos semisintéticos, el etopósido y el tenipósido. Como resultado de lo anterior el Instituto Nacional del Cáncer

de los Estados Unidos (NCI por sus siglas en inglés), inicio un extenso programa de colección de plantas en 1960, enfocado principalmente en plantas provenientes de regiones con clima templado. Dicho programa llevó al descubrimiento de novedosos quimiotipos que mostraban cierto rango de actividades citotóxicas, entre ellos los taxanos y la camptotecina, sin embargo, el desarrollo de principios activos clínicamente fiables duro aproximadamente 30 años (Cragg y col., 2005; Unnati y col., 2011).

Actualmente existe un considerable interés científico y comercial en continuar descubriendo nuevos agentes anticancerígenos a partir de productos naturales, principalmente en países en vías de desarrollo como Brasil, Colombia y Tailandia en donde se realizaron diversos estudios en 500, 10 y 11 especies de la flora local respectivamente y en los cuales se han obtenido buenos resultados sobre algunas líneas celulares como HeLa y LS-174 correspondientes a células de adenocarcinoma de epitelio cervical y carcinoma de epitelio pulmonar respectivamente.

México es considerado como un país megadiverso que cuenta con un estimado del 10-12% de la flora mundial (CONABIO, 2009) y no se ha quedado atrás en cuanto a este tipo de estudios, obteniendo resultados interesantes de plantas nativas del sureste del país, frente a líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo y adenocarcinoma de colon (Frei y col. 1998), pero no solo esto, también se ha logrado el control de otra clase de patologías como la diabetes mellitus tipo II mediante la introducción en la dieta de los individuos enfermos de *Opuntia ficus-indica* mejor conocida como nopal (Patricia López y col., 2014)

En nuestro país existe una gran variedad de flora, por lo que es prácticamente imposible el estudiar a fondo todos y cada uno de los géneros de plantas que poseemos, tal es el caso del género *Coccoloba spp.*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en México y el continente americano, y cuyas distintas especies del país son nativas de regiones tropicales y subtropicales. El género está conformado por alrededor de 120 a 150 especies, y a pesar de su amplia distribución y de su gran número de especies ha sido poco estudiado. Sin embargo, los pocos estudios que se le han realizado a algunas de las especies, como la *Coccoloba achrosticoides*, *C. cereifera*, *C. cozumelensis*, *C. mollis*, *C. spicata* y *C. uvifera*, han arrojado resultados interesantes, puesto que se ha

demostrado que poseen buena actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica. Estos resultados son muy interesantes puesto que dan pie a futuras investigaciones en otras especies del mismo género, como es el caso de *Coccoloba barbadensis* Jacq.



Figura 1. Hojas, semilla e inflorescencia de *Coccoloba barbadensis* Jacq

HIPÓTESIS

Estudios recientes refieren que los extractos de plantas del género *Coccoloba* han presentado actividad antioxidante (Segura y col., 2015), y citotóxica frente a distintas líneas celulares (Vera Kú, 2003). Además, las referencias etnofarmacológicas indican que estas plantas son utilizadas para el tratamiento de patologías del tracto gastrointestinal como gastritis, ulcera péptica e incluso el cáncer gástrico.

Por lo anteriormente mencionado, se espera en este estudio que la especie de *Coccoloba barbadensis*, muestre en sus extractos y metabolitos secundarios perfiles antioxidantes, citotóxicos, y antimicrobianos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Llevar a cabo un estudio fitoquímico biodirigido del tallo de *Coccoloba barbadensis* para la identificación y aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos.

Objetivos particulares

- Generar diferentes extractos del tallo de la planta *Coccoloba barbadensis*, mediante procesos de partición.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto crudo y de las particiones generadas de la planta, mediante los ensayos de reducción de los radicales ABTS y DPPH, así como el de la decoloración oxidativa del .
- Llevar a cabo estudios de actividad citotóxica de las particiones del extracto mediante experimentos de GI_{50} con distintas líneas celulares.
- Determinar el perfil antifúngico de los extractos obtenidos, mediante la realización de estudios de concentración mínima inhibitoria frente a diferentes cepas de hongos fitopatógenos causantes de problemas en la región.
- Identificar, purificar y caracterizar metabolitos secundarios bioactivos, mediante el uso de técnicas cromatográficas, de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

GENERALIDADES

Historia de las plantas medicinales

Desde la antigüedad el ser humano se ha enfrentado a situaciones que ponen en riesgo su salud, por lo que desde entonces, se ha visto en la necesidad de buscar y preparar sus propios remedios o medicamentos a partir de los recursos que tenía a su alcance. La enfermedad en la antigüedad, era concebida de diferentes maneras, ya sea la presencia de un cuerpo extraño dentro del organismo, la pérdida o evasión del alma, o bien una consecuencia de la acción de espíritus hostiles. Como consecuencia de esto, el hombre pretendió con invocaciones y ritos sustraer los cuerpos extraños, atraer el alma perdida y alejar a los espíritus causantes de la enfermedad y del dolor. Durante este proceso “curativo”, las hierbas y el aceite ocuparon un lugar relevante, puesto que los hechiceros, chamanes y sanadores, estaban familiarizados con las plantas del lugar donde residían y con sus facultades tanto medicinales como tóxicas.

La utilización de plantas medicinales tiene su origen desde el inicio de la historia del ser humano, y se cree que esto inició cuando éste comenzó a imitar las costumbres de otros animales que se frotaban en distintos arboles cuando padecían problemas de la piel o bien, con la ingestión accidental o voluntaria de algunas especies vegetales.

En el mundo occidental se conoce la existencia de herbarios desde la época de civilizaciones como los asirios, los fenicios, y los sumerios. Una de las evidencias más antiguas, respecto a la utilización de las plantas con fines terapéuticos, es una tablilla de barro con más de 4000 años de antigüedad, en la cual un sumerio describió el uso de cerca de 250 plantas medicinales, dentro de las cuales se mencionaba la utilización de la mandrágora, las semillas de mostaza y el tamarindo para tratar el dolor de muela, dicho tratamiento era complementado con ciertos conjuros mágicos (Borchardt, 2002).

Además de la tablilla sumeria, se han encontrado otros documentos en los cuales también se hace mención de la utilización de plantas para el tratamiento de diversos padecimientos, tal es el caso del Papiro de Ebers. Este fué redactado en el antiguo Egipto cerca del año 1500 antes de nuestra era y en él, los egipcios documentan el uso de más de 700 sustancias, extraídas en su mayor parte de plantas o frutos como por ejemplo: la cebolla, azafrán, mirra hojas de ricino, lirio, jugo de amapola, higos, cáñamo, incienso,

aloe vera, tamarindo y opio (Strouhal, 2010). En este se menciona que el ajo se les administraba a los esclavos que construían las pirámides para preservarlos de las enfermedades, esto es, una especie de profiláctico. También se menciona el uso del incienso para tratar las parasitosis gastrointestinales.



Figura 2. Papiro de Ebers.

En la medicina tradicional china y asiática se sabe del uso de las plantas medicinales con una antigüedad de más de 10,000 años, y entre uno de sus textos más antiguos se encuentra el Pen Tsao el cual contiene más de 8160 fórmulas, que se preparaban con base en 1871 sustancias, las cuales eran principalmente de origen vegetal.



Figura 3. Página correspondiente al Pen Tsao.

En cuanto a la medicina griega y romana, Hipócrates (460-377 a.C.), conocía los usos del ajenojo, la cicuta, beleño, ruibarbo y manzanilla, así como la *Scilla maritima*, planta que fue descrita por los egipcios en el papiro de Ebers 1000 años antes que él.

Pocos más tarde, Teofrasto (370-287 a.C.), escribió el libro “Sobre la historia de las plantas y sobre las causas de las plantas”, en donde se mencionan los usos de la canela, el cornezuelo de centeno, el apio y el helecho macho.

Dioscórides (77 a.C.) escribió “Materia Médica”, una obra considerada por 15 siglos la cumbre de la botánica y farmacia. En ella registró todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos e incluyó desde la simple descripción hasta la utilización de estas. Un siglo más tarde, Claudio Galeno (131-200 d.C.), quien fue un prestigiado médico griego, escribió libros sobre medicina y farmacia, indicando el empleo de las plantas medicinales e incluso las adulteraciones sobre estas y el efecto que esto pudiera llegar a ocasionar. Toda esta información fue posteriormente recopilada y fusionada con otros conocimientos para dar origen así a la farmacia europea.



Figura 4. Galeno de Pergamo.

Durante la Edad Media destacó Avicena en el mundo árabe como el impulsor de la medicina de la naturaleza y de las plantas.

En el Renacimiento, con el descubrimiento de la imprenta se permitió la publicación de grandes obras literarias sobre las plantas medicinales, así como la traducción y publicación de textos griegos como el de Dioscórides. Durante esta misma época comenzaron los viajes hacia América, donde Francisco Hernández, médico de cámara de Felipe II, escribió 22 tomos de su enciclopedia “de Materia Médica”, en la cual describe unas 3000 especies vegetales entre las que destacan: el estramonio, el tomate, el tabaco y la papaya (Osbaldeston y Wood, 2000).

En este mismo periodo, el alquimista suizo Paracelso (1493-1541), desarrolló la “Teoría de las asignaturas”, la cual se basa en la forma de las plantas para deducir la utilidad terapéutica de estas como por ejemplo, el clavo, que por su parecido con las muelas, era utilizado como anestésico para realizar extracciones dentales y que años más tarde se confirmó su utilidad como anestésico dental.

Karl von Linneus (1707-1778), un naturista sueco, ideó el Sistema Binomial para la nomenclatura y clasificación de las plantas, según el cual cada especie sería nombrada por un sustantivo que indicaba el género, seguida de un adjetivo que designaba la especie, y que se convirtió en un método universalmente aceptado por la comunidad científica.

En América, el panorama de las plantas medicinales y los productos naturales durante el siglo XVI fue distinto al europeo, debido al rezago científico que existía en aquella época. Los conocimientos que poseían los pueblos indígenas fueron transmitidos a los colonizadores europeos, los cuales los plasmaron en distintas obras literarias como: “De la natural historia de las Indias e Islas y tierra firme del mar océano”, publicada en 1535 por Gonzalo Fernández de Oviedo. En ella se encuentra la descripción de muchas plantas medicinales dentro de las que destacan el tabaco y el cacao.



Figura 5. Transmisión de los conocimientos a misioneros españoles.

A finales del siglo XVI Fray Bernardino de Sahagún, considerado el máximo investigador de la cultura Nahuatl, escribió “Historia general de las cosas de Nueva España”, libro en el cual se mencionan muchas de las plantas utilizadas con fines curativos por las culturas azteca y zapoteca. En la actualidad se conservan dos valiosos manuscritos en el Jardín Botánico de Madrid, en ellos se encuentran los estudios de plantas medicinales de distintas regiones, realizados desde el Actual estado de California en Estados Unidos, hasta Costa Rica.

Familia Polygonaceae

Familia distribuida mundialmente, en diferentes regiones, desde los trópicos hasta las regiones polares. La tribu *Persicarieae* posee distribución circumpolar norte, con escasos representantes en el hemisferio sur. Dentro de la tribu *Poligoneae*, los géneros *Atraphaxis*, *Calligonum* y *Pteropyrum* están restringidos principalmente a los tipos de hábitat áridos de Asia. Por otra parte, la tribu *Muehlenbeckia* posee una distribución anfipacífica, con especies en Nueva Guinea, Australia, Nueva Zelanda y Sudamérica.

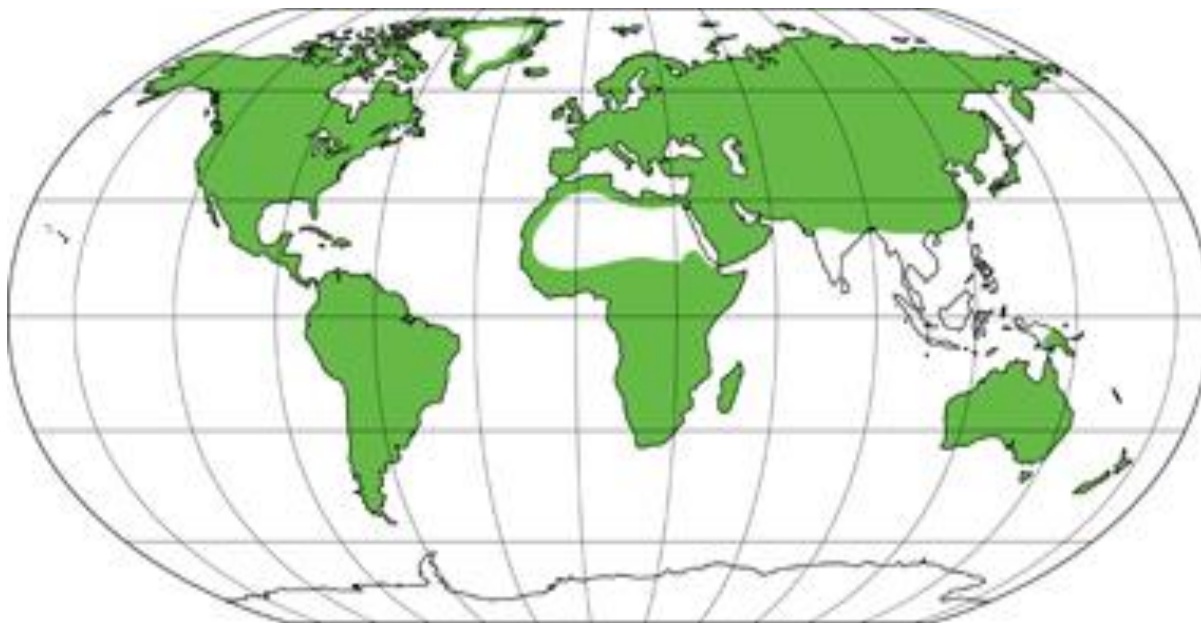


Figura 6. Distribución mundial de la familia Polygonaceae (en color verde).

El hábitat de la familia Polygonaceae es muy amplio, desde zonas bajas, hasta elevaciones medias en bosques abiertos. Algunas especies son malezas ampliamente distribuidas. Numerosas especies del género *Polygonum* también habitan en lugares inundables, a orillas de ríos y lagunas (Castillejos y Solano, 2008).

La familia Polygonaceae está compuesta por 43 géneros y 1110 especies (Castillejos y Solano, 2008). Entre los géneros más importantes destacan *Eriogonum*,

Rumex, *Polygonum* y *Coccoloba*, integrados por 250, 200, 160 y 120 especies respectivamente.

Pocas especies de esta familia poseen valor económico. Algunas son utilizadas como ornamentales, otras como cultivos para alimentación en zonas templadas y sólo algunas especies del género *Coccoloba* poseen frutos comestibles, como es el caso de la *Coccoloba uvifera* (Castillejos y Solano, 2008).



Figura 7. Planta de *Coccoloba uvifera*, perteneciente a la familia Polygonaceae.

Se han realizado diversos estudios a distintos géneros de esta familia pero principalmente del género *Polygonum*, dentro de los cuales destacan la buena actividad antioxidante, inhibición enzimática frente a las enzimas α -glucosidasa y acetilcolinesterasa, antimicrobiana, antiulcerativa e incluso citotóxica (Fan y col., 2010).

Los compuestos aislados con más frecuencia de los distintos géneros son los flavonoides, glucosidos, taninos, lignanos, antraquinonas y aceites volátiles.

Entre los metabolitos que se han logrado aislar de estas plantas, particularmente de *Polygonum sachalinensis*, se encuentran los siguientes: quercetina-3-O- β -D-

galactopiranosido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, lapatósido D, lapatósido C, N-transferuloiltiramina y hidropiperósido, cuyas estructuras se pueden apreciar en la [figura 8](#), β -sistosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico, emodina, catequina, salidrósido, taxifolina, β -cariofileno, entre otros (Fan y col., 2010).

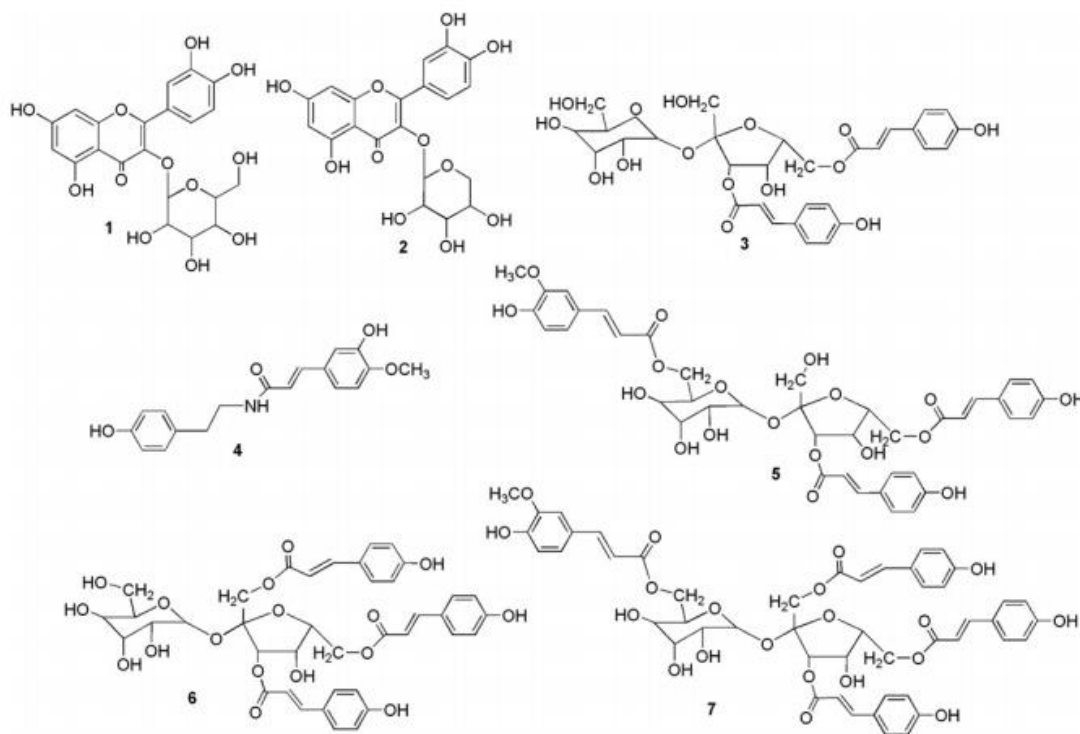


Figura 8. Estructura de los principales constituyentes aislados de *Polygonum sachalinensis*: galactopiranosido (1), quercetina-3-O-arabinopiranosido (2), lapatósido D (3), lapatósido C (5), N-transferuloiltiramina (4) y hidropiperósido (6).

Género *Coccoloba*

Es un género propio de América tropical con 120 a 150 especies, de las cuales 17 habitan en México.

Son árboles o arbustos, a veces bejucos, generalmente dioicos; con estípulas desarrolladas a manera de ócreas, deciduas o parcialmente persistentes y formando un tubo alrededor del tallo, peciolo cortos, surgiendo de la base de la ócrea o más arriba, por lo general canaliculados, láminas foliares con frecuencia coriáceas, en brotes adventicios y en plantas juveniles presentando a menudo forma diferente y tamaño más

grande que el común; inflorescencias axilares o terminales, en forma de racimos o espigas simples o a veces ramificadas en la base, las flores masculinas agrupadas en fascículos, las femeninas solitarias, pedicelos articulados en el ápice con una ocreola en la base; perianto 5(7)-partido, unido en la base para constituir un tubo, lóbulos de prefloración imbricada; estambres por lo general 8, filamentos unidos en la base, rudimentarios en las flores femeninas; ovario trígono, estilos 3, exertos, pistilo vestigial en las flores masculinas; fruto aparentando una drupa globosa, ovoide u obovoide, pues los lóbulos del perianto y a menudo también el tubo, que son acrescentes y carnosos, cubren el aquenio, éste por lo general es trígono, liso; semillas con el endospermo ruminado (Castillejos y Solano, 2008).

Coccoloba barbadensis

Sus nombres comunes registrados en México son bobché, carnero, carnero de la costa, hoja dura, palo de carnero, tamulero, tapalcahuite y uvero.

Especie distribuida a lo largo de ambas vertientes de México, en los estados de Sinaloa, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Colima, Puebla, Veracruz, Tabasco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Campeche,

Árbol bajo hasta de 12 m de alto, perennifolio; corteza áspera, gris, ramas jóvenes pálidas, glabras o pilosas; ócreas de 4 a 9 mm de largo, glabras o puberulentas; peciolos surgiendo de la base de las ócreas, de 0.4 a 2.3 cm de largo, glabros o pilosos, láminas foliares de forma y tamaño variable, ovadas, oblongas, oblongo-elípticas u ovado-oblongas, de 9 a 30 cm de largo y 4 a 17 cm de ancho, agudas a obtusas, pero abrupta y cortamente acuminadas en el ápice, oblicuas, redondeadas y a veces ligeramente cordadas en la base, margen ondulado y revoluto, subcoriáceas o coriáceas, glabras en ambas superficies; inflorescencias en forma de racimos terminales hasta de 30 cm de largo, densos, recurvados y reflexos, diminutamente puberulentos o glabros, pedicelos por lo general tan largos o más cortos que las ocreolas, de menos de 1 mm de largo; flores masculinas con el perianto de cinco lóbulos de color crema de 1.4 a 2.4 mm de

largo y 1.2 a 1.5 mm de ancho, imbricados en la yema, estambres 8, anteras de 0.5 mm de largo, gineceo vestigial; flores femeninas con el perianto de 5 lóbulos rojos de 1 mm de largo, más cortos que el tubo, estaminodios 8, ovario glabro, estilos 3, exertos; drupa ovoide, de 5 a 7(12) mm de largo y 4 a 5(8) mm de ancho, entornada por el tubo del perianto acrescente, verde a parda, lóbulos formando una corona en su ápice (Castillejos y Solano, 2008).



Figura 9. Hoja de *Coccoloba barbadensis*.

Estudios del género *Coccoloba* en México y América

Hasta la fecha son pocos los estudios que se encuentran reportados sobre la actividad biológica de las distintas especies del género *Coccoloba*, pero los resultados que se han obtenido de estos estudios son prometedores en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

En México, los únicos estudios que se han llevado a cabo son de las especies *Coccoloba cozumelensis* y *C. spicata*, en los cuales se observó que ambas presentan actividad citotóxica y de inhibición de la enzima β -glucosidasa (Vera-Kú, 2003).

En un estudio realizado en Belo Horizonte, Brasil, se evaluó la actividad antimicrobiana de las distintas particiones de *Coccoloba acrostichoides*, frente a cepas de bacterias y hongos. De las particiones realizadas solamente la acuosa tuvo actividad contra las bacterias ensayadas (*Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*), mientras que las particiones de n-Hexano, diclorometano y acetato de etilo tuvieron actividad frente al hongo *Fusarium oxysporum*, destacando la partición de acetato de etilo (Cota y col., 2003).

La especie más estudiada de este género hasta el momento es *Coccoloba uvifera*. Con ella se han realizado una gran variedad de estudios, y se ha demostrado los efectos que tiene en melanocitos estimulados con luz UV, como lo son la actividad antioxidante, inhibición de la enzima tirosinasa, disminución de los niveles de interleucina-1 alfa (IL-1 α), disminución del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en ingles), así como la disminución en la liberación de la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α -MSH por sus siglas en ingles), (Sanchez y col., 2008).

Además de los ensayos de actividad biológica realizados a esta última especie mencionada, también se le han realizado estudios fitoquímicos, en los cuales se han logrado la identificación de moléculas de ácido gálico, ácido hexenodioico y benzopirano, que se muestran en la [figura 10](#) (Moreno y col., 2008).

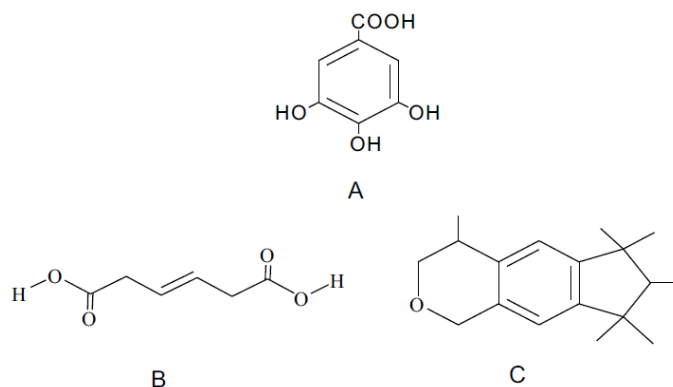


Figura 10. Metabolitos aislados de *Coccoloba uvifera*. Ácido gálico (A), ácido hexenodioico (B) y benzopirano (C).

Importancia de especies antioxidantes en el control de los radicales libres y el estrés oxidativo para la prevención de enfermedades

Se puede definir a un radical libre (RL), como una molécula que presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo de su estructura atómica (Figura 11). Esta configuración espacial vuelve a la molécula bastante inestable y reactiva por un corto periodo de tiempo pero le otorga una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas que conforman las estructuras celulares como los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocándoles un gran daño que puede derivar en la transformación o destrucción de éstas.

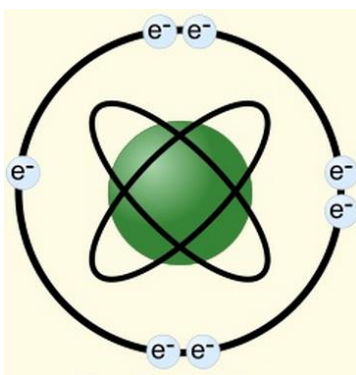
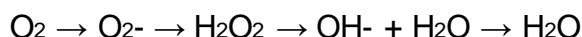
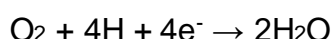


Figura 11. Radical libre.

El metabolismo celular normal es una fuente importante de radicales libres, pero estos también se producen por influencias externas cuando nuestro organismo se expone a los rayos UV, distintos contaminantes ambientales, a ciertos productos de limpieza como los pesticidas, desinfectantes, desengrasantes e incluso algunos fármacos.

Los radicales libres cumplen numerosas funciones fisiológicas, de las cuales destacan la activación de factores de transcripción y expresión de genes. A pesar de lo dañinas que podrían llegar a ser estas moléculas, si se mantiene el equilibrio entre la producción de éstas y la actividad de las diversas enzimas y moléculas antioxidantes presentes en nuestro organismo se puede llegar a evitar la aparición de numerosas enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo durante la respiración celular es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo un total de 4 electrones con producción de 2 moléculas de agua. La reacción global es la siguiente:



Una consecuencia de este proceso es la producción de intermediarios parcialmente reducidos que son las llamadas “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO): radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^-), cuya formación se puede observar en la [figura 12](#). El radical hidroxilo es por mucho el más dañino de los tres, con una vida media muy corta y una alta reactividad. El peróxido de hidrógeno no es estrictamente un radical libre pero tiene la capacidad de generar radical hidroxilo.

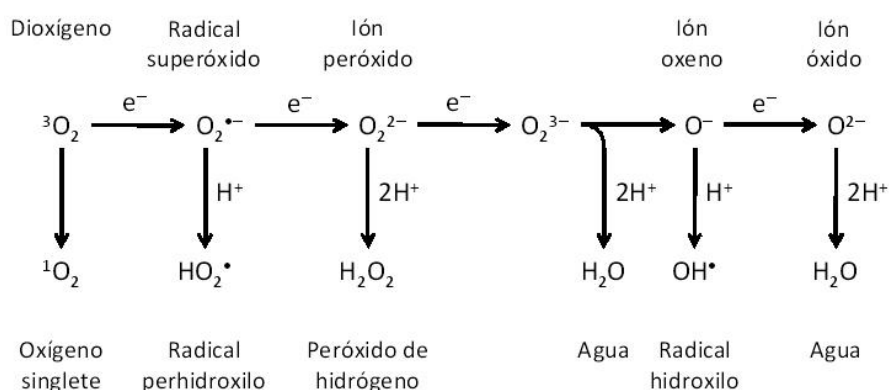


Figura 12. Formación de las distintas especies reactivas de oxígeno.

Otros radicales libres son las llamadas “Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno” (ERON): óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). Ambos tienen su origen en el óxido nítrico, que es un radical libre necesario a bajas concentraciones como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, y por su acción vasodilatadora, que hace que sea considerado un protector vascular, pero tóxico a altas

concentraciones. En el sistema cardiovascular el óxido nítrico producido por el endotelio es el responsable de la respuesta vasodilatadora esencial para la regulación de la presión arterial, inhibe la agregación plaquetaria, protege contra la hipoxia pulmonar y controla la circulación colateral. Además tiene efecto inmuno-modulador y citotóxico. Su acción lítica sobre varios tipos de células es utilizada por el sistema mononuclear fagocítico para destruir células extrañas o células propias degeneradas. Los efectos protectores del NO se ejercen donde no haya una excesiva producción de superóxido, porque en su presencia ambos reaccionan rápidamente generando peroxinitrilo, que produce nitración de proteínas y peroxidación lipídica con la consiguiente disfunción endotelial y aterogénesis.

En cuanto al daño producido por los radicales libres, la inestabilidad de estos ocasiona que colisionen con otras moléculas sustrayendo un electrón de ellas y por lo tanto oxidándola, haciendo que pierdan su función específica. En el caso de los lípidos, se dañan las estructuras ricas en ellos como las membranas celulares, alterando su permeabilidad y ocasionando edema y una consecuente muerte celular, por otro lado cuando se ven afectadas las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se incrementa el riesgo de desarrollar placas ateromatosas. Durante la oxidación lipídica, el ácido graso, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina, con lo que se propaga y perpetúa el proceso oxidativo, a este proceso es conocido como peroxidación lipídica. Otra molécula y quizás la más importante es el ADN, puesto que su daño por los radicales libres produce bases modificadas, las cuales juegan un papel determinante en el desarrollo de mutaciones, las cuales pueden conducir a una transformación celular (formación de tumores), o bien, a la pérdida de expresión por ciertos genes.

Existe un fenómeno que se encuentra directamente relacionado con los radicales libres, el “Estrés oxidativo”, que puede ser definido como el desbalance entre la aparición ERO's o ERON's, y la capacidad del organismo para contrarrestar la acción de estas mediante los sistemas de protección con antioxidantes naturales. El principal problema al que nos enfrentamos, es que el estrés oxidativo resultado de la excesiva producción de radicales libre, se ha establecido como el factor causal de patologías severas como

el cáncer o bien neurodegenerativas como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer y Parkinson).

Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia que estando presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable, por ejemplo una proteína, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Otra definición establece que son moléculas de origen endógeno o exógeno que poseen la capacidad de reducir la formación de radicales libres o bien, de reaccionar con ellos para neutralizarlos y así, proteger a la célula de un potencial daño oxidativo.

El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como el de la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Figura 13). Los antioxidantes poseen diferentes mecanismos de acción puesto que unos impiden la formación de los radicales libres, otros inhiben la acción de éstos y por último existen otros que favorecen la reparación o reconstitución de las estructuras biológicas dañadas.

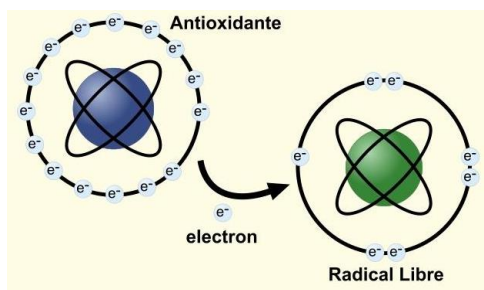


Figura 13. Neutralización de un radical libre por la acción de un antioxidante.

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Es necesaria la incorporación al organismo de ciertos

oligoelementos como el cobre, hierro, cinc, selenio y manganeso, ya que forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes.

El cuerpo humano produce una serie de poderosos antioxidantes endógenos, los cuales hacen frente al estrés oxidativo producido tanto por nuestro organismo como por factores ambientales a los que estamos expuestos diariamente. Estos antioxidantes son: el glutatión, la coenzima Q, el ácido tióctico y las enzimas superóxidodismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

El glutatión es el principal antioxidante hidrosoluble en el citoplasma de la célula. Es una proteína formada por tres aminoácidos: cisteína, glicina y ácido glutámico.

La coenzima Q, también conocida como ubiquinona, es un potente antioxidante liposoluble presente en todas las células del cuerpo que procede de la dieta y también es sintetizado en el organismo a partir de tirosina, fenilalanina y Acetil CoA. Se encuentra en todas las membranas celulares, principalmente en la de la mitocondria, donde participa en el sistema de transporte de electrones. Además, este antioxidante es capaz de proteger el ADN de la acción de radicales libres y también de impedir la peroxidación lipídica.

La catalasa es una enzima que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Se presenta en forma de hemotetrámero y se localiza en los peroxisomas.

La glutatión peroxidasa (GP) es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno en agua y alcohol, utilizando como agente reductor el glutatión reducido.

La superóxidodismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno (Figura 14). Está presente en todas las células, con una concentración diferente en los distintos tejidos proporcional a la actividad metabólica de cada célula. En humanos existen tres formas de superóxidodismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo. Las mutaciones en SOD1 se han

relacionado con la esclerosis lateral amiotrófica y su sobreexpresión se ha relacionado con el Síndrome de Down. Los otros dos tipos de enzimas no se han relacionado con ninguna patología conocida, sin embargo en ratones, la inactivación de SOD2 provoca la muerte perinatal, mientras que la inactivación de SOD1 causa hepatocarcinoma.

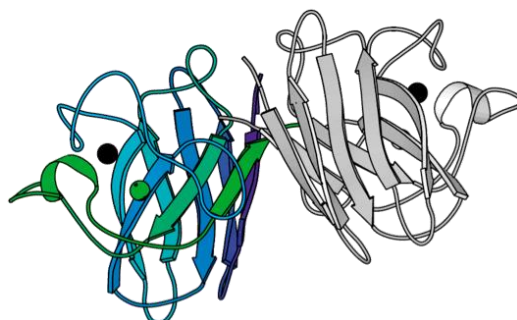


Figura 14. Estructura de la enzima superóxido dismutasa.

Además de los antioxidantes endógenos, existen antioxidantes exógenos, los cuales son obtenidos de la dieta, y dentro de los cuales se encuentran las vitaminas E y C, las cuales actúan donando o aceptando electrones en las reacciones de óxido-reducción. También existen minerales que regulan la actividad de las enzimas antioxidantes actuando como cofactores.

La vitamina E es un conjunto de compuestos fenólicos conocidos como tocoferoles y tocotrienoles. El α -tocoferol (Figura15), es el más común y biológicamente el que tiene mayor acción. Es un antioxidante lipofílico que se localiza en las membranas celulares, cuya absorción y transporte se encuentran muy vinculados con el de los lípidos. Se considera el más importante protector de las moléculas lipídicas, ya que su acción consiste en proteger de la peroxidación a las LDL y los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana celular. Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura al anión superóxido para convertirlo en formas menos reactivas.

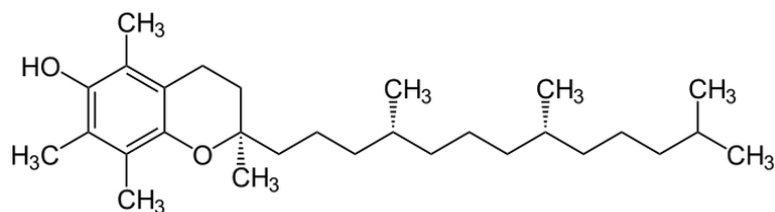


Figura 15. Estructura del α -tocoferol, forma más activa de la vitamina E.

La vitamina C o ácido ascórbico (Figura 16) es un importante antioxidante hidrosoluble que actúa potenciando el efecto de otros antioxidantes. No se sintetiza en el organismo, por lo que debe ser aportada por la dieta. Sus principales funciones son neutralizar el oxígeno singlete, capturar radicales hidroxilos y aniones superóxido y regenerar la forma oxidada de la vitamina E una vez que ha reaccionado con algún radical libre.

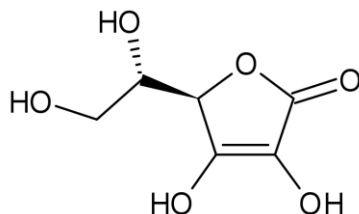


Figura 16. Estructura del ácido ascórbico.

En cuanto a los oligoelementos manganeso, cobre, selenio y zinc, actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes, pero también son capaces de ejercer funciones antioxidantes de manera independiente.

METODOLOGÍA

TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL Y GENERACIÓN DEL EXTRACTO

Recolección del material vegetal

La parte aérea de *Coccoloba barbadensis* fue recolectada el día miércoles 9 de julio del 2014 en el poblado Los Salazares, Nayarit, la cual se localiza a 46 km de la ciudad de Tepic, a una altitud de 80 msnm. El día de la recolecta fué un día soleado y húmedo, con una temperatura aproximada de 30°C. La especie fue autenticada por el taxónomo Dr. José Delgadillo Rodríguez, adscrito a la Facultad de Ciencias UABC campus Ensenada.



Figura 17. Ubicación del poblado Los Salazares, Nayarit.

Después de su recolección y su debida identificación, el material vegetal fue transportado vía aérea a la ciudad de Tijuana. El tallo fue cortado en pequeños trozos y puesto a secar a una temperatura ambiente promedio de 26°C junto con la hoja. Ya seco, se procedió a cortarlo en trozos más pequeños para poderlos someter a un proceso de maceración por separado.

Proceso de maceración

Se pesaron 416.6 g del tallo de *Coccoloba barbadensis* seco y cortado y se sometieron a una maceración con etanol. El disolvente se eliminó por rotaevaporación a presión reducida, guardando en refrigeración el extracto obtenido.

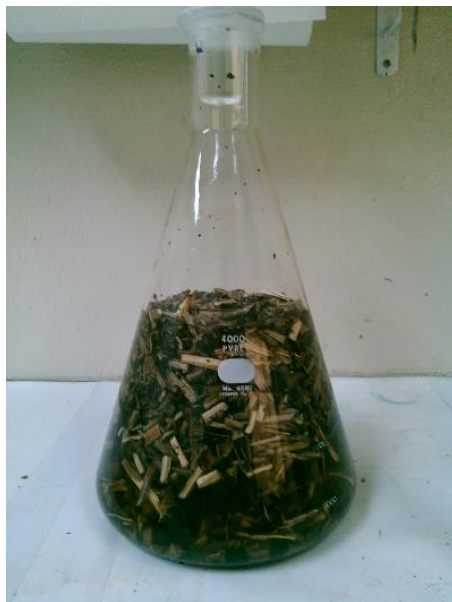


Figura 18. Maceración etanólica del tallo de *Coccoloba barbadensis*.

Proceso de partición

Se realizaron particiones del extracto etanólico del tallo con disolventes de distinta polaridad de la siguiente manera:

1. Se disolvió el extracto etanólico de tallo en 250 mL de agua destilada y 84 ml de etanol.
2. La disolución acuosa-alcohólica del extracto fue extraída 3 veces con n-hexano hasta obtener un volumen final de esta fase de 900 mL.
3. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento anterior con la fase alcohólica-acuosa, pero ahora utilizando con disolvente de extracción diclorometano.
4. La última partición fue llevada a cabo 3 veces con n-butanol al 99.4 % hasta obtener 900 mL de esta fase alcohólica.

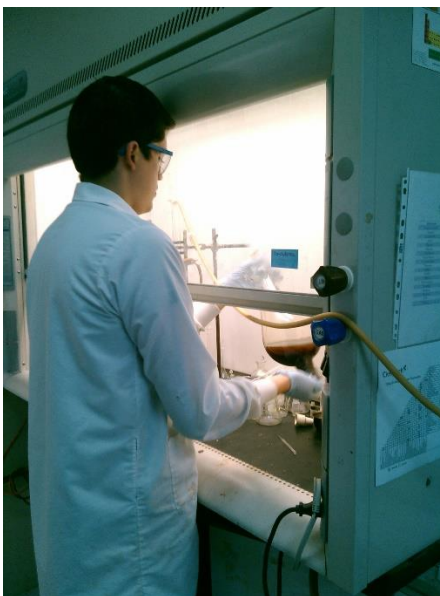


Figura 19. Proceso de partición.

PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

Identificación preliminar de metabolitos secundarios del extracto crudo

Para la detección de metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo, se realizaron una serie de ensayos, mediante los cuales fue posible identificar la presencia o ausencia de estos compuestos. En la siguiente tabla se muestran el nombre de estas metodologías:

Grupo químico	Método
Alcaloides	Mayer
	Dragendorff
	Wagner
Taninos	FeCl ₃
Esteroides y triterpenoides	Lieberman-Burchard
Flavonoides	Shinoda
Carbohidratos	Benedict
Saponinas	Espuma
	Rosenthaler
Glucósidos antraquinónicos	Borntrager
Cumarinas	Erlich

Tabla 1. Ensayos colorimétricos realizados.

Alcaloides

Los alcaloides son compuestos orgánicos derivados del metabolismo de los aminoácidos, son sustancias nitrogenadas de origen vegetal y que poseen un carácter básico debido al nitrógeno heterocíclico que contienen. La mayoría poseen diversas actividades biológicas incluso a dosis bajas.

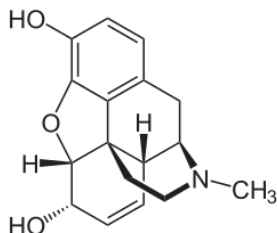


Figura 20. Estructura del alcaloide morfina.

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides de combinarse con el yodo y metales pesados como lo son el bismuto, mercurio y tungsteno, formando precipitados.

En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: la solución de yodo-yoduro de potasio (Reactivo de Wagner), mercurio tetrayoduro de potasio (reactivo de Mayer), tetrayodo bismuto de potasio (reactivo de Dragendorff), entre otros.

Procedimiento:

1. Se pesó 1 mg el extracto a evaluar (1 mg por cada prueba que se vaya a realizar).
2. Se disolvió en 1 mL de HCl al 5 % (para obtener una concentración final de 1 mg/mL).
3. Se calentó a baño maría en ebullición por 5 minutos.
4. Se añadieron 2 gotas del respectivo reactivo, según la prueba a realizar (Mayer, Dragendorff o Wagner).
5. Se observó si existió o no precipitado

Se utilizó el sulfato de quinina como estándar para estas pruebas.

Interpretación del resultado:

- Mayer (+): Precipitado color crema
- Dragendorff (+): Precipitado café-rojo
- Wagner (+): Precipitado café-rojo

Taninos

Son compuestos polifenólicos hidrosolubles que poseen la propiedad de unirse a proteínas para posteriormente precipitarlas. Debido a esto, para determinar la presencia de este grupo de metabolitos secundarios se emplea la gelatina, la cual al unirse a dichos compuestos genera un precipitado blanco. Por otra parte, mediante la adición de Cloruro Férrico al 10%, a una solución de extracto que posea taninos, produce un cambio de coloración que puede variar entre verde, azul o negra.

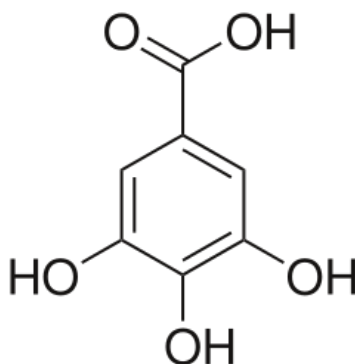


Figura 21. Estructura del ácido Gálico.

Procedimiento

Gelatina

1. Se preparó una solución de concentración 0.55 mg/mL del reactivo de gelatina.
2. Se pesó 1mg del extracto a evaluar.
3. Se disolvió en 1mL de disolvente afín al extracto.
4. Se añadieron 3 gotas del reactivo de gelatina.
5. Se observaron los cambios.

Cloruro férrico

1. Se pesó 1 mg del extracto a evaluar.

2. Se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto.
3. Se añadieron 2 gotas de Cloruro Férrico al 10 %.
4. Se observaron los cambios.

Se utilizó ácido gálico como estándar para estas pruebas.

Interpretación de resultados

- Cloruro férrico: Coloración verde, azul o negra
- Gelatina: Precipitado blanco

Esteroides y triterpenoides

Los esteroides, que son moléculas biogénicamente muy relacionados con los triterpenoides, y con un esqueleto cíclico base igual que los triterpenoides tetracíclicos, de ciclopentanoperhidrofenantreno.

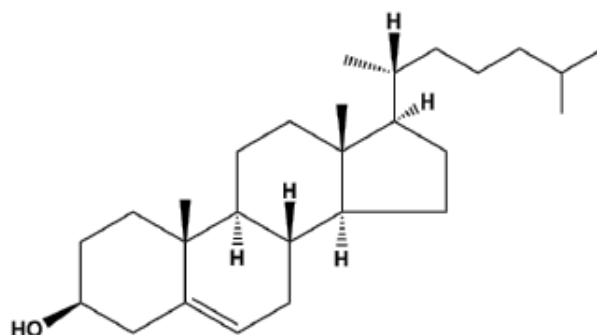


Figura 22. Estructura química del colesterol.

La reacción del colesterol con diferentes ácidos fuertes del tipo Bronsted y Lowry da como resultado coloraciones verdes, azules y violetas. Liebermann, en 1885 aprovechó este fundamento para proponer la reacción colorimétrica que lleva su nombre y la cual ha sido utilizada durante años para la determinación cualitativa y cuantitativa del colesterol. Inicialmente, el cloroformo se utilizó como disolvente para esta reacción, pero en la actualidad esta técnica puede realizarse en un medio constituido por ácido sulfúrico, ácido acético o cloroformo y anhídrido acético.

Procedimiento

1. Se pesó 1 mg del extracto a evaluar.
2. Se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto.
3. Se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcla ligeramente.
4. Se añadieron 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
5. Se observaron los cambios.

Se utilizó colesterol como estándar para esteroides y β -caroteno para triterpenoides.

Interpretación de resultados

- Esteroides y triterpenoides (+): Coloraciones azul-verde y violeta.

Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño oxidativo, como los rayos UV y la polución ambiental. Estos comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal

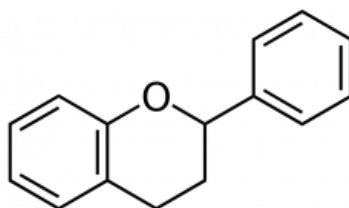


Figura 23. Estructura básica de un flavonoide.

Los flavonoides con el núcleo benzopirona (p. ej. flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado, al poner en contacto el HCl con magnesio metálico se genera hidrógeno, el cual reduce al flavonoide con el consecuente desarrollo de las coloraciones antes mencionadas.

Procedimiento

1. Se pesó 1 mg del extracto a evaluar.
2. Se disolvió en 2 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 0.5 mg/mL).
3. Se añadieron 3 gotas de HCl concentrado.
4. Se adicionaron limaduras de magnesio.
5. Se observaron los cambios.

El estandar utilizado para esta prueba fue la heperidina/diosmina extraídas de un medicamento comercial 50/450mg

Interpretación de resultados

- Flavonoides (+): Tonalidades de rojo

Carbohidratos

Los carbohidratos son compuestos orgánicos constituidos por carbono, hidrogeno y oxígeno, son elaborados y almacenados por las plantas y constituyen la principal fuente de energía para el hombre. Un ejemplo es la glucosa, cuya estructura se muestra en la [figura 24](#).

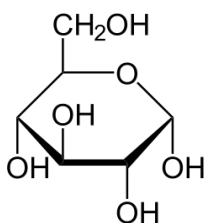


Figura 24. Estructura química de la glucosa.

Los carbohidratos reaccionan con el reactivo de Benedict, el cual está constituido por una disolución de sulfato cúprico, citrato de sodio y carbonato de sodio. Al tratar el azúcar con estos reactivos experimentan una reacción de oxidación. El cobre II en disolución acuosa, de color azul, se reduce a cobre I, el cual precipita como oxido de cobre I de color rojo.

Procedimiento

1. Se pesó 1 mg del extracto a evaluar

2. Se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto
3. Agregar 3 gotas del reactivo de Benedict
4. Calentar en baño de agua hirviendo
5. Observar los cambios

Los estándares utilizados para esta prueba fueron los carbohidratos lactosa y fructosa

Interpretación de resultados

- Carbohidratos (+): Precipitado de color café-rojo

Saponinas

Son glucósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico. Esta propiedad estructural, le confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos. Esta propiedad nos sirve para su identificación mediante la prueba de formación de espuma.

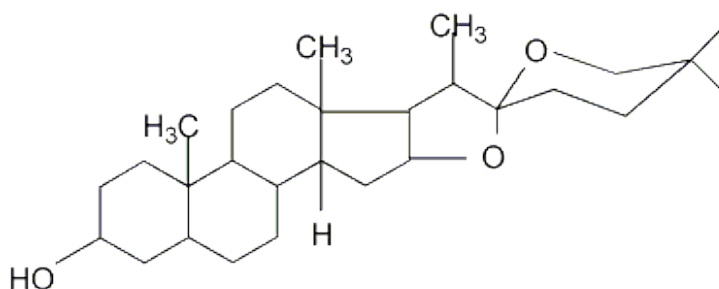


Figura 25. Estructura de la Sarsapogenina.

Procedimiento

1. Pesar 1 mg de extracto a evaluar.
2. Disolver en 1 mL de disolvente afín al extracto.
3. Agitar vigorosamente.
4. Observar los cambios.

Se utilizó saponina como estándar para estas pruebas

Interpretación de resultados

- Saponinas (+): Espuma estable por al menos 30 minutos.

Glucósidos antraquinónicos

Los glucósidos antraquinónicos contienen una aglicona derivada de la antraquinona. Se encuentran presentes en plantas medicinales como el ruibarbo y la sábila.

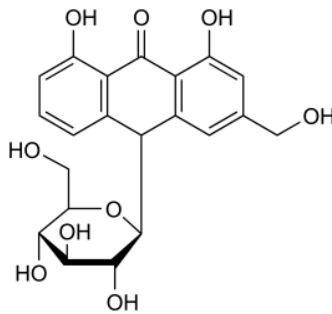


Figura 26. Estructura química de aloë-emodina.

Las antraquinonas y sus formas reducidas pueden reconocerse en muestras vegetales mediante el ensayo de Bornträger. En este ensayo, se utiliza una solución de ácido clorhídrico acuoso diluido, el cual hidroliza los glucósidos antraquinónicos y oxida las antronas y antranoles hasta antraquinonas; se extrae con cloroformo y cuando la fase clorofórmica se separa y se pone en contacto con una solución acuosa diluida en una base, esta fase pierde su color amarillo, y en caso de que la fase acuosa contenga antraquinonas, se tornara de color rojo.

Procedimiento

1. Se pesó 1 mg del extracto a evaluar.
2. Se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto.
3. Se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico al 5 %.
4. Se adicionó 1 mL de cloroformo.
5. Se añadieron 4 gotas de amoníaco al 10 %.
6. Se observaron los cambios.

Se utilizó ácido carmínico como estándar para esta prueba

Interpretación de resultados

- Glucósidos antraquinónicos (+): formación de un anillo rosa-rojo en la superficie de la fase acuosa.

AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Cromatografía en capa fina

La CCF (o TLC por sus siglas en inglés) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en los laboratorios de fitoquímica y que entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto.
- Comparar muestras.
- Realizar el seguimiento de una reacción.

Procedimiento

1. Tomar una placa de cromatografía con indicador fluorescente y cortar un rectángulo de 2 cm de ancho por 7 cm largo
2. Trazar una línea a 2 cm de altura en uno de los dos bordes de la placa con un lápiz y poner un pequeño punto en el centro de dicha línea, en la parte superior de la placa se traza otra línea pero esta última a 0.5 cm del final.
3. Disolver 1 mg del extracto a evaluar en 1 mL disolvente afin al extracto y que se volatilice de manera rápida.
4. Con un capilar se toma la muestra a analizar y se deposita sobre el punto que se trazó con el lápiz, de manera que se deje evaporar el disolvente entre cada punto que se coloque.
NOTA: Depositar de 2-3 capilares, o hasta que el punto se vea lo suficientemente concentrado.
5. En una cámara cromatografía se coloca el eluyente o fase móvil a utilizar (la cual dependerá de la polaridad de los compuestos de interés), cuidando que la altura de este se encuentre entre 0.5 y 1 cm de altura.
6. Se cierra herméticamente la cámara cromatográfica y se dejan pasar 5 minutos para que esta se sature con los vapores del disolvente.
7. Una vez que se ha saturado la cámara cromatográfica, se introduce la placa y se deja correr el disolvente hasta la línea superior, cuidando que esta entre en contacto con el eluyente de manera paralela, para que esta corra de pareja.
8. Cuando el eluyente ha alcanzado la línea superior, se retira la placa de la cámara y se deja secar sobre una superficie plana.

9. Observar la placa sin revelador.
10. Observar la placa revelando con luz UV de onda corta (234 nm).
11. Observar la placa revelada con reveladores químicos.

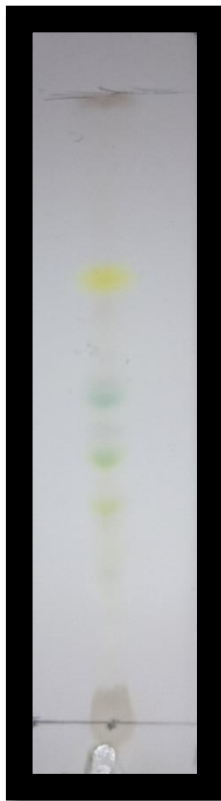


Figura 27. Ejemplo de cromatografía en capa fina revelada con Óleum.

Separación de compuestos mediante cromatografía preparativa en placa

Esta técnica se llevó a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio. Se utilizó para la separación y aislamiento de los componentes de una mezcla en cantidades comprendidas entre 100-200 mg.

Procedimiento

1. Se tomó una placa de cromatografía preparativa con indicador fluorescente.
2. Se trazó una línea de lado a lado a 5 cm de altura del borde inferior de la placa con un lápiz. Después se trazaron dos líneas del borde inferior al borde superior de la placa y que se encontraron a 3 cm de cada uno de los bordes laterales.
3. Se disolvieron 100 mg del extracto a evaluar en 5 mL disolvente afín al extracto.
4. Con ayuda de un algodón y una pipeta de Pasteur se comenzó a sembrar la muestra en la línea del borde inferior en el espacio entre las dos líneas laterales.
NOTA: La siembra tiene que tener una concentración uniforme, para que cuando comience el recorrido todas las bandas de compuestos corran de manera uniforme y paralela.
5. En una cámara cromatográfica se colocó el eluyente o fase móvil a utilizar, cuidando que la altura de este se encontrara entre 2 y 2.5 cm de altura.
6. Se cerró herméticamente la cámara cromatográfica y se dejó 10 minutos cerrada para que esta se saturara con los vapores del disolvente.
7. Una vez que se saturó la cámara cromatográfica, se introdujo la placa y se dejó correr el disolvente hasta la línea superior, cuidando que la placa entrara en contacto con el eluyente de manera paralela, para que este corriera parejo.
8. Cuando el eluyente alcanzó la línea superior, se retiró la placa de la cámara y se dejó secar sobre una superficie plana.
9. Se observó la placa sin revelador.
10. Se observó la placa revelando con luz UV de onda corta (234 nm).

NOTA: En este tipo de cromatografía no se utilizan reveladores químicos, debido a que los compuestos observados serán extraídos para su posterior caracterización.

11. Con una cuchilla se marcó la zona en donde se encontraron los distintos compuestos de interés.
12. Se raspó por separado cada uno de los compuestos marcados y se pasaron a un matraz Erlenmeyer limpio.
13. Se lavó el material raspado 3 veces con acetato de etilo y mediante un embudo con tapón de sílica gel, se filtró, quedando solamente en el matraz el compuesto purificado.
14. Se confirmó la pureza del compuesto mediante una cromatografía en capa fina y se identificó posteriormente mediante espectrometría de masas, así como Resonancia Magnética Nuclear de Protón y de Carbono.



Figura 28. Cromatografía preparativa en placa previa a ser introducida a la cámara cromatográfica.

EVALUACIÓN QUÍMICA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS

Determinación de fenoles totales

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el método de Folin-Ciocalteu. El ensayo de la vainillina, se utiliza para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos metahidroxilo libres en el anillo B.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, puesto que el reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, los cuales reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.



Figura 29. Colores obtenidos tras el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Procedimiento

Elaboración de curva estandar de ácido Gálico

1. Se pesó 1 mg de ácido Gálico y se disolvió en 1 mL de etanol.
2. Se adicionaron 3 mL de agua destilada previamente a 10 tubos por triplicado.
3. Se tomaron 100 μ L de la solución de ácido Gálico y se adicionaron al primer tubo, realizando diluciones seriadas y se desecharon los 100 μ L sobrantes del último tubo.
4. Se adicionaron 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar la disolución por 3 minutos.

5. Transcurrido el tiempo mencionado se añadieron 2 mL de una disolución de carbonato de sodio al 20 %.
6. Se mezcló todo y se dejó reposar por 1 hora en condiciones ambientales de luz y temperatura.
7. Se determinó la absorbancia de cada tubo a 650 nm.

Determinación de fenoles totales en el extracto a evaluar.

1. Se pesa 1 mg de extracto y se disuelve en 1 ml de etanol.
2. Se adicionaron 3 mL de agua destilada previamente a 2 tubos por triplicado.
3. Se tomaron 100 μ L de la solución de extracto y se adicionaron al primer tubo, este tubo se homogenizó y posteriormente se tomaron 100 μ L para ser añadidos al segundo tubo, mismo que se homogenizó y del que se tomaron 100 μ L para ser descartados.
4. Se adicionaron 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar la disolución por 3 minutos.
5. Transcurrido el tiempo mencionado se añadieron 2 mL de una disolución de carbonato de sodio al 20 %.
6. Se mezclaron ambas soluciones y se dejó reposar por 1 hora en condiciones ambientales de luz y temperatura.
7. Se determinó la absorbancia de cada tubo a 650 nm.

Para la obtención del resultado, se sustituyó la absorbancia promedio del segundo tubo en la ecuación de la recta obtenida de las distintas diluciones del estándar, y multiplicando el resultado por el factor de dilución (FD).

$$\text{Determinación de fenoles totales} = [(Densidad \acute{O}ptica \textit{media} + b) / m] * FD$$

El resultado se expresa en miligramos equivalentes de ácido Gálico por gramo de extracto (mg EqGA/g extracto).

Determinación de actividad antioxidante mediante la reducción del radical libre DPPH.

El método consiste en determinar la actividad antioxidante de los compuestos con base en su capacidad donadora de hidrógenos o neutralizadora de radicales libres.

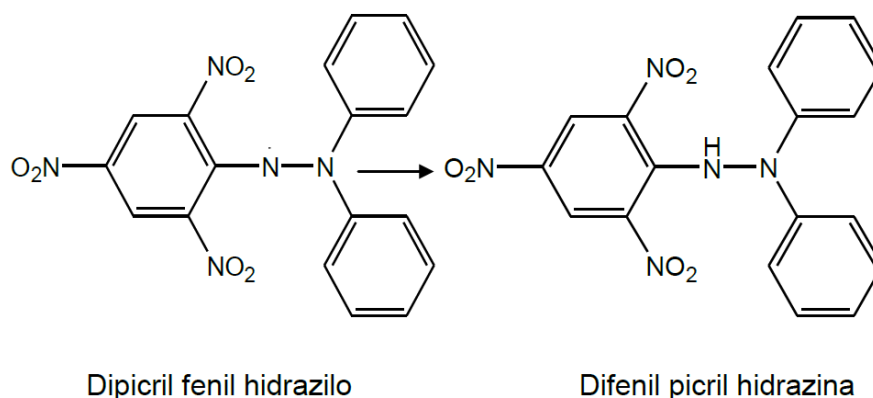


Figura 30. Reducción del radical DPPH.

El radical difenil picril hidrazilo (DPPH por sus siglas en inglés), posee un electrón desapareado, es de color azul-violeta, y se decolora en presencia de una sustancia antioxidante, convirtiéndose en difenil picril hidrazina.

Procedimiento

1. Se preparó una disolución de DPPH 125 μ M en etanol.
2. Se pesaron 2 mg de extracto y se disolvieron en 2 mL de etanol.
NOTA: En caso de que se presenten dificultades para la disolución del extracto se puede utilizar un sonicador.
3. Una vez disueltos los extractos, se agregaron 500 μ L de etanol a 9 de los 10 tubos por triplicado (dejando el primer tubo vacío).
4. Se añadieron 1000 μ L del extracto al primer tubo de cada una de las 3 filas.
5. Se realizaron diluciones seriadas en cada una de las 3 filas de tubos. Para ello se tomaron 500 μ L del primer tubo y se pasaron al segundo tubo, se homogenizó con

la micropipeta y se tomaron los mismos 500 µL para pasarlos al tercer tubo, se homogenizó con la micropipeta y se tomaron 500 µL para pasarlos al cuarto tubo, y así sucesivamente hasta que se llegó al décimo tubo en el cual se tomaron 500 µL y se desecharon, para que todos los tubos quedaran con un volumen final de 500 µL.

6. Se añadieron 500 µL de la solución de DPPH 125 µM a todos los tubos.
7. Se dejaron reposar los tubos por 30 minutos en ausencia de luz.
8. Antes de comenzar con la lectura de los tubos problemas, se realizó una lectura de la solución de DPPH 125 µM, puesto que es un dato que se requirió para realizar los cálculos. Dicha lectura se realizó en celda de cuarzo a 517 nm utilizando como blanco etanol.
9. Se realizó el mismo procedimiento con el estándar de Quercetina para obtener la curva de calibración y utilizarlo como control positivo.

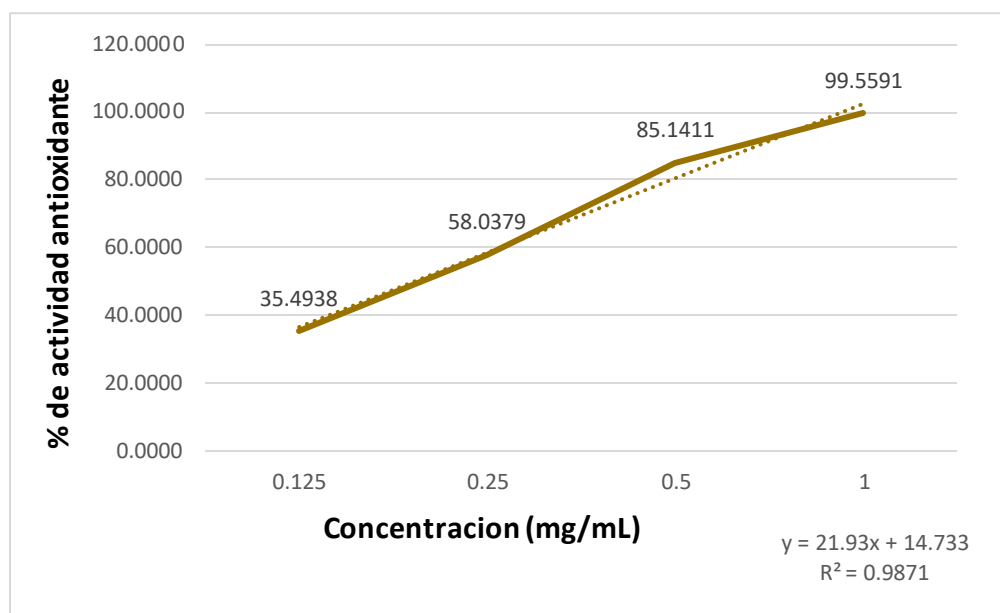
Para obtener los resultados se promediaron las absorbancias obtenidas de los 3 tubos de las distintas concentraciones para realizar los cálculos y obtener el porcentaje de reducción del radical DPPH o porcentaje de actividad antioxidante utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de actividad antioxidante} = 100 * [1 - (A_m/A_c)]$$

Donde:

- A_m = Absorbancia promedio de la muestra
- A_c = Absorbancia de la muestra control

Se elaboró una gráfica con los resultados obtenidos, donde el eje de las abscisas fue la concentración de las diluciones y el eje de las ordenadas fue el porcentaje de la actividad antioxidante. Posteriormente se determinó la ecuación de la recta, mediante la cual se obtuvo la CE_{50} , que es la concentración necesaria para neutralizar el 50% de los radicales libres.



Gráfica 1. Imagen que ejemplifica la gráfica con su respectiva ecuación de la recta para obtener la CE_{50} .

Determinación de actividad antioxidante mediante la reducción del radical catiónico ABTS.

El radical catiónico ABTS es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 415 ó 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin -6- sulfonato de amonio)) con persulfato de potasio.

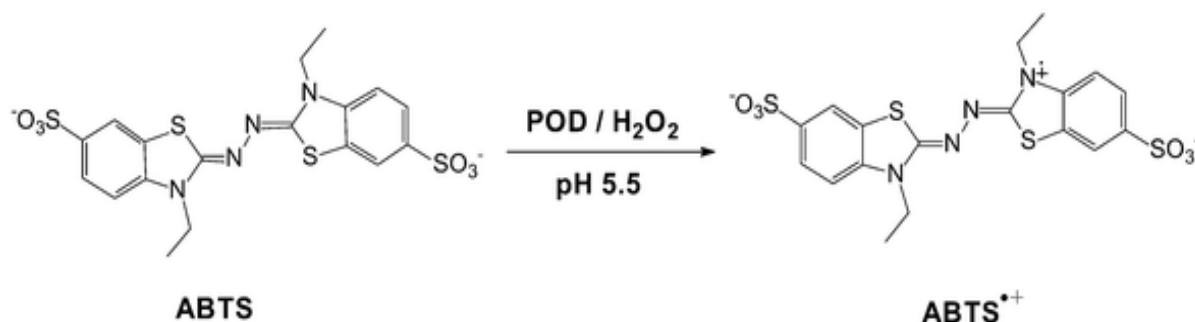


Figura 31. Generación del radical catiónico ABTS.

Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. Las mediciones se realizan a una longitud de onda de 734 nm.

Procedimiento

Generación del radical catiónico ABTS

1. Se pesaron en la balanza analítica 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g de ABTS, para posteriormente disolverlos en 5 mL de agua desionizada y se homogenizó la solución. Esta solución se dejó reposar 18 horas protegida de la luz para que se lleve a cabo la generación del radical.

Determinación de actividad antioxidante

1. Se tomaron 150 μ L de la solución patrón de ABTS y se diluyeron con 15 mL de metanol (esta solución fué protegida de la luz).
2. Se pesó 1 mg del extracto y se disolvió en 1 mL de etanol, para obtener una concentración final de 1 mg/mL.

3. Se añadieron 200 μL de la solución del extracto preparada anteriormente únicamente al primer tubo, este fué el tubo correspondiente a la concentración de 1 mg/mL.
4. Se añadieron 100 μL de etanol a los otros 9 tubos y se procedió a realizar diluciones seriadas por triplicado, de la misma manera como se realizaron en la metodología para la determinación de actividad antioxidante mediante la reducción del radical libre DPPH, modificando solamente la alícuota que en este caso fué de 100 μL .
5. Una vez obtenidas las 10 diluciones seriadas por triplicado, se montó otra gradilla con 30 tubos, a los cuales se les añadieron 20 μL de las disoluciones preparadas anteriormente en el mismo orden en el que se encontraban en la otra gradilla.
6. Estando listos los 20 μL de extracto en cada dilución, se adicionaron en todos los tubos 980 μL de la solución de ABTS que se preparó en el paso 1.
7. Se esperó 7 minutos para realizar las lecturas.
8. Mientras se incubaban los tubos, se realizó una lectura de la solución de ABTS sola a 734 nm, ya que se requirió esta absorbancia para los cálculos.
9. Una vez realizada la lectura del ABTS y transcurridos los 7 minutos, se procedió a leer el resto de los tubos a la misma longitud de onda.

Para obtener los resultados se promediaron las absorbancias obtenidas de los 3 tubos de las distintas concentraciones para realizar los cálculos y obtener el porcentaje de reducción del radical catiónico ABTS o actividad antioxidante utilizando la siguiente formula:

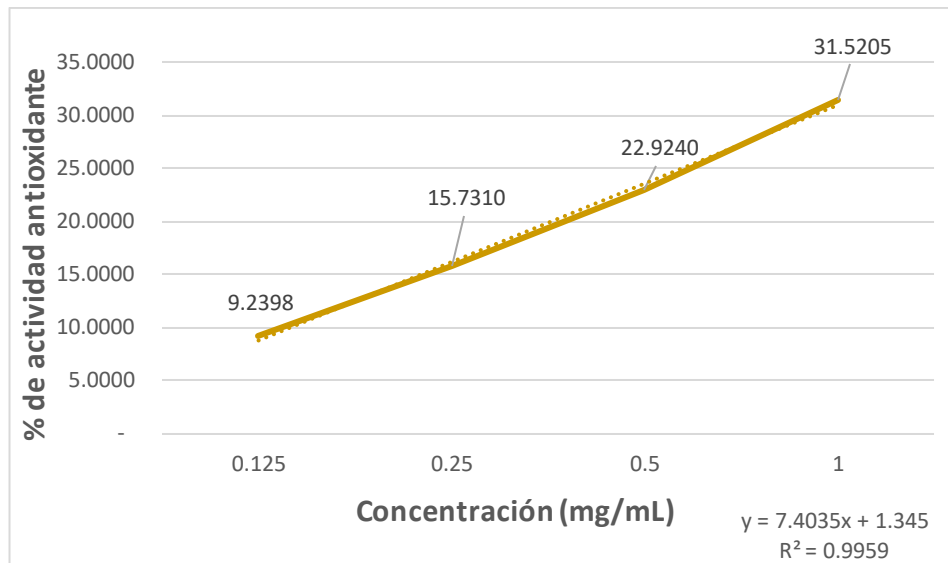
$$\% \text{ de actividad antioxidante} = [(A_i - A_f)/A_i] * 100$$

Donde:

- A_i = Absorbancia Inicial (del radical ABTS sólo).
- A_f = Absorbancia final (del radical ABTS junto con el extracto).

Se realizó una gráfica con los resultados obtenidos, donde el eje de las abscisas fué la concentración de las diluciones y el eje de las ordenadas fué el porcentaje de la

actividad antioxidante. Posteriormente se determinó la ecuación de la recta, mediante la cual se obtuvo la CE_{50} , que es la concentración necesaria para neutralizar el 50% de los radicales libres.



Gráfica 2. Imagen que ejemplifica la gráfica con su respectiva ecuación de la recta para obtener la CE_{50} .

Determinación de actividad antioxidante mediante la decoloración oxidativa del β -Caroteno.

Esta técnica se basa en el principio de que el ácido linoleico, que es un ácido graso insaturado, es oxidado por las especies reactivas de oxígeno presentes en el peróxido de hidrogeno. Los productos de la oxidación del ácido linoleico, inician la oxidación del β -caroteno, el cual comienza a decolorarse. Los compuestos con actividad antioxidante disminuirán o evitara la progresión de la decoloración.

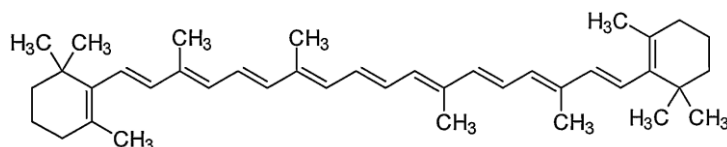


Figura 32. Estructura del β -Caroteno.

Procedimiento

1. Se sometió agua destilada a burbujeo durante 1 hora.
2. Se realizó una disolución de β -caroteno (0.5 mg de β -caroteno disuelto en 1 mL de cloroformo).
3. Se preparó una emulsión con 25 μ L de ácido linoléico y 200 μ L de Tween-20.
4. A esta emulsión se le adicionó 1 mL de la solución de β -caroteno.
5. Se agitó y se dejó evaporar el cloroformo.
6. Una vez evaporado, se adicionaron 100 mL de agua destilada (previamente en constante burbujeo).
7. Se agitó vigorosamente hasta la formación total de una emulsión.
8. Se pesaron 2 mg de extracto y se preparó una disolución con concentración de 2 mg/mL en el disolvente que más le favorezca al extracto.
9. Se tomaron 350 μ L de la disolución del extracto y se adicionaron a cada tubo (cada extracto por triplicado), posteriormente a cada tubo se le añadieron 2.5 mL de la emulsión preparada en el punto 7 de esta metodología.
10. Se midió la absorbancia a 470 nm inmediatamente después de agregar la emulsión (t= 0 minutos), y manteniendo los tubos en baño maría a 50 °C por 120 minutos se midió la segunda absorbancia al terminar dicho tiempo.

Interpretación de resultados

Las absorciones obtenidas fueron promediadas para calcular el porcentaje de actividad antioxidante mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de actividad antioxidante} = 100 * [1 - (A_m^0 - A^{120}) / (A_c^0 - A_c^{120})]$$

Donde:

A_m^0 = Absorbancia de la muestra a 0 minutos.

A_m^{120} = Absorbancia de la muestra a 120 minutos

A_c^0 = Absorbancia del control a 0 minutos

A_c^{120} = Absorbancia del control a 120 minutos

Se utilizó como control positivo el α -tocoferol, y como control negativo el metanol, que fué el disolvente base para la solución de extractos.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS

Evaluación de actividad citotóxica por el método de la sulforodamina B

La evaluación de la actividad citotóxica se realizó mediante el método de tinción con sulforodamina B, en las instalaciones de BIOLAB, laboratorio de investigación en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González”, en la Universidad de la Laguna, Tenerife, España, bajo la supervisión del doctor José Manuel Padrón.

Este método de tinción fue desarrollado en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, como una alternativa al empleo del método de reducción de MTT en el programa de tamizaje *in vitro* para el descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos.

La sulforodamina B (SRB) es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas, la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético (TCA). Después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (Solución de Tris pH 10,5) y se lee la absorbancia a 492 nm.

Se utilizaron seis líneas celulares distintas, derivadas de distintos tipos de cáncer humano, las cuales se mencionan en la siguiente tabla:

Línea celular	Origen
A549	Adenocarcinoma de epitelio basal alveolar
HBL-100	Cáncer del epitelio mamario
SW1573	Cáncer epitelial pulmonar
HeLa	Cáncer de cérvix
T-47D	Adenocarcinoma mamario
WiDr	Cáncer de colon

Tabla 2. Descripción de líneas celulares empleadas en el bioensayo.

Procedimiento

- **Mantenimiento celular**

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 μ M de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomycin en cámaras de 25 cm² a una temperatura de 25 °C, 5% de CO₂ y una humedad de 95%.

- **Desprendimiento celular (tripsinización)**

Para la realización del ensayo, la monocapa celular adherida a la pared de la cámara de 25 cm² fué retirada aspirando el medio de cultivo y lavando las células con solución salina PBS. Una vez seguros de no tener restos de medio de cultivo, se adicionó tripsina-EDTA para despegar la monocapa y con ayuda de medio de cultivo fresco se retiraron de la cámara.

- **Conteo celular.**

Se realizó un conteo celular de la suspensión obtenida, esto con la ayuda de un hematocitómetro, en el cual se fueron introducidos 75 μ L de suspensión, proporcionándonos el número de células presentes ($N \times 10^x$ células/ mL).

- **Adición de muestras.**

Las células ya contadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad entre 10000 y 20000 células por pocillo, esto dependiendo de la línea celular. Se incubaron por un periodo de 24 horas para tener un primer control celular.

Después de 48 horas, de sembradas las placas de 96 pocillos, los compuestos a evaluar se adicionaron. Cada producto fue previamente disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 400 veces mayor a la máxima concentración a evaluar en el ensayo (100 μ M). Las células control fueron expuestas a una concentración equivalente de DMSO (0.25% v/v, control negativo). Los ensayos se realizaron por triplicado a diferentes diluciones en un rango de 0.001-100 μ M.

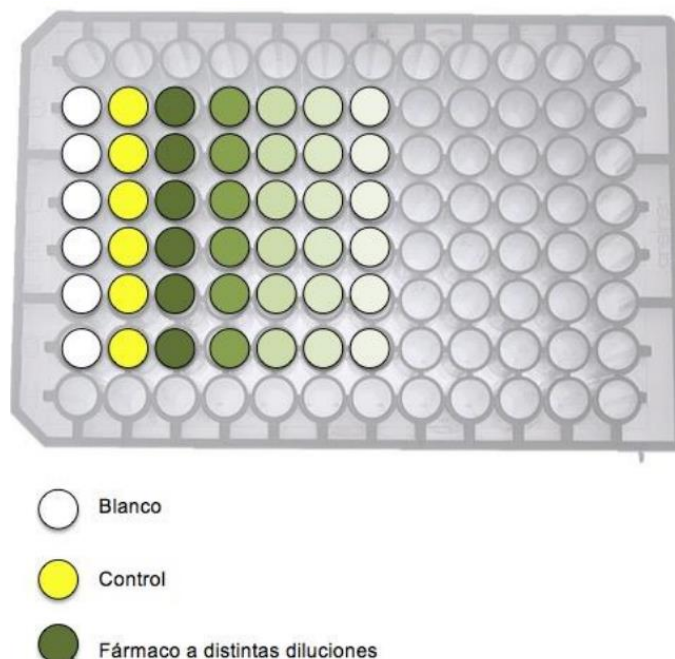


Figura 33. Distribución de muestras para el bioensayo en placa de 96 pocillos.

El tiempo de incubación de los compuestos fue de 48 horas, después de este tiempo, las células fueron precipitadas con 25 μL de ácido tricloroacético al 50% en agua fría y fijadas por 60 minutos a 4 °C. Pasado este lapso de una hora, fueron adicionados 25 μL de solución de SRB (0.4% v/v en ácido acético al 1%) y se dejó en reposo durante 15 minutos en obscuridad. Después de este proceso de tinción, el exceso de SRB fue eliminado y las placas fueron lavadas tres veces con ácido acético al 1% para remover el colorante no fijado. Una vez enjuagadas las placas, se eliminó el exceso de la solución de ácido acético y se dejaron secando a temperatura ambiente hasta no observar humedad. Secas las placas, el contenido de cada pocillo fue solubilizado con 10 μL de buffer Tris base (pH 10.5) durante 5 minutos.

La densidad óptica (OD) de cada pocillo fue medida a una longitud de onda de 492 nm, usando un espectrofotómetro para microplacas BioTek's PowerWade XS. Los resultados fueron expresados como GI_{50} o la concentración necesaria para reducir en un 50% el crecimiento de las células tratadas con el compuesto, comparadas con las células sin tratamiento.

Evaluación de actividad antifúngica

Para las pruebas de actividad antifúngica de los extractos, se utilizaron las siguientes cepas: *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma, aislada de madera de la vid; *Phomopsis viticola* MXS0915; *Colletotrichum* sp MX1015 y *Macrophomina phaseolina* aisladas de plantas de fresa; *Fusarium* sp. MXSQ01. Todos los aislados se mantuvieron en agar papa dextrosa (Difco) y forman parte de la colección del laboratorio de fitopatología del CICESE.

Procedimiento

1. Se preparó una solución madre de 1000 mg/mL disolviendo en acetona el extracto correspondiente.
2. Se complementó el medio de PDA con una cantidad apropiada de la solución madre para obtener una concentración de 100 µg/ mL.
3. Placas conteniendo 100 µg/mL de acetona y con el fungicida benomilo sirvieron como controles negativo y positivo respectivamente.
4. Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando placas de Petri de 3.5 cm de diámetro.
5. Las placas se inocularon en el centro con un disco de micelio de 0.5mm de los hongos correspondientes y se incubaron a 28 ° C.
6. El crecimiento radial se midió en milímetros hasta que el hongo en el control con acetona llenó la caja.

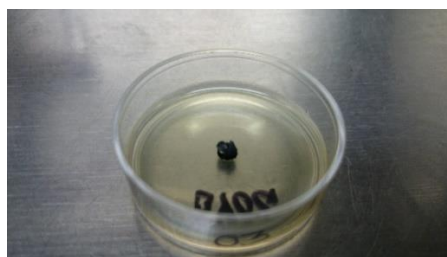


Figura 34. Inoculación del medio con extracto para determinación de actividad antifúngica.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

GENERACIÓN DEL EXTRACTO Y PARTICIONES

Maceración

Tras el proceso de maceración se obtuvo un total de 11.14g de extracto metanólico de tallo de *Coccoloba barbadensis*, lo que representa un porcentaje de rendimiento del 2.34%.



Figura 35. Extracto metanólico de *Coccoloba barbadensis* en rotaevaporador.

Particiones

Una vez realizadas las distintas particiones del extracto metanólico de tallo de *Coccoloba barbadensis*, los disolventes de las distintas particiones fueron rotaevaporados a presión reducida obteniéndose 0.772 g de la partición de n-hexano nombrado AEAS-03, 0.547 g de la de diclorometano nombrado AEAS-02 y por ultimo 5.16 g de la de n-butanol nombrado AEAS-01.



Figura 36. Extractos obtenidos de las distintas particiones de *Coccoloba barbadensis*.

PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

Resultados de pruebas colorimétricas

Pruebas colorimétricos					
Metabolitos	Método	Extracto crudo	AEAS-01	AEAS-02	AEAS-03
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-
Taninos	FeCl ₃	+	+	+	-
Esteroides y triterpenoides	Lieberman-Burchard	+	-	-	+
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-
Carbohidratos	Benedict	+	+	-	-
Saponinas	Espuma	-	-	-	-
	Rosenthaler	+	+	+	-
Glucósidos antraquinónicos	Borntrager	-	-	-	-
Cumarinas	Erlich	+	+	-	-

AEAS-01: Partición de n-Butanol; AEAS-02: partición de Diclorometano; AEAS-03: partición de n-Hexano.

Tabla 3. Resultados de identificación preliminar de metabolitos secundarios por pruebas colorimétricos

Tras realizar las distintas reacciones con el extracto crudo, se observó un resultado positivo para taninos, esteroides, triterpenoides, carbohidratos, saponinas y cumarinas.

Con respecto a los extractos generados de las distintas particiones, en el extracto AEAS-01, se identificó la presencia de taninos, carbohidratos, saponinas y cumarinas. Estos resultados son congruentes con respecto al tipo de molécula y la polaridad que estas pudieran presentar.

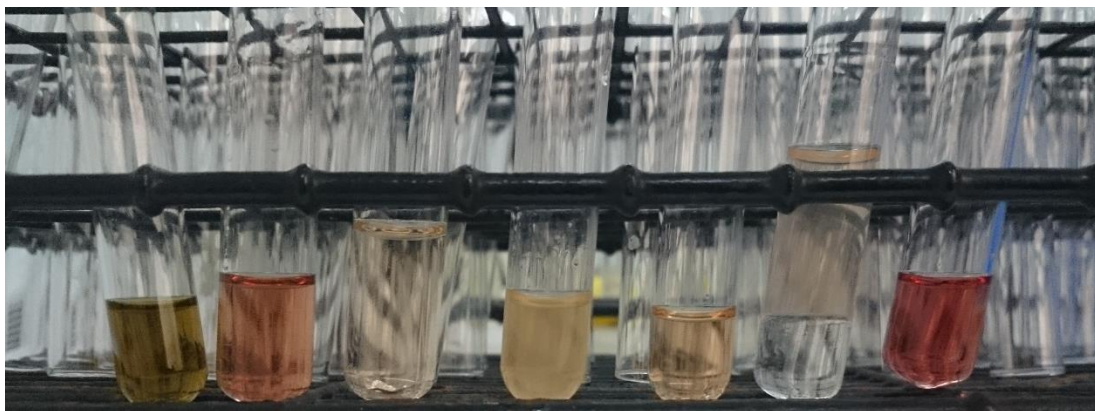


Figura 37. Pruebas colorimétricas realizadas al extracto AEAS-01

Los extractos AEAS-02 y AEAS-03 presentaron menor cantidad de compuestos. AEAS-02 dió positivo a la presencia de taninos y saponinas, mientras que AEAS-03 solo dió positivo para esteroides y triterpenoides, estos resultados al igual que con los del extracto AEAS-01 son congruentes debido a que en el caso de los esteroides y triterpenoides son moléculas de carácter apolar, razón por la cual se encuentran presentes en la partición de n-hexano.

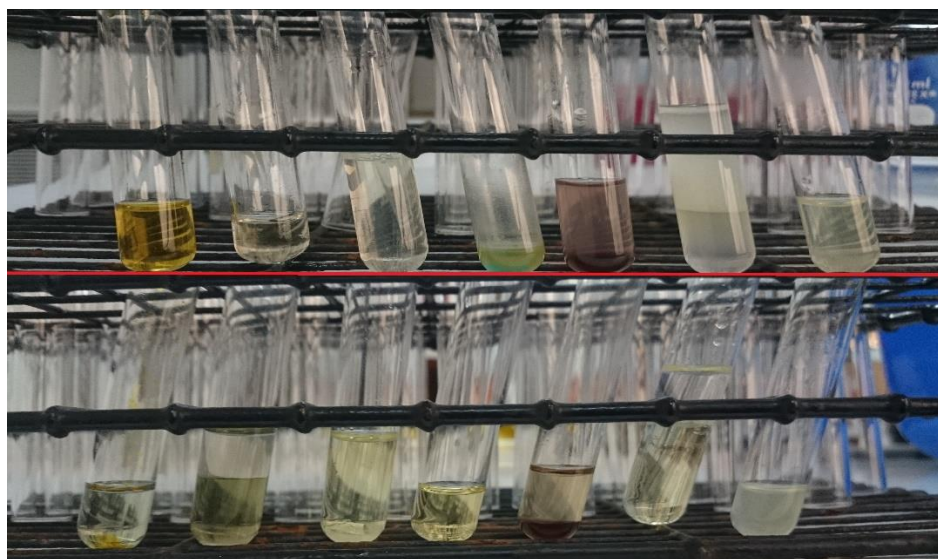


Figura 38. Pruebas colorimétricas realizadas a los extractos AEAS-01 (arriba), y AEAS-02 (abajo).

EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA

Análisis cuantitativo de compuestos polifenólicos totales

Extracto	$\mu\text{g EqAG/g}$ de extracto
AEAS-01	19.39
AEAS-02	24.83
AEAS-03	4.31

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

En el ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales, los resultados indicaron que el extracto AEAS-02 fué el que tuvo mayor cantidad, seguido por el extracto AEAS-01 y AEAS-03.

Estos resultados pueden relacionarse con el tipo de moléculas presentes en cada uno de los extractos, como en el caso del extracto AEAS-03, en el que las pruebas colorimétricas dieron positivas para esteroides triterpénicos, las cuales son moléculas que en general poseen una escasa cantidad de grupos fenólicos en sus estructuras.

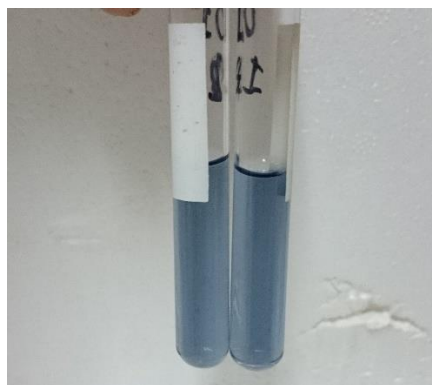


Figura 39. Tubos tras la reacción de Folin-Ciocalteu correspondientes a los extractos AEAS-01 (izquierda) y AEAS-02 (derecha).

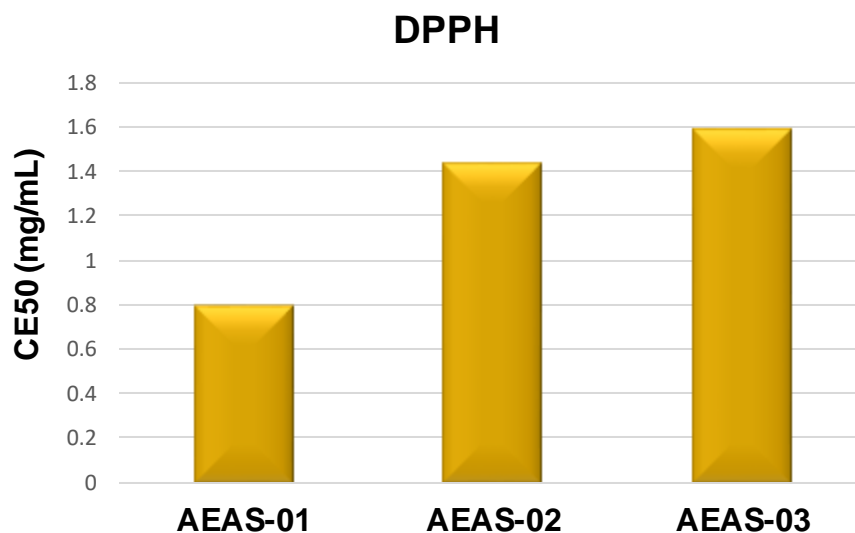
Resultados de actividad antioxidante por las técnicas de reducción del radical DPPH, reducción del radical catiónico ABTS y el método de decoloración oxidativa del β -caroteno

DPPH	
Extracto	CE ₅₀ (mg/mL)
AEAS-01	0.8025
AEAS-02	1.4470
AEAS-03	1.5980

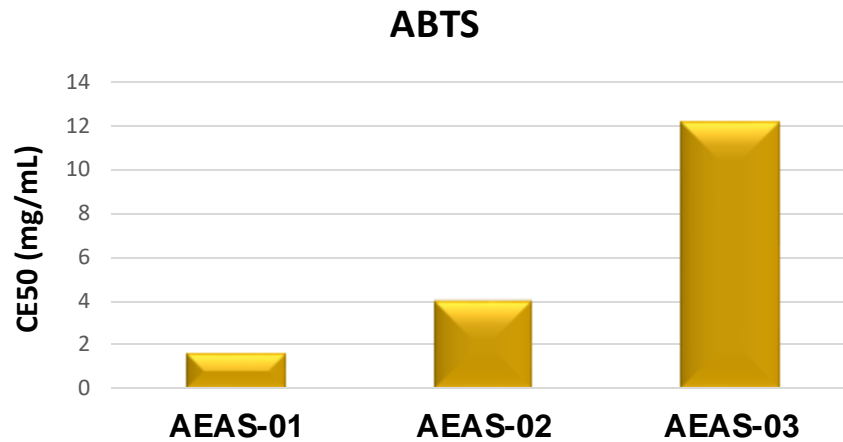
ABTS	
Extracto	CE ₅₀ (mg/mL)
AEAS-01	3.3346
AEAS-02	4.6420
AEAS-03	17.1986

ABTS	
Extracto	% Actividad antioxidante
AEAS-01	54.1301
AEAS-02	56.0475
AEAS-03	6.4815
α-tocoferol	59

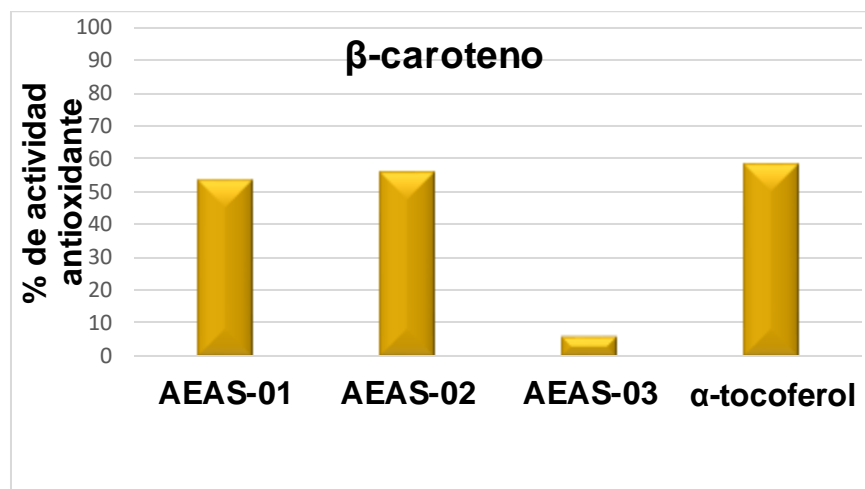
Tabla 5. Resultados de las distintas técnicas antioxidantes.



Gráfica 3. Resultados de actividad antioxidante por el método del radical DPPH.



Gráfica 4. Resultados de actividad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS.



Gráfica 5. Resultados de actividad antioxidante por el método del β-caroteno.

Después de analizar los resultados de la actividad antioxidante obtenidos por los diferentes métodos, se observó que el extracto AEAS-01, correspondiente a la partición de n-butanol fue el que tuvo una mejor actividad por los métodos de DPPH y ABTS con una concentración efectiva media de 0.8025 mg/mL y 3.3346 mg/mL respectivamente. Por otra parte el extracto AEAS-02, correspondiente a la partición de diclorometano, fue el que tuvo mejor actividad antioxidante por el método del β-caroteno con un porcentaje de actividad del 56.13%, resultado ligeramente inferior al control positivo que fue el α-tocoferol (59%).

Actividad citotóxica

Resultados del Screening para GI ₅₀ (µg/mL)							
Cmax	Referencia	Línea celular					
		A549	HBL-100	SW1573	HeLa	T-47D	WiDr
250	AEAS01	23	21	86	84	96	250
250	AEAS02	7	3	16	8	39	18
250	AEAS03	44	56	118	90	85	95
250	Cisplatino	ND	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.3	3.0 ± 0.4	15 ± 2.3	26 ± 5.3
250	Etopósido	ND	2.3 ± 0.9	3.0 ± 0.9	15 ± 1.5	22 ± 5.5	23 ± 3.1
250	Camptotecina	ND	ND	0.6 ± 0.4	0.25 ± 0.12	2.0 ± 0.5	1.8 ± 0.7

A549: adenocarcinoma de epitelio basal alveolar; HBL-100: cáncer del epitelio mamario; SW1573: cáncer epitelial pulmonar; HeLa: cáncer de cérvix; T-47D: adenocarcinoma mamario; WiDr: cáncer de colon; ND: control positivo no disponible.

Tabla 6. Resultados de actividad citotóxica obtenidos frente a distintas líneas celulares cancerígenas.

De los extractos evaluados AEAS-02 fué el que tuvo mejores resultados frente a la mayoría de las líneas celulares, de las cuales es necesario resaltar la HBL-100 correspondiente a cáncer de epitelio mamario, puesto que la GI₅₀ para esta línea celular fué de 3 µg/mL, lo que nos puede indicar que existe cierta selectividad hacia dicha célula.

Además de la buena actividad frente a la línea celular anteriormente mencionada, el extracto AEAS-02 mostró buen efecto frente a las líneas celulares HeLa y WiDr, correspondientes a cáncer de cérvix y cáncer de colon respectivamente, líneas celulares en las que los resultados superaron incluso los resultados del control positivo Etopósido, el cual fue uno de los primeros fármacos antineoplásicos obtenido a partir de productos naturales.

De los extractos restantes, el que tuvo una mejor actividad fue el AEAS-01, obteniéndose una GI₅₀ menor a los 25 µg/mL con las líneas celulares HBL-100 y A549, esta última correspondiente a adenocarcinoma de epitelio basal alveolar.

A pesar de que la actividad sobre la línea HBL-100 presentó la mejor GI₅₀ con tan solo 3 µg/mL, esto es, similar pero no inferior a la de los controles positivos, es importante destacar la actividad del extracto frente a las líneas HeLa y WiDr. En el caso de la línea

celular HeLa, la G_{50} fue de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual superó al control positivo Etopósido cuya concentración efectiva fué de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cuanto a la actividad frente a la línea celular WiDr, pese a que la concentración fué seis veces mayor que la que presentó sobre la línea celular HBL-100, se puede observar que la G_{50} es inferior que la de los controles positivos cisplatino y etopósido, los cuales son de los primeros fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer y cuyas concentraciones necesarias fueron de 26 y 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, mientras que la del extracto AEAS-02 fue de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Actividad antifúngica

De los extractos evaluados, el extracto crudo y el AEAS-03 fueron los que presentaron actividad antifúngica a una concentración de 100 mg/mL, al contrario de lo sucedido con los extractos mencionados, los extractos AEAS-01 y AEAS-02 no presentaron este tipo de actividad. Tanto el extracto crudo como el AEAS-03 actuaron sobre las cepas *Macrophomina phaseolina*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Phomopsis viticola*.

En el caso del extracto AEAS-03, el crecimiento radial promedio fue de 3 mm para *Macrophomina phaseolina*, 9 mm para *Lasiodiplodia theobromae* y 9.33 mm para *Phomopsis viticola*, las cuales se encuentran ordenadas respectivamente en la siguiente imagen:

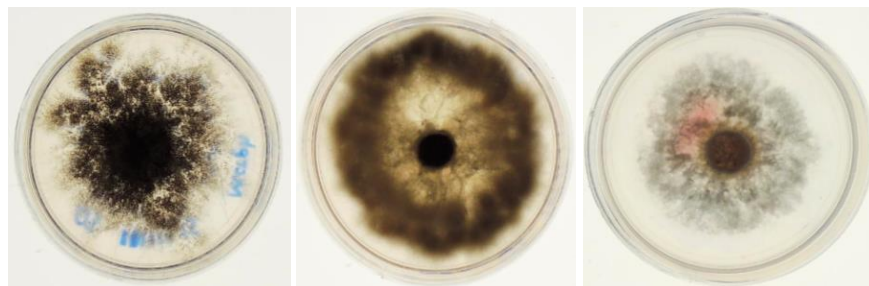
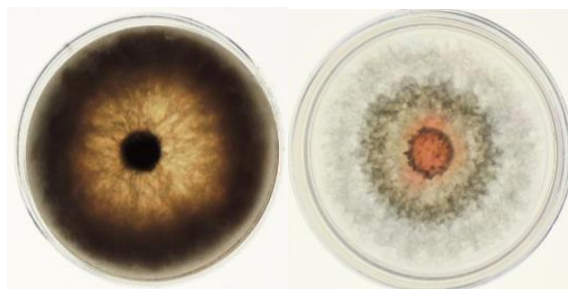


Figura 40. Crecimiento de los hongos sobre los que el extracto AEAS-03 presentó actividad.

Respecto al extracto crudo, tuvo una acción ligeramente menor que el extracto AEAS-03 sobre las mismas cepas, con un crecimiento radial promedio de 3.33 mm, 12.67 mm y 11.67 mm respectivamente hablando.



Figuran 41. Crecimiento de los hongos sobre los que el extracto crudo presento actividad.

Además de la disminución en el crecimiento de los hongos ambos extractos indujeron cambios en la morfología del hongo, cambios tanto en la pigmentación, como en la distribución del hongo en la placa.



Figura 42. Cambios que presentó la cepa de *Fusarium sp.* tras el cuarto día exposición a los extractos.

AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Resultados de ensayos cromatográficos para el aislamiento de metabolitos secundarios

Tras observar los resultados de las pruebas biológicas se decidió por la búsqueda de los compuestos bioactivos del extracto AEAS-02, que presentó un perfil bioactivo frente a líneas celulares cancerígenas; y AEAS-03, que presentó actividad antifúngica frente a hongos que causan problemas en sembradíos de la región.

Se realizaron primero las cromatografías en capa fina para buscar los compuestos mayoritarios que pudieran ser responsables de las actividades antifúngicas, utilizando como métodos de visualización la luz ultravioleta y posteriormente el óleoum.

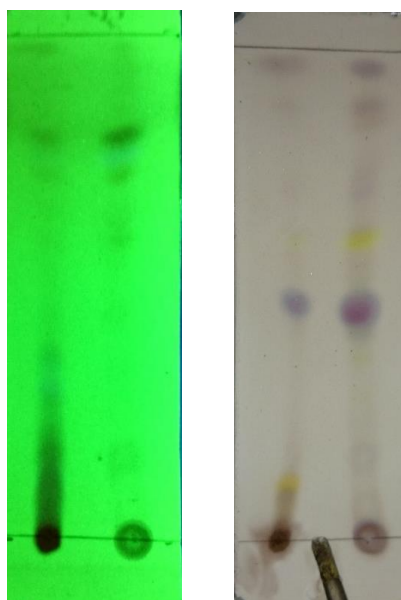


Figura 43. Misma placa de cromatografía de los compuestos AEAS-02 y AEAS-03 revelada con luz UV y óleoum respectivamente.

El revelado de la placa cromatográfica nos permitió apreciar los compuestos mayoritarios presentes en ambos extractos, además de darnos también, una idea de la mezcla eluyente ideal para la separación posterior de los compuestos en la cromatografía preparativa en placa. Para la mezcla eluyente ideal, se inició con una mezcla de n-hexano con acetato de etilo al 20%, debido a que este es un disolvente de baja polaridad, mientras que el acetato de etilo es considerado como disolvente de polaridad media.

Debido a que esta fase móvil separaba la mayoría de los compuestos pero no los de interés, se optó por incrementar la polaridad al aumentar gradualmente la concentración del acetato de etilo del 20% al 30%. Este aumento en la polaridad nos ayudó a separar de manera más eficiente los compuestos de interés, razón por la cual se eligió como la mezcla eluyente ideal.

Una vez que se obtuvo apropiadamente la fase móvil, se procedió a preparar las placas preparativas para la separación y purificación de los compuestos de interés.

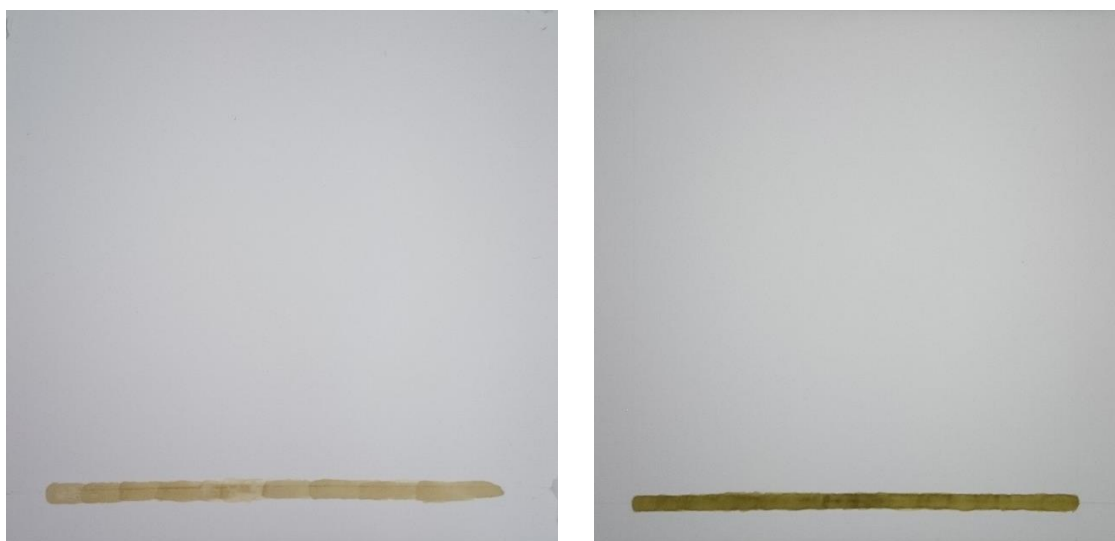


Figura 44. Sembrado de cromatografía preparativa en placa de AEAS-02 (izquierda) y AEAS-03 (derecha)

Al concluir el recorrido con la mezcla de n-hexano con acetato de etilo al 30%, los compuestos de interés solamente pudieron ser observados en la placa con luz UV.

En la cromatografía preparativa correspondiente al extracto AEAS-02 a pesar de haber sembrado 100 mg, las concentraciones de las distintas regiones en donde se localizaban los compuestos de interés se apreciaban un poco bajas en comparación a las concentraciones observadas en la cromatografía en placa fina. Al realizar el raspado de estas regiones junto con su posterior lavado y filtrado, las cantidades obtenidas fueron insuficientes para su identificación por las técnicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

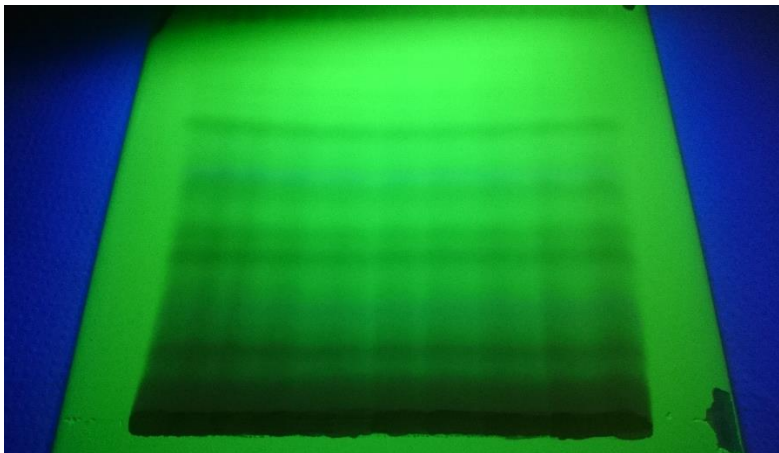


Figura 45. Cromatografía preparativa del extracto AEAS-02 revelada con luz UV

En cuanto a la cromatografía preparativa en placa del extracto AEAS-03, la concentración de las regiones de los metabolitos de interés, también fue baja a excepción de un compuesto en la zona superior de la placa. Por ello se decidió raspar solamente dos regiones, la del compuesto que poseía una buena concentración y una que se encontraba justo debajo de esta.

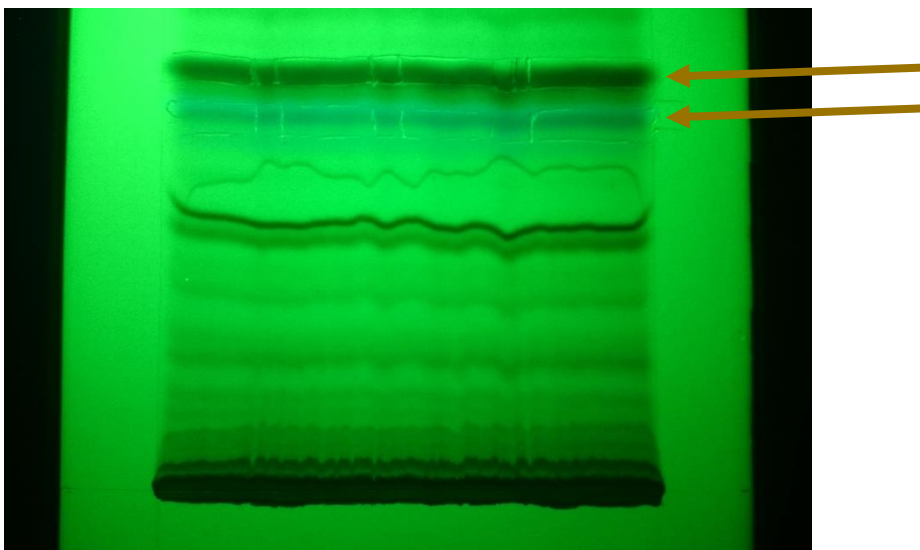


Figura 46. Cromatografía preparativa del extracto AEAS-03, en la que se marcaron las regiones de interés en la parte superior.

Tras el lavado y filtrado de la región inferior solamente se obtuvieron 2.5 mg de producto, cantidad que es insuficiente para realizar los estudios de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

Por otra parte, de la región superior, se obtuvieron 7.5 mg de compuesto, misma a la que se le realizó una cromatografía en capa fina para verificar su pureza.

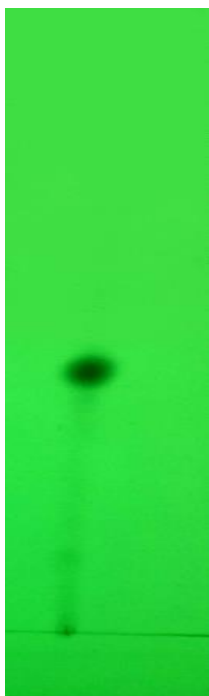


Figura 47. Compuesto aislado de la cromatografía preparativa de AEAS-03

Una vez que se verificó la pureza del compuesto aislado, la muestra fue disuelta en cloroformo deuterado para realizar los estudios de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono trece y experimentos bidimensionales, así como pruebas de espectrometría de masas para confirmar la identificación. Después de haber interpretado los resultados que arrojaron las distintas graficas del equipo de resonancia y del espectrómetro de masas, se determinó que el compuesto aislado se trataba de un esteroil llamado β -sitostenona, que es un esteroil proveniente del metabolismo del β -sitosterol.

Identificación de metabolitos secundarios mediante técnicas de RMN ¹H, RMN ¹³C y correlaciones de HMBC y COSY

POSICIÓN	δH^{α}	δC^{β}	HMBC	COSY
1	1.18 (m)	35.65	19	
2	2.28 (m, 2H)	32.07	----	4
3	-----	199.8	----	
4	5.65 (S, 1H)	123.74	----	2
5	-----	171.68	19	
6	1.93 (m, 2H)	33.95	----	7
7	1.18 (m)	33.91	----	6
8	1.52 (m)	35.71	----	
9	1.52 (m)	53.83	19	
10	-----	38.61	----	
11	1.18 (m)	21.04	----	
12	1.18 (m)	39.65	18	
13	-----	42.41	----	
14	1.52 (m)	56.04	----	
15	1.18 (m)	24.19	----	
16	1.18 (m)	28.18	----	
17	1.52 (m)	55.9	18, 21	
18	0.64 (S, 3H)	11.97	12, 17	
19	1.12 (S, 3H)	19.03	5, 9, 1	
20	1.52 (m)	36.11	----	21
21	0.85 (d, $J = 6.6$ Hz)	18.7	17, 22	20
22	1.18 (m)	33.98	21	
23	1.18 (m)	29.13	----	
24	1.52 (m)	45.86	27, 26	
25	1.52 (m)	26.13	----	26, 27
26	0.79 (d, $J = 6.7$ Hz)	17.39	27, 24	25
27	0.77 (d, $J = 6.7$ Hz)	19.87	24, 26	25
28	1.18 (m)	23.09	----	
29	0.82 (t, $J = 6.5$ Hz)	11.97	----	

^a δ en ppm,; datos basados en experimentos COSY; valores de J en Hz.

^b δ en ppm,; datos basados en experimentos HSQC y HMBC.

Tabla 7. Datos de RMN ¹H, RMN ¹³C y correlaciones de HMBC y COSY, realizados en CDCl₃.

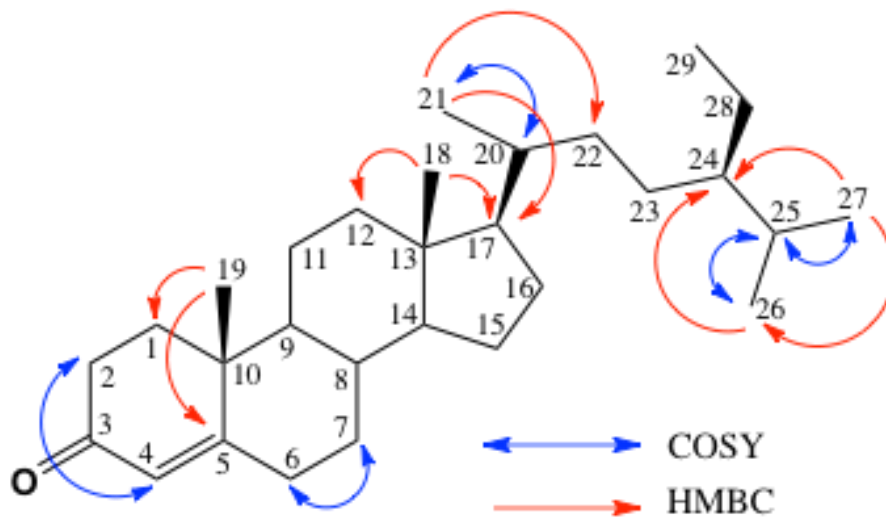
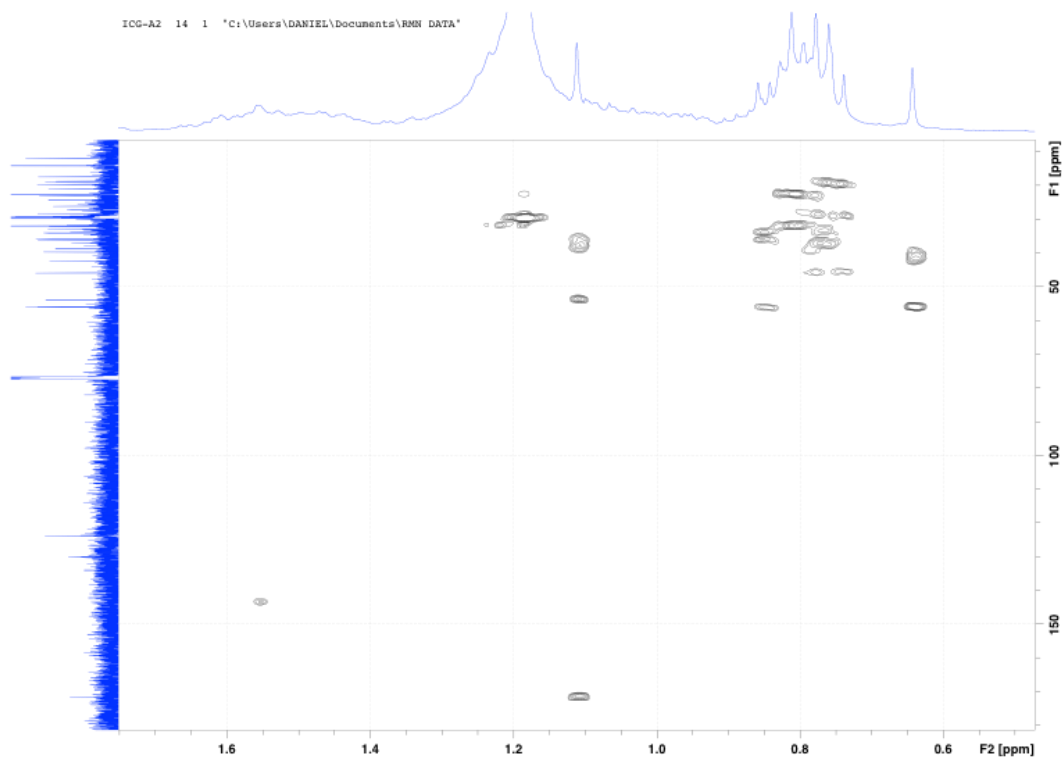


Figura 48. Correlaciones de HMBC y COSY



Grafica 6. Experimento bidimensional HMBC de β -sitostenona

Este producto, proveniente del extracto AEAS-03, se aisló como un sólido amorfo. En espectrometría de masas de alta resolución presentó un ión molecular a m/z 412.5 que se corresponde a una fórmula molecular de $C_{29}H_{48}O$.

En el espectro de RMN 1H se observó un singlete a 5.65 τ con integración de uno, que indica la presencia de un hidrógeno vinílico; a campo alto entre 0.85 y 0.77 δ aparecen cuatro señales con constantes de acoplamiento de $J = 6.7$ Hz (doblete), $J = 6.7$ Hz (doblete), $J = 6.6$ Hz (doblete), y $J = 6.5$ Hz correspondiente a un triplete, asignables a los metilos C-27, C-26, C-21 y C-29 respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron 29 átomos de carbono; sus asignaciones fueron realizadas mediante un experimento bidimensional HSQC, en donde se observa la presencia de un carbono cuaternario a 171.68 δ y un carbonilo cetónico a 199.80 δ , que son asignables a los carbonos C-5 y C-3 respectivamente en la estructura de la molécula.

En el experimento bidimensional COSY (Figura 47 y tabla 7), se corrobora la existencia del protón vinílico H-4, los hidrógenos alílicos H-6 y la presencia de los grupos metilo: 21, 26, 27 y 29.

El experimento HMBC (Figura 47 y Tabla 7) del compuesto en análisis, muestra correlaciones a 3 enlaces de los protones H-19 con los carbonos C-5 y C-1, corroborando la presencia del carbono saturado C-5 que forma parte del sistema cetónico α, β insaturado. Asimismo, el protón H-18 presenta correlación a tres enlaces con los carbonos C-12 y C-17, y otras correlaciones escalares de los hidrógenos metílicos H-21, H-26, H-27 y H-29, lo que se establece con esta información, la presencia de una estructura parcial de un sistema hidrocarbonado tipo esteroidal.

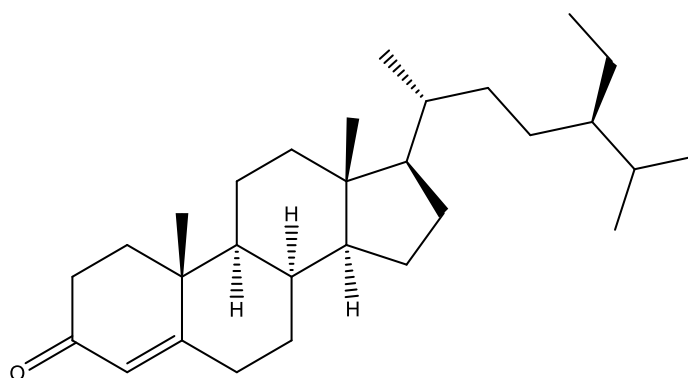


Figura 49. Estructura del metabolito aislado β -sitostenona

CONCLUSIONES

Tras el análisis de datos y la discusión de resultados del presente trabajo de tesis, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se logró la obtención de 3 extractos de diferente polaridad, AEAS-01, AEAS-02 y AEAS-03, a partir de los cuales se realizaron ensayos de caracterización química y biológica *in vitro*.
- En la evaluación de la actividad antioxidante, los extractos que mostraron mejores resultados con los distintos métodos utilizados fueron el AEAS-01 y AEAS-02. Se sugiere que este efecto de inhibición química, está relacionado con la cantidad de compuestos fenólicos presentes en un extracto (Wang y col., 2015).
- De los extractos evaluados AEAS-02 fue el que tuvo mejores resultados frente a la mayoría de las líneas celulares, de las cuales es necesario resaltar la HBL-100 correspondiente a cáncer de epitelio mamario, puesto que la GI₅₀ para esta línea celular fué de 3 µg/mL, lo que nos indica que existe cierta selectividad hacia dicha línea celular.
- El extracto AEAS-03 fue el que presentó mejor actividad antifúngica al disminuir en un 73% el crecimiento del hongo *Macrophomina phaseolina*, induciendo cambios en su morfología macroscópica, así como también en la morfología de *Fusarium sp.*
- Se logró el aislamiento del metabolito β-sitostenona, un compuesto derivado del metabolismo del β-sistosterol, aislado anteriormente en *Polygonum bistorta* y otras plantas pertenecientes a la familia Polygonaceae, pero que no había sido aislado en especies del género *Coccoloba*.
- El producto β-sitostenona fue caracterizado estructuralmente como un producto de tipo triterpenoide, mediante técnicas de espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear, utilizando experimentos de correlación homonuclear COSY ¹H-¹H y heteronuclear HSQC y HMBC.

- Dado los resultados obtenidos, se sugiere continuar con el aislamiento e identificación de otros compuestos de las distintas particiones de *Coccoloba barbadensis*, haciendo énfasis en el contenido del extracto bioactivo AEAS-02, en donde sus metabolitos pueden ser candidatos de interés desde el punto de vista farmacológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

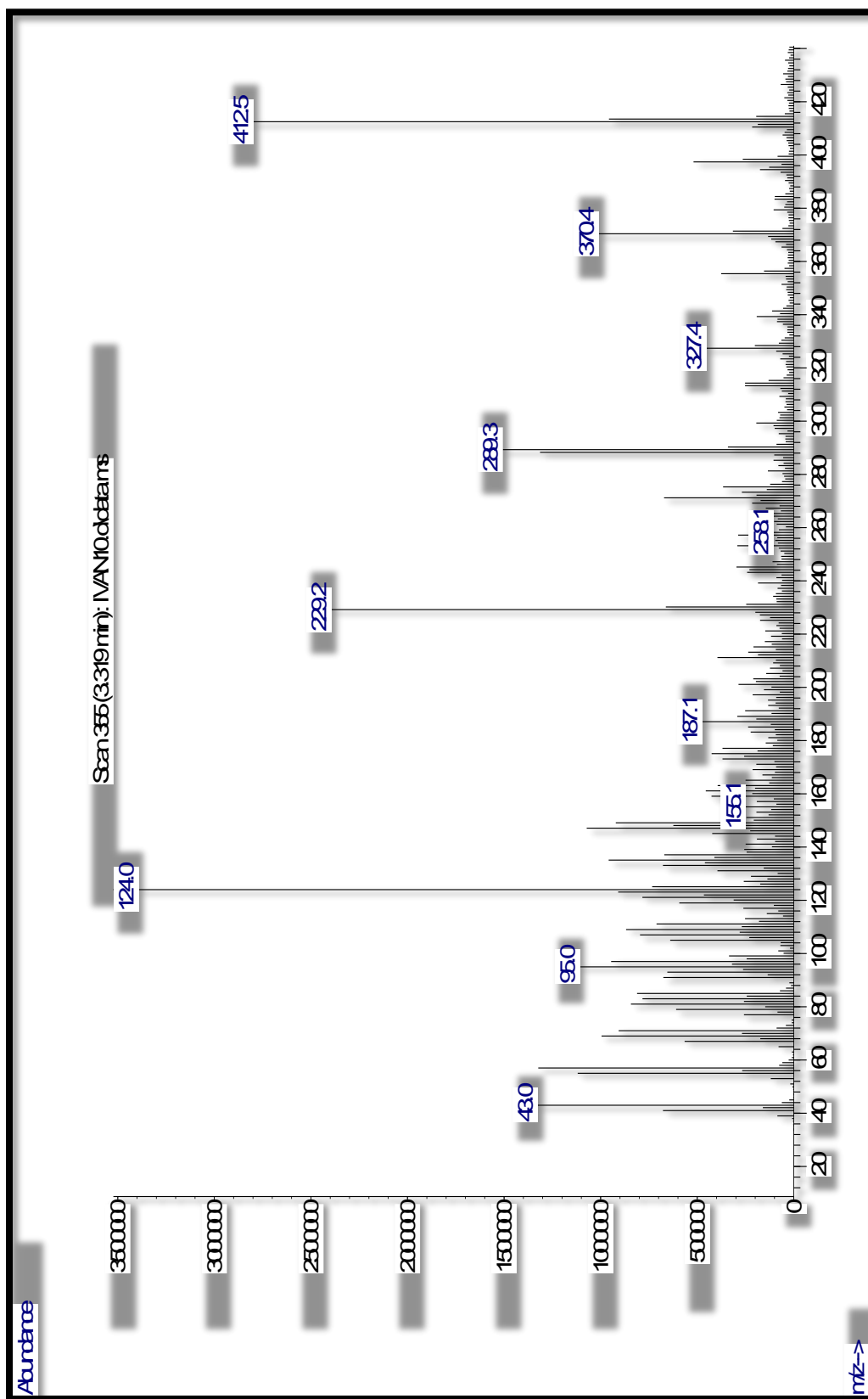
1. Anita Ankli *et al.* "Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses". *Journal of Ethnopharmacology*. 2002.
2. Aurelia Magdalena Pisoschi and Aneta Pop. "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review". *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015
3. B. Frei *et al.* "Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation". *Phytomedicine*. 1998.
4. Bernhard Kadenbach *et al.* "Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function". *Cell press*. 2009
5. Betania Barros Cota *et al.* "Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*". *Fitoterapia*. 2003
6. Carlos Castillejos Cruz y Eloy Solano. "Flora del bajo y de regiones adyacentes: *Familia Polygonaceae*". Herbario FEZA, Universidad Nacional Autónoma de México. 2008
7. David M. Ansley and Baohua Wang. "Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart". *Journal of Pathology*. 2013
8. Dimitri Kozyrev and Vasily Slutsky. "Handbook of free radical: Formation, Types and effects". *Cell Biology Research Progress Series*. 2010
9. Fahimeh Moradi-Afrapoli *et al.* "In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*". *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012.
10. Fan P. *et al.* "*Polygonum sachalinensis* F. Schmidt ex Maxim (Polygonaceae)". *Fitoterapia*. 2010
11. Fernanda M.F. Roleira *et al.* "Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties". *Food Chemistry*. 2015.
12. Jean Bruneton. "Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales". Editorial ACRIBIA S.A. 2da Edición. 1993.
13. Jessica Eleonora Pedroso Sanches Silveira *et al.* "Effects of *Coccoloba uvifera* L. on UV-stimulated melanocytes". *Journal compilation: Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 2008.

14. José Sarukhán y colaboradores "Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad" CONABIO. 2009
15. Lifeng Wang *et al.* "Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) seed meal". Food Chemistry. 2015
16. Maira Rubí Segura Campos *et al.* "*Coccoloba uvifera* (L.) (*Polygonaceae*) Fruit: Phytochemical Screening and Potential Antioxidant Activity". Journal of Chemistry. 2014.
17. Michael Heinrich *et al.* "Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance". Social science and medicine. 1998.
18. Nur Alam *et al.* "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity". Saudi Pharmaceutical Journal. 2013.
19. Osbaldeston y Wood. "Dioscorides, de Materia Medica". IBIDIS. 2000.
20. Peihong Fan *et al.* "Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of
21. Reinaldo Sosa Gómez. "EL poder medicinal de las plantas". Asociación Publicadora Interamericana. 1997.
22. Shah Unnati *et al.* "Novel anticancer agents from plant sources". Chinese Journal of Natural Medicines. 2013.
23. Torbjörn Persson *et al.* "Oxidative Stress in Alzheimer's disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail?". Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2014.
24. Venus Sosa *et al.* "Oxidative stress and cancer: An overview". Ageing Research Reviews. 2013.

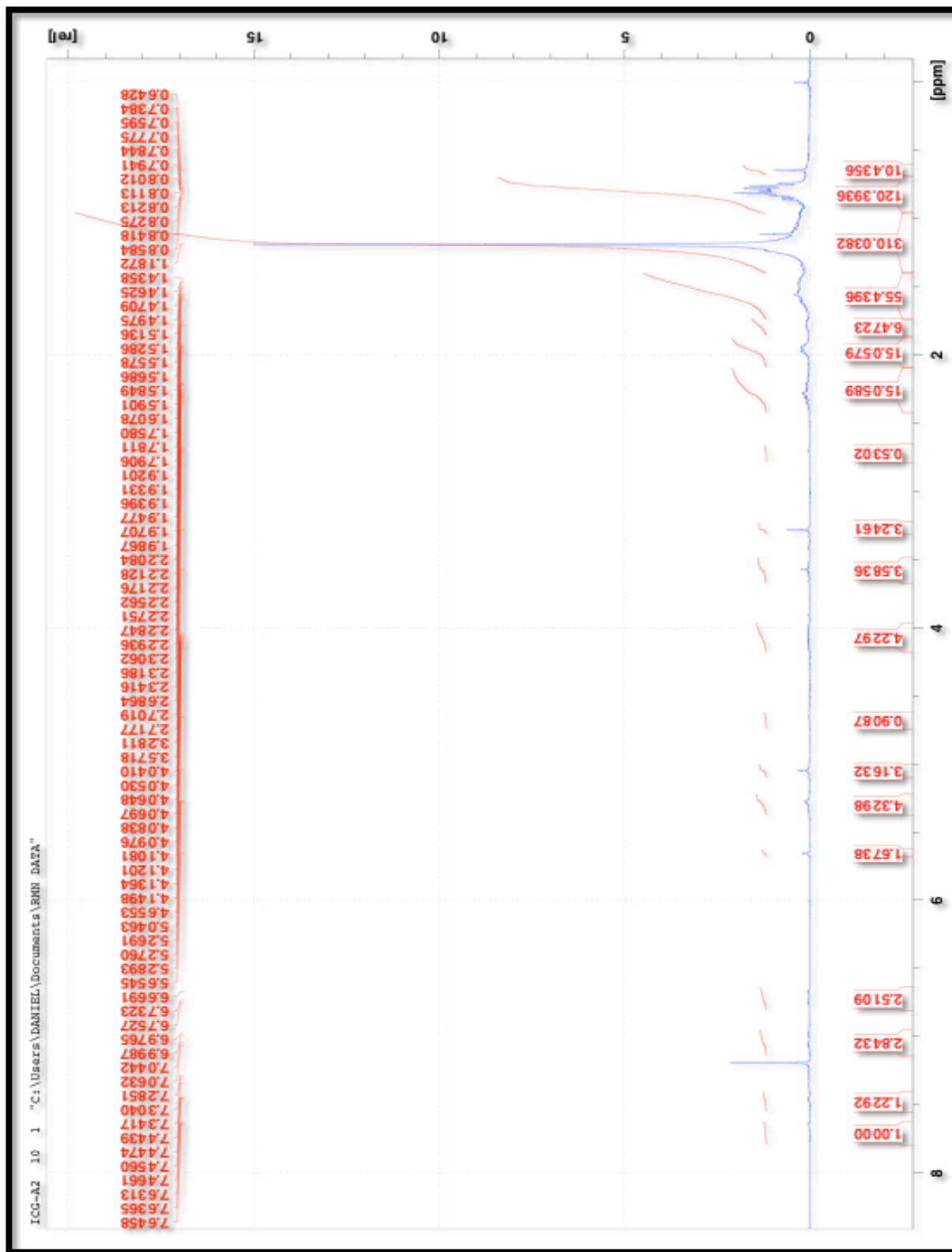
APÉNDICES

ANEXOS

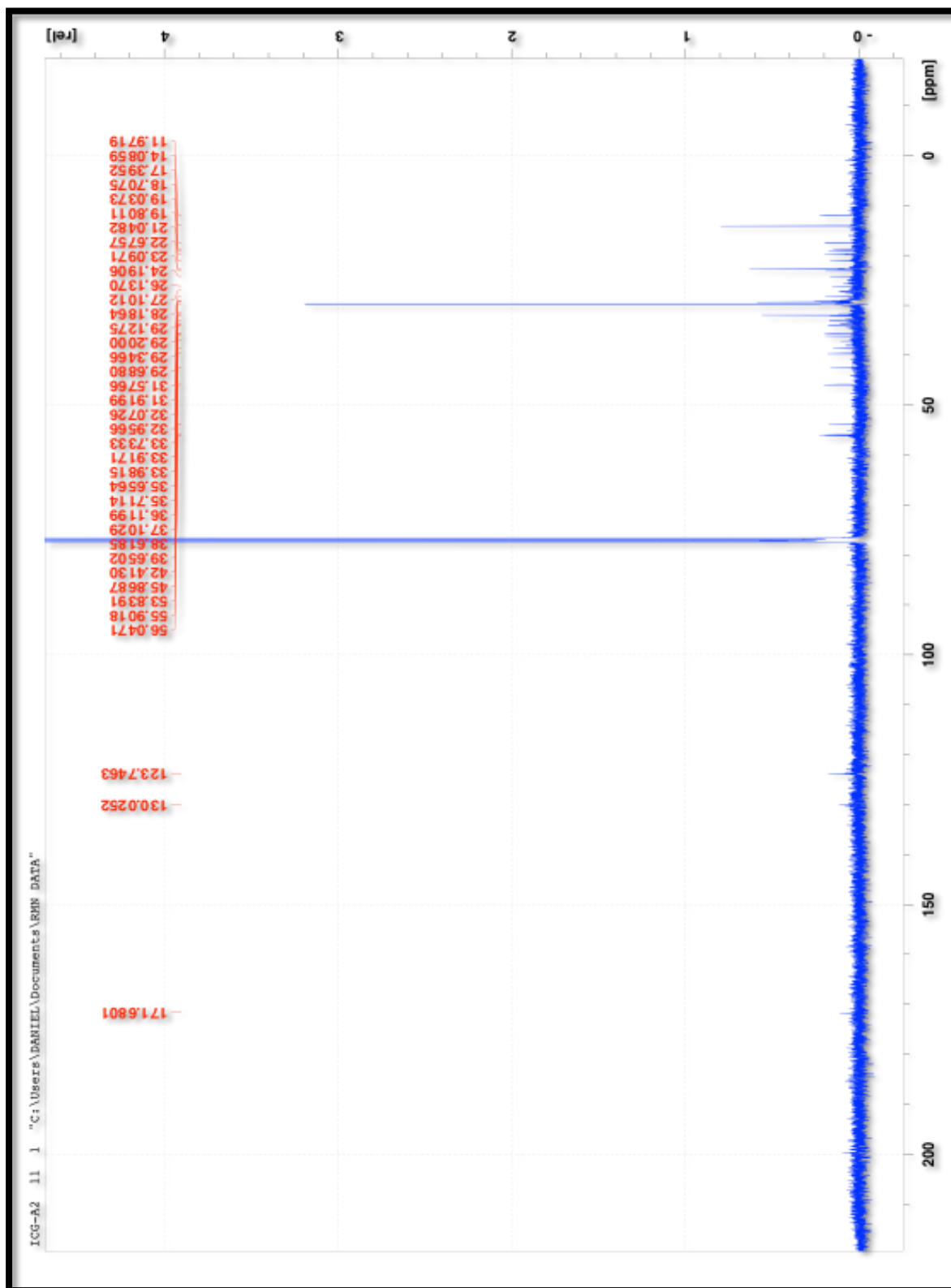
Espectro de masas



Espectro de RMN de H¹



Espectro de RMN de C¹³



TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Resonancia Magnética Nuclear

También fué utilizado un equipo BRUKER de 400 MHz utilizando CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia.

El desplazamiento químico (δ) se expresa en ppm, mientras que las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las multiplicidades de las señales obtenidas en RMN ^1H se expresan con las abreviaturas: s para singulete, d para doblete; t para triplete, c para cuarteto, dd para doble doblete y m para multiplete. En RMN ^{13}C las abreviaturas son: q para carbono primario, t para carbono secundario, d para carbono terciario y s para carbono cuaternario.

Espectroscopía de UV-Visible

Las lecturas para los experimentos citotóxicos fueron realizadas en un equipo para microplacas BioTek's PowerWade XS.

Espectrometría de masas

El análisis de las muestras se realizó en un sistema de espectrometría de masas marca Agilent Technologies con detector selectivo de masa modelo 5975C y el pico obtenidos en el cromatograma de iones, se comparó para su identificación con la biblioteca NIST 2008.

La temperatura de columna fue de 70 °C, la temperatura del inyector de 250 °C y la rampa de calentamiento de columna fue desde 70 °C hasta 100 °C a 2 °C/min, siendo posteriormente de 100 °C hasta 250 °C a 10 °C/min.

Condiciones de reacción

Los reactivos utilizados fueron comprados de distintos proveedores como Sigma-Aldrich, J.T. Baker y Fermont.

Cromatografía de capa fina (CCF)

El monitoreo de reacciones fue realizado con placas FLUKA Analytical de 0.2mm eluidas con mezclas a diferente concentración de hexano/acetato de etilo. Fueron visualizadas con lámpara de luz UV a 254nm de longitud de onda y después reveladas con *p*-anisaldehído y posterior calentamiento.

Cromatografía en preparativa

Estas se realizaron en placas de preparativa Analtech de 20 x 20 centímetros, con una fase estacionaria de Silica gel con un poro de 500µm y con fluoresceína como indicador

SOFTWARE

Se utilizó el Software ChemDraw Ultra versión 2001 para dibujar las estructuras moleculares.