

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
CAMPUS TIJUANA-OTAY  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍAS  
Laboratorio de Productos Naturales y Química Medicinal



**“ Caracterización química, capacidad antioxidante,  
evaluación antibacteriana y perfil fenólico del dátil Medjool  
(*Phoenix dactylifera* L.) cultivado en Baja California”**

Que para obtener el título de Químico Farmacobiológico  
presenta

**DENISE ARLETH ESPIRITU BRETADO**

Tijuana, B.C

Septiembre 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 047

Tijuana, Baja California, a 18 de septiembre de 2020


C. Denise Arleth Espiritu Bretado  
Pasante de Químico Farmacobiólogo  
Presente:

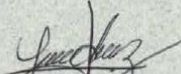
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
opción de Tesis


Es propuesto, por el Dr. Iván Córdova Guerrero y la Dra. Laura Janeth Díaz Rubio quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Caracterización química, capacidad antioxidante, evaluación antibacteriana y perfil fenólico de dátil Medjool (*Phoenix dactylifera* L.) cultivado en Baja California". el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

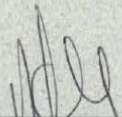
- I.- RESUMEN
- II. INTRODUCCIÓN
- III. PARTE EXPERIMENTAL
- IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V. CONCLUSIONES
- VI. REFERENCIAS
- VII. ANEXOS



  
Dr. Iván Córdova Guerrero  
Director de Tesis

  
Dra. Laura Janeth Díaz Rubio  
Co-Directora de Tesis

  
Dr. José Luis González Vázquez  
Director

  
Q. Noemi Hernández Hernández  
Subdirectora

# AGRADECIMIENTOS

### **A mis padres.**

Agradezco profundamente a mis padres por heredarme lo más valioso, que es mi educación, por ayudarme a salir adelante, por apoyarme en mis estudios, en especial, en mis estudios universitarios porque jamás se dieron por vencidos a pesar de las adversidades que se presentaron en nuestro camino, siguieron de pie y lo seguirán estando. Cada uno de mis logros son también de ellos y agradeceré que sigan presentes cada que logre una meta en mi vida.

### **Dr. Iván Córdova.**

Por haber hecho el mayor acto de confianza, abrirme las puertas en el laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, por ser alguien que logro confiar en mí y en mis capacidades, por sus palabras de aliento y entusiasmo, por inspirarme a seguir crecimiento académicamente y por ponerme tareas/retos para superarme a mí misma y que pudiera entender que soy capaz de lograr grandes cosas. Definitivamente, es un profesor que te entusiasma a seguir aprendiendo, quien muestra pasión al impartir sus clases, entre muchas cosas más, solo me queda decir...muchas gracias Dr. Iván.

### **Dra. Laura Díaz y M.C Arturo Estolano.**

Profesores muchas gracias por haber estado para mí, por ayudarme en cada una de mis dudas, por transmitirme sus conocimientos, por ser un gran ejemplo de perseverancia, paciencia y sabiduría, por ser además de mis profesores...amigos, por escucharme, aconsejarme y apoyar. Gracias.

### **Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales.**

En general, agradezco a cada uno de los integrantes del laboratorio, por las risas, por compartir estrés, por la compañía, por sus conocimientos, por su material de laboratorio y por ser también un gran ejemplo.

### **A mis amigos.**

Son la compañía más importante durante mi carrera y al concluirla, agradezco su amistad, las aventuras vividas, las experiencias buenas y malas que tuvimos, y por sus palabras de apoyo para no dejarme caer en ningún momento.

# RESUMEN

En el siguiente trabajo de tesis se muestran estudios *in vitro* de extractos de la pulpa de dátil y su semilla, recolectadas en el Valle de Mexicali, B.C, para evaluar la actividad antioxidante y el perfil de inhibición de crecimiento bacteriano. También, se realizó un *screening* fitoquímico de cada extracto, así como su cuantificación de compuestos polifenólicos y una acetilación de los extractos de pulpa para la separación de azúcares y otros componentes de alta polaridad.

En los antecedentes, se presentan una breve descripción sobre la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), planta responsable de brindar el fruto de dátil. Posterior a ella, se profundiza sobre el fruto, sus etapas de maduración, sus características más importantes, su valor nutricional, compuestos fitoquímicos ya identificados y reportados por otros autores, así como, definición y problemáticas de las actividades antioxidantes y antimicrobianas.

En la metodología expuesta en este manuscrito, se muestra la localización geográfica, generación de extractos, identificación de metabolitos secundarios, la cuantificación de compuestos polifenólicos y la identificación de azúcares mediante reacciones de derivatización del material vegetal objeto de este estudio. También se presentan estudios antioxidantes *in vitro*, tales como la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno, la reducción del radical DPPH y la reducción del catión radical ABTS+. Este desarrollo metodológico concluye con la evaluación de inhibición de crecimiento bacteriano, que se describe con la técnica de antibiograma con cepas bacterianas gram negativas y gram positivas.

Para finalizar, encontraremos el análisis de los resultados, dividido en dos secciones, el estudio fitoquímico y la evaluación química biológica. Esto nos lleva a presentar las principales conclusiones obtenidas.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS, DIAGRAMAS Y ANEXOS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>5</b>
<b>OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES</b> .....	<b>7</b>
<b>GENERALIDADES</b> .....	<b>9</b>
<b>Palmera Datilera</b> .....	<b>10</b>
<b>Fruto: Dátil</b> .....	<b>20</b>
<b>Actividad Antioxidante</b> .....	<b>28</b>
<b>Actividad Antibacteriana</b> .....	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>33</b>
<b>Recolecta del material vegetal</b> .....	<b>34</b>
<b>Generación del Extracto</b> .....	<b>36</b>
<b>Tamiz fitoquímico</b> .....	<b>38</b>
<b>Cuantificación de polifenoles por el método de Folin de Ciocalteu</b> .....	<b>47</b>
<b>Identificación de azúcares por derivatización química</b> .....	<b>49</b>
<b>Determinación del Grado de Sustitución de Grupos Acetilos</b> .....	<b>54</b>
<b>Ensayos antioxidantes: DPPH, ABTS y decoloración oxidativa del <math>\beta</math>-caroteno</b>	<b>55</b>
<b>Reducción del radical libre DPPH</b> .....	<b>55</b>
<b>Reducción del catión radical ABTS</b> .....	<b>57</b>
<b>Decoloración oxidativa de <math>\beta</math>-Caroteno</b> .....	<b>60</b>
<b>Evaluación Antimicrobiana</b> .....	<b>62</b>
<b>ANTIBIOGRAMA</b> .....	<b>62</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
<b>Screening Fitoquímico.</b> .....	<b>66</b>

<b>Identificación de azúcares por derivatización química.....</b>	<b>67</b>
<b>Determinación del grado de sustitución de grupos acetilos.....</b>	<b>74</b>
<b>Cuantificación de Polifenoles.....</b>	<b>76</b>
<b>Pruebas Antioxidantes.....</b>	<b>78</b>
<b>Reducción del radical libre DPPH.....</b>	<b>78</b>
<b>Reducción del catión radical ABTS+.....</b>	<b>79</b>
<b>Decoloración Oxidativa del <math>\beta</math>-Caroteno.....</b>	<b>80</b>
<b>Evaluación antibacteriana.....</b>	<b>82</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERENCIA.....</b>	<b>89</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>94</b>
<b>TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>101</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plantas. ....	2
<b>Figura 2.</b> Mapa de México. ....	3
<b>Figura 3.</b> Dátil. ....	4
<b>Figura 4.</b> Dibujo representativo de una palma datilera. ....	6
<b>Figura 5.</b> Palma datilera en Mexicali, BC.....	11
<b>Figura 6.</b> Ejemplo de la distribución de las distintas palmas datileras. ....	12
<b>Figura 7.</b> Estados de Baja California y Sonora en México.....	13
<b>Figura 8.</b> Biología de la palma datilera. ....	14
<b>Figura 9.</b> Inflorescencias en la palma datilera. La imagen de la izquierda, corresponde a inflorescencias femeninas listas para su polinización. La imagen de la derecha, es una inflorescencia masculina, lista para extraer su polen, a su lado se observa la espata que la contenía.....	17
<b>Figura 10.</b> Racimo de dátiles.....	18
<b>Figura 11.</b> Semilla de dátil. ....	19
<b>Figura 12.</b> Capas del fruto de dátil.....	20
<b>Figura 13.</b> Etapas de maduración del fruto de dátil, comprendiendo un periodo de 150 días. ....	22
<b>Figura 15.</b> Estructura de Luteína (izquierda) y $\beta$ -Caroteno (derecha). ....	27
<b>Figura 16.</b> Representación de un antioxidante ante un radical libre.....	29
<b>Figura 17.</b> Mecanismos de resistencia de las bacterias. ....	32
<b>Figura 18.</b> Mapa de Mexicali ....	34
<b>Figura 19.</b> Representación ilustrativa de la pulpa y semilla.....	35
<b>Figura 20.</b> Maceraciones de M1,M2 y M3. ....	37
<b>Figura 21.</b> Maceración de M4,M5 y M6. ....	37
<b>Figura 22.</b> Estructura de ácido gálico, ejemplo de un compuesto polifenólico. ....	47
<b>Figura 24.</b> CCF del extracto M3 (pulpa). Doble recorrido con la fase móvil. ....	49
<b>Figura 25.</b> CCF del extracto M3 (pulpa) revelada con OLEUM. Doble recorrido con la fase móvil. ....	49
<b>Figura 26.</b> Equipo Infrarrojo.....	50
<b>Figura 27.</b> Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas. ....	50
<b>Figura 28.</b> Condiciones para la reacción de acetilación. ....	51

<b>Figura 29.</b> Reacción DPPH. ....	55
<b>Figura 30.</b> Estructura de ABTS.....	57
<b>Figura 31.</b> Estructura de $\beta$ -Caroteno. ....	60
<b>Figura 32.</b> Ejemplo de antibiograma.....	62
<b>Figura 33.</b> Reacción de Acetilación a tiempo 0. ....	67
<b>Figura 34.</b> Reacción de Acetilación después de 12 horas.....	67
<b>Figura 35.</b> CCF de extracto M1 y su acetilación (AcO).....	68
<b>Figura 36.</b> CCF de extracto M1 y su acetilación (AcO) revelado con OLEUM. ....	68
<b>Figura 37.</b> CCF de extracto M3 y su acetilación (AcO).....	68
<b>Figura 38.</b> CCF de extracto M3 y su acetilación (AcO) revelado con OLEUM. ....	68
<b>Figura 39.</b> CCF de extracto M5 y su acetilación (AcO).....	69
<b>Figura 40.</b> CCF de extracto M5 y su acetilación (AcO) revelado con OLEUM. ....	69
<b>Figura 41.</b> Espectro de Infrarrojo. Muestras M1 (extracto crudo). ....	70
<b>Figura 42.</b> Espectro de Infrarrojo. Muestra M1 (extracto acetilado).....	71
<b>Figura 43.</b> Espectro de masas del extracto M1 acetilado. ....	72
<b>Figura 44.</b> Estructura de D-Glucosa,4-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil. ....	73
<b>Figura 45.</b> Estructura de 6-O-Acetilhexopiranosil.....	73
<b>Figura 46.</b> Estructura de 1,2,4,6-Tetra-O-acetilhexopiranosil.....	73
<b>Figura 47.</b> Estructura de D-Glucosa penta acetato. ....	73
<b>Figura 48.</b> Antibiograma con E.coli expuesta a los extractos de semillas. ....	82
<b>Figura 49.</b> Antibiograma con E.coli expuesta a los extractos de pulpa.....	82
<b>Figura 50.</b> Antibiograma S.aureus ante los extractos de pulpa. ....	83
<b>Figura 51.</b> Antibiograma S. aureus ante los extractos de semilla. ....	83
<b>Figura 52.</b> Antibiograma K. pneumoniae ante los extractos de semillas. ....	84
<b>Figura 53.</b> Antibiograma S.pyogenes ante los extractos de semillas. ....	85
<b>Figura 54.</b> Antibiograma E. faecalis ante los extractos de semillas.....	86

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de la Palma datilera. ....	10
<b>Tabla 2.</b> Orden de las raíces de la palma datilera. ....	15
<b>Tabla 3.</b> Características básicas del dátil.....	18
<b>Tabla 4.</b> Metabolitos secundarios identificados en el dátil. ....	26
<b>Tabla 5.</b> Ubicación, descripción y peso del material vegetal.....	36
<b>Tabla 6.</b> Cantidad de extracto obtenido en cada maceración. ....	36
<b>Tabla 7.</b> Método para la identificación de metabolitos secundarios. ....	38
<b>Tabla 8.</b> Manifestación de resultados positivos en la identificación de alcaloides. ....	39
<b>Tabla 9.</b> Manifestación de resultados positivos en la identificación de taninos.....	40
<b>Tabla 10.</b> .....	41
<b>Tabla 11.</b> Manifestación de resultados positivos en la identificación de flavonoides. ..	42
<b>Tabla 12.</b> Manifestación de resultados positivos en la identificación de carbohidratos. .....	43
<b>Tabla 13.</b> Manifestación de resultados positivos en la identificación de saponinas.....	44
<b>Tabla 14.</b> Manifestación de resultados positivos en la identificación de glucósidos antraquinónicos.....	45
<b>Tabla 15.</b> Manifestación de resultados positivos en la identificación de cumarinas.....	46
<b>Tabla 16.</b> Bacterias utilizadas en antibiograma. ....	63
<b>Tabla 17.</b> Identificación de metabolitos secundarios en extractos de pulpa y semilla. 66	
<b>Tabla 18.</b> Peso de los extractos acetilados.....	67
<b>Tabla 19.</b> Resultados de A% y DS.....	75
<b>Tabla 20.</b> Concentración de polifenoles presentes en cada extracto de pulpa y semilla. .....	76
<b>Tabla 21.</b> Concentración efectiva media en DPPH y ABTS, Porcentaje de Actividad Antioxidante en $\beta$ -Caroteno.....	81
<b>Tabla 22.</b> Halos de inhibición en <i>E.coli</i> . ....	82
<b>Tabla 23.</b> Halos de inhibición en <i>S.aureus</i> .....	83
<b>Tabla 24.</b> Halos de inhibición <i>K.pneumoniae</i> .....	84
<b>Tabla 25.</b> Halos de inhibición <i>S.pyogenes</i> .....	85
<b>Tabla 26.</b> Halos de inhibición <i>E. faecalis</i> .....	86

# ÍNDICE DE GRÁFICAS, DIAGRAMAS Y ANEXOS

<b>Gráfica 1.</b> Contenido de polifenoles.....	77
<b>Gráfica 2.</b> CE <sub>50</sub> pulpas DPPH. ....	78
<b>Gráfica 3.</b> CE <sub>50</sub> semillas DPPH. ....	78
<b>Gráfica 4.</b> CE <sub>50</sub> Pulpas (ABTS). ....	79
<b>Gráfica 5.</b> CE <sub>50</sub> Semillas (ABTS). ....	79
<b>Gráfica 6.</b> Porcentaje de Actividad Antioxidante de pulpas y semillas ( $\beta$ -Caroteno). ...	80
<b>Diagrama 1.</b> Clasificación del dátil de acuerdo a su contenido de azúcares invertidos. .....	22
<b>Diagrama 2.</b> Clasificación del dátil de acuerdo su contenido de azúcar.....	23
<b>Diagrama 3.</b> Clasificación de los antioxidantes. ....	28
<b>Diagrama 4.</b> Pasos ilustrativos del work up.....	52
<b>Diagrama 5.</b> Pasos ilustrativos del work up.....	53
<b>Anexo 1.</b> Infrarrojo del extracto crudo de M1.....	95
<b>Anexo 2.</b> Infrarrojo del extracto acetilado de M1. ....	95
<b>Anexo 3.</b> Cromatograma de Gases y Espectro de Masas del extracto acetilado M1...	96
<b>Anexo 4.</b> Ejemplo espectro de masas de extracto acetilado M1 a tiempo 5.87 min. ....	96
<b>Anexo 5.</b> Infrarrojo del extracto crudo de M3.....	97
<b>Anexo 6.</b> Infrarrojo del extracto acetilado de M3. ....	97
<b>Anexo 7.</b> Cromatograma de Gases y Espectro de Masas del extracto acetilado M3 ...	98
<b>Anexo 8.</b> Ejemplo espectro de masas de extracto acetilado M3 a tiempo 5.60 m/z ....	98
<b>Anexo 9.</b> Infrarrojo del extracto crudo de M5.....	99
<b>Anexo 10.</b> Infrarrojo del extracto acetilado de M5. ....	99
<b>Anexo 11.</b> Cromatografo de Masas del extracto acetilado M5. ....	100
<b>Anexo 12.</b> Ejemplo espectro de masas de extracto acetilado M5 a tiempo 6.56 m/z.	100

# ABREVIATURAS

<b>ABTS</b>	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
<b>AcO</b>	Acetoxi
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración Efectiva Media
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>A%</b>	Porcentaje de Acetilos
<b>DS</b>	Grado de Sustitución
<b>g</b>	Gramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>M</b>	Molaridad
<b>N</b>	Normalidad
<b>μl</b>	Microlitros
<b>mg</b>	Miligramos
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>AA%</b>	Actividad Antioxidante
<b>R</b>	Resistente
<b>S</b>	Sensible
<b>I</b>	Intermedio

# INTRODUCCIÓN

La medicina natural y tradicional forman parte del acervo cultural de la humanidad, y se han desarrollado en muchos países con características propias, en franca tendencia a los recursos disponibles en ellos, sobre la base, además, de la idiosincrasia de sus habitantes; por lo tanto, es el resultado de una evolución lenta, pero avalada por la experiencia práctica.

Por otro lado, la medicina herbolaria que también se conoce como medicina botánica, fitoterapia o fitomedicina, es la forma más antigua de atención médica que se ha conocido en la humanidad. La acción que ejerce la planta se debe a la presencia de una determinada sustancia química que se encuentra en sus estructuras, por lo que tiene un impacto directo sobre la actividad fisiológica (Pérez Campos, 2014)

De acuerdo a lo anterior, se le atribuye “*plantas medicinales*”, a todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos principios activos, los cuales, al ser administrados en dosis suficiente tienen la capacidad de producir efectos curativos en las enfermedades del hombre y de los animales en general.



Figura 1. Plantas.

Imagen tomada de Maitén y Catalina Guerrico (2019).

Se tiene calculado que de las 260,000 especies de plantas que se conocen actualmente, solo el 10% se pueden considerar como medicinales. Por lo tanto, el estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos (Cosme,2008).

Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples, tales como, alcaloides, o bien mezclas complejas, por ejemplo, resinas, aceites esenciales, etc. Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos (es un azúcar más un compuesto sin azúcar). Otros componentes activos de las plantas son los lípidos, taninos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas, entre otros (Cosme, 2008)

La biodiversidad se refiere a las variadas formas de vida que se pueden desarrollar en un país, como son las plantas, animales y microorganismos, y el material genético que los forman. México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética debido a su topografía y variaciones climáticas.

México está catalogado como un país mega diverso por su amplia biodiversidad y esto lo ubica en el cuarto lugar a nivel mundial. Su historia, topografía y variaciones climáticas generan una riqueza biológica, un alto número de especies de plantas y animales, ecosistemas y variabilidad genética. También está catalogado como el lugar de origen a nivel mundial de numerosas plantas cultivadas (Valdes Cobos, 2013).



**Figura 2.** Mapa de México.

Tomado de IACIP, *Mapa Interactivo Institutos de Transparencia en México*. Recuperado: [iacip-gto.org.mx/wn/mapa-interactivo-institutos-de-](http://iacip-gto.org.mx/wn/mapa-interactivo-institutos-de-)

Se ha logrado identificar y registrar 4,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total mundial); entre 3,500 a 4,000 son empleadas por la población mexicana; 3,600 se recolectan de forma silvestre; 1,500 son utilizadas regularmente sin procesar; 370 se cultivan en el huerto familiar o de manera comercial (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010).

El atributo medicinal de cada planta se debe a los principios activos que se pueden encontrar en toda la planta o en alguna de sus estructuras (P. Koleff, 2005). Gracias a los principios activos es que surge la identificación de compuestos fenólicos, donde hoy en día, existe un gran interés en el estudio de estos metabolitos secundarios, debido a sus propiedades antioxidantes, además de sus posibles aplicaciones benéficas para la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio. Además, los compuestos fenólicos que son esenciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas, también tienen acción como antibióticos (Sierra et al., 2018).

Por lo que se emplea la búsqueda de más moléculas de origen natural que proporcionen una actividad farmacológica y que además se pueda emplear en la dieta diaria, tal es el caso del fruto dátil que se cosecha de *Phoenix dactylifera* L., el cual es un alimento básico de Medio Oriente y muy popular en países islámicos debido a su valor nutricional y los beneficios que genera hacia la salud, así como a su alto perfil de nutrientes como son, la fibra, carbohidratos, minerales y vitaminas (Ali, 2012).

Gracias a su gran variedad de nutrientes, se le atribuye al dátil un papel medicinal y ha sido recomendado en remedios populares para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades del corazón. También ha sido identificado con propiedades antioxidantes y antimutagénico. Se han registrado, estudios recientes donde demuestran que los dátiles y sus extractos acuosos han demostrado la eliminación de radicales libres, inhibiendo los daños macromoleculares mediados por radicales libres (Ali, 2012).



**Figura 3.** Dátil.

Imagen tomada de Abdelouahhab Zaid (2002).

# HIPÓTESIS

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que las dietas ricas en componentes antioxidantes proporcionan un papel protector en el cuerpo y promueven la salud (Benmeddour et al., 2013)

Basándonos en lo anterior, el dátil que se cultiva en México presenta propiedades antioxidantes y antibacteriana en respuesta al entorno geográfico, climático y a la alta composición de metabolitos polifenólicos.



**Figura 4.** Dibujo representativo de una palmera datilera.

Imagen tomada de Freepik (2019), *Palmera datilera*.  
Recuperado: [freepik.es/vector-gratis/palmera-datilera\\_4042153.htm](https://www.freepik.es/vector-gratis/palmera-datilera_4042153.htm)

# **OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES**

### **Objetivo General**

Determinar la composición polifenólica, el perfil antioxidante y antimicrobiano del dátil cultivado en la zona noroeste de México.

### **Objetivos Particulares**

El material vegetal en estudio es la pulpa y semilla de dátil de la variedad de Medjool. A continuación, se plantean los siguientes objetivos:

1. Obtener extractos de pulpa y semilla a partir de una maceración metanólica.
2. Identificar cualitativamente algunos metabolitos secundarios presentes en pulpa y semilla.
3. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de pulpa y semilla, mediante las técnicas de DPPH, ABTS, y de la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno.
4. Llevar a cabo una cuantificación de compuestos polifenólicos con la técnica de Folin-Ciocalteu.
5. Determinar los carbohidratos presentes en los extractos de pulpa mediante derivatización química.
6. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de semilla de dátil.

# GENERALIDADES

## Palmera Datilera

### Nombre Científico

El nombre botánico de la palma datilera, *Phoenix dactylifera* L., se deriva presumiblemente de un nombre fenicio "phoenix", que significa palma datilera, y "dactylifera" derivado de una palabra griega "daktulos" que significa un dedo, que ilustra la forma de la fruta.

### Familia, Genero y Especie

Pertenece a las Angiospermas-Monocotiledóneas, *Palmaceae* es una familia de aproximadamente 200 géneros y 1,500 especies (Dowson, 1982). *Phoenix* (Coryphoideae Phoeniceae) es uno de los géneros que contiene una docena de especies, todas nativas de las regiones tropicales o subtropicales de África o el sur de Asia, incluida la *Phoenix dactylifera* L... La palma datilera se encuentra clasificada de la siguiente manera (ver tabla 1):

**Tabla 1.**  
*Clasificación de la Palma datilera.*

Grupo	Spadiciflora
Orden	Palmea
Familia	Palmaceae
Subfamilia	Coryphyiodea
Tribu	Phoeniceae
Género	Fénix
Especies	<i>Dactylifera</i> L.

Tomada de: Abdelouahhab Zaid (2002). Land preparation, planting operation and fertilization requirements. In A. Zaid (Ed.), Date palm cultivation (UNOPS-Da, p. 1).

Existe un registro de doce especies del género “Phoenix”, a continuación, se enlistan las especies y se menciona su distribución:

- a) *Phoenix dactylifera* L. con una distribución en Países mediterráneos, África y parte de Asia; Introducido en América y Australia.
- b) *P. atlantica* A. Chev. con una distribución en África Occidental y las islas Canarias.
- c) *P. canariensis chabeaud.* con una distribución en Islas Canarias y Cabo Verde
- d) *P. reclinata* Jacq. con una distribución en África tropical (Senegal y Uganda) y Yemen (Asia).
- e) *P. sylvestris* Roxb. con una distribución en India y Pakistan.
- f) *P. humilis royle.* con una distribución en India, Birmania y China.
- g) *P. hanceana* Naudin. con una distribución en China Meridional y Tailandia.
- h) *P. robelinic* O'Brein. con una distribución en Sri Lanka, Toukin, Annam, Laos y Tailandia.
- i) *P. farinifera* Roxb. con una distribución en India, Ceilán y Annam.
- j) *P. rupicola* T. Anders. con una distribución en India.
- k) *P. acaulis* Roxb. con una distribución en Bengaladesh y la India.
- l) *P. paludosa* Roxb. con una distribución en Bengaladesh, Tenasherim, Andaman, Nikobaren y Tailandia (Abdelouahhab Zaid, 2002).



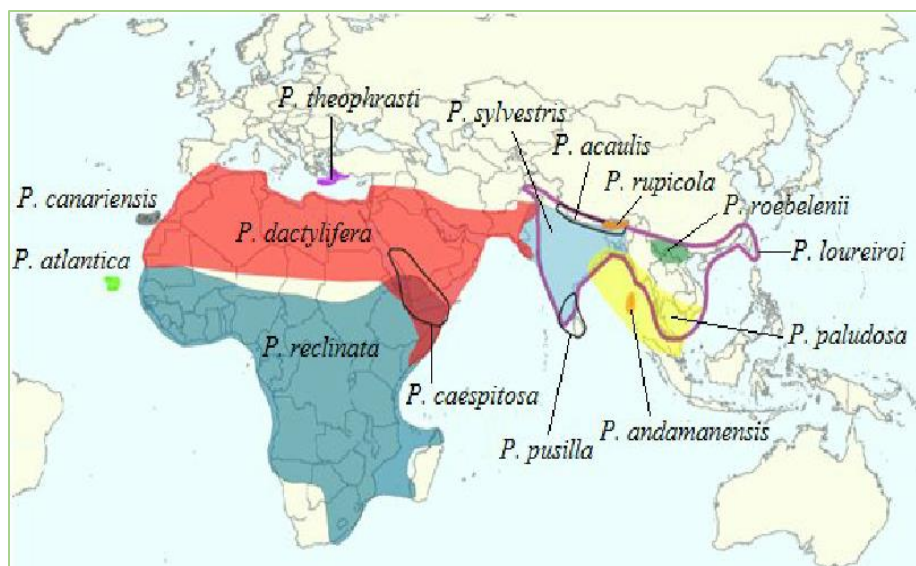
Figura 5. Palma datilera en Mexicali, BC.

La mayoría de las 12 especies de *Phoenix* son bien conocidas como ornamentales, la más apreciada es *P. canariensis Chabeaud*, comúnmente llamada la palma canaria. *P. sylvestris* Roxb. es ampliamente utilizada en la India como fuente de azúcar y la *P. dactylifera* L., es cultivada por su valioso fruto (Abdelouahhab Zaid, 2002).

## Historia de la Palma Datilera

La palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) durante mucho tiempo ha sido uno de los cultivos frutales más importantes en las regiones áridas de la Península Arábiga, el norte de África y el Medio Oriente. El dátil es uno de los frutos más antiguos que se conocen y se ha cultivado en África del Norte y Medio Oriente durante al menos 5000 años (Zohary y Hopf, 2000). Además, en los últimos cinco siglos, los dátiles también se introdujeron en nuevas áreas de producción en Australia, India, Pakistán, México, África meridional, América del Sur, suroeste de los Estados Unidos y sur de España.

Debido a la larga historia de la cultura del dátil y la amplia distribución e intercambio de cultivares de dátil, no se ha logrado identificar el origen exacto, pero lo más probable es que se originó en la antigua zona de Mesopotamia (sur de Irak) o en el oeste de la India. Con la expansión del Islam, el cultivo de la palma datilera se propagó al norte de África, sur de Asia y Europa, llegando a América por medio de la conquista española (Abdelouahhab Zaid, 2002).



**Figura 6.** Ejemplo de la distribución de las distintas palmas datileras.

Imagen tomada de Muriel Gros-Balthazard (2013).

## Cultivo de la Palma Datilera: en México

El cultivo de la palma datilera, fue introducido a México durante el periodo Virreinal Español. Los misioneros jesuitas introdujeron por primera vez cultivos agrícolas en la Península de Baja California de México, durante su reinado eclesiástico desde 1697 a 1768 (De Grenade, 2013).

En México, la mayor producción de este fruto se encuentra en los Municipios de San Luis Río Colorado, Altar y Caborca, en Sonora; Mexicali, en Baja California; Comundú, Mulegé y La Paz, en Baja California Sur y Viesca en el Estado de Coahuila (Salomón Torres, Ortiz Uribe y Villa Angulo, 2017).



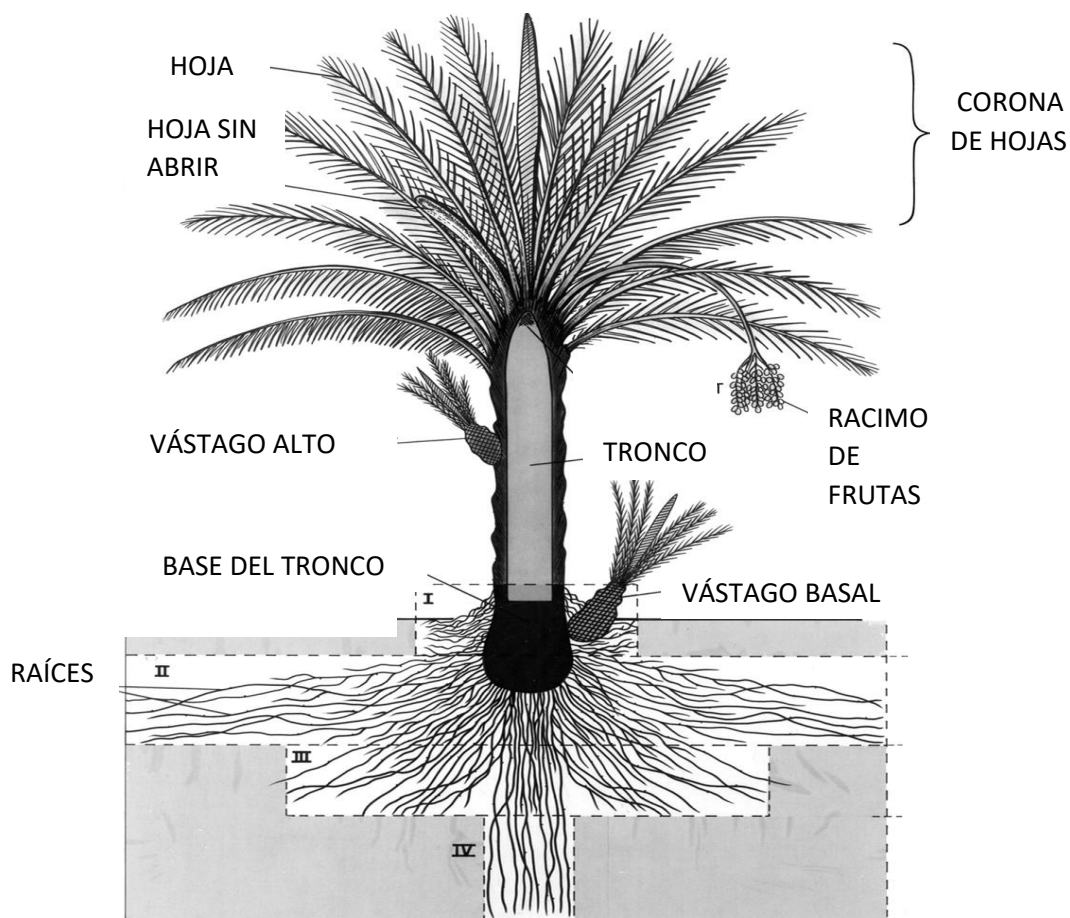
**Figura 7.** Estados de Baja California y Sonora en México.

En México, el dátil se ha convertido en un cultivo de alta prioridad. Salomon Torres, 2017, menciona que en el 2015 se cosecharon 7,400 toneladas de dátil, siendo con esto el segundo mayor productor de América, después de Estados Unidos. Por otro lado, entre los países productores de dátil, existe una gran diversidad de cultivares y el número conocido de variedades es de casi 5,000. En México, la mayor área sembrada de dátil es el cultivar Medjool, ubicándose en las zonas productoras de los valles de San Luis Río Colorado y Mexicali en los Estados de Sonora y Baja California respectivamente, logrando entre ambas ciudades 97% de la producción datilera total en México (Salomon-Torres et al., 2017).

## Biología de la Palma Datilera

La palma datilera es una planta diploide, perenne y monocotiledónea (Chao y Krueger,2007). Las palmas de Phoenix son dioicas y se caracterizan por hojas pinnadas y en hojas duplicadas con puntas agudas.

Además de la palma datilera, las otras dos palmeras de Phoenix más valoradas son la palmera canaria (*Phoenix canariensis*) y la palma azucarera (*Phoenix sylvestris*). La palma datilera se puede distinguir de las otras dos especies por la producción de vástagos y las hojas glaucas apagadas en lugar de hojabrillantes. Al ser una planta dioica, nos indica que existen dos géneros. Las palmas machos, cuentan con flores estaminadas (masculinas), mientras que las palmas hembra con flores pistiladas (femeninas).



**Figura 8.** Biología de la palma datilera.

Imagen tomada de Abdelouahhab Zaid (2002).

## Descripción Botánica

### ▫ Raíz

Tiene un sistema de raíz fasciculado, las raíces primarias tienen una longitud promedio de 4 m y pueden extenderse a 10 m en suelos ligeros. Las raíces primarias dan lugar a raíces secundarias que se ramifican aún más para formar raíces terciarias que son más cortas en longitud y diámetro. Las raíces primarias se originan a partir de semillas, pero también pueden continuar creciendo si la palma datilera crece de una rama o una plántula cultivada en tejido (ver tabla 2) (Manickavasagan, Mohamed y Sukumar, 2012).

**Tabla 2.**

*Orden de las raíces de la palma datilera.*

Orden de las Raíces	Origen	Formar	Longitud Media (m)	Diámetro medio (mm)
<b>Primario</b>	Base del Tronco	Cilindro	4 (hasta 10)	7-12.5
<b>Secundario</b>	Raíces Primarias	Similar a las raíces primarias	0.20-0.25	3.5
<b>Terciario</b>	Raíces Secundarias	Similar a las raíces secundarias pero delgadas	0.02-0.1	0.3-1.5

Tomada de: Abdelouahhab Zaid (2002). Land preparation, planting operation and fertilization requirements. In A. Zaid (Ed.), Date palm cultivation (UNOPS-Da, p. 1).

### ▫ Tronco

El tronco de la palma datilera es vertical, cilíndrico y columnar, con una misma circunferencia hacia arriba, logrando desarrollar más de 20 m de altura. Es de color marrón, lignificado y sin ramificación. Su circunferencia media es de aproximadamente 1 a 1,10 m.

El tronco se compone de haces vasculares fibrosas y duras que se cementan juntos en una matriz de tejido celular, la cual está muy lignificada cerca de la parte externa del tronco ( Abdelouahhab Zaid, 2002).

### ▫ **Hojas**

Las hojas de palma, llamadas frondas, son pinnadas, hojas compuestas en espiral alrededor del tronco. La hoja completamente madura tiene 4 m de largo, pero varía de 3 a 6 m, y tiene 0,5 m de ancho en la nervadura central media que se estrecha hacia los extremos de ambas hojas. La hoja de la palma datilera se divide en tres regiones: el pecíolo, la región espinal que hace la transición a la región de la cuchilla que es sostenida por un nervio central de forma geométrica y las hojas angulares se distribuyen en la región de la cuchilla.

Una palma datilera adulta tiene aproximadamente 100 a 125 hojas verdes con una formación anual de 10 a 26 hojas nuevas. El valor funcional de la hoja de la palma disminuye con la edad y no hay dos hojas de la misma edad. Además, las hojas que tienen cuatro años de edad son solo un 65% más eficientes en la fotosíntesis por unidad de área, en comparación con las hojas de un año. En buenas condiciones culturales, una hoja puede soportar la producción de 1 a 1.5 kg de dátiles (Abdelouahhab Zaid, 2002)

### ▫ **Órganos Sexuales**

Las flores unisexuales son de carácter pistilado (femenino) y estaminado (masculino); nacen en un gran racimo (inflorescencia) llamado espádice o espiga, que consiste en un tallo central llamado raquis y muchas hebras (para las hembras) o espiguillas (en el caso de los machos). Comúnmente una inflorescencia contiene más de 100 hebras en cada racimo, para una palma adulta.

La inflorescencia, también llamada grupo de flores, en sus primeras etapas está encerrada en una cubierta / vaina dura conocida como espata, la cual se rompe cuando las flores maduran, exponiendo toda la inflorescencia con fines de polinización, para el caso de las palmas hembras. La espata evita que las delicadas flores se marchiten por el intenso calor hasta que estén maduras y listas para realizar su función.



**Figura 9.** Inflorescencias en la palma datilera. La imagen de la izquierda, corresponde a inflorescencias femeninas listas para su polinización. La imagen de la derecha, es una inflorescencia masculina, lista para extraer su polen, a su lado se observa la espata que la contenía.

Imagen brindada por Ricardo Salomon.

La inflorescencia masculina está abarrotada al final del raquis, mientras que las ramas de la inflorescencia del racimo femenino están menos densamente pobladas al final del raquis. La flor femenina tiene un diámetro de aproximadamente 3 a 4 mm y tiene estambres rudimentarios y tres carpelos estrechamente apretados, donde el ovario es superior (hipogínico). Solo se fertiliza un óvulo por flor, lo que lleva al desarrollo de un carpelo que a su vez da una fruta llamada dátil.

## ▫ Fruta

La fruta datilera es una baya única, oblonga, terete, de una semilla, con un estigma terminal, un pericarpio carnoso y un endocarpio membranoso (entre la semilla y la carne).

Dependiendo de la variedad, las condiciones ambientales y el cuidado técnico (fertilización, polinización, adelgazamiento, etc), las características de la fruta varían enormemente. En la tabla 3 se resume las características generales del dátil.

**Tabla 3.** Características básicas del dátil.

Carác. de la fruta	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Color
Rango de variación	18-110	8-32	Gran variación (amarillo-negro)

Tomada de: Abdelouahhab Zaid (2002). Land preparation, planting operation and fertilization requirements. In A. Zaid (Ed.), Date palm cultivation (UNOPS-Da, p. 1).

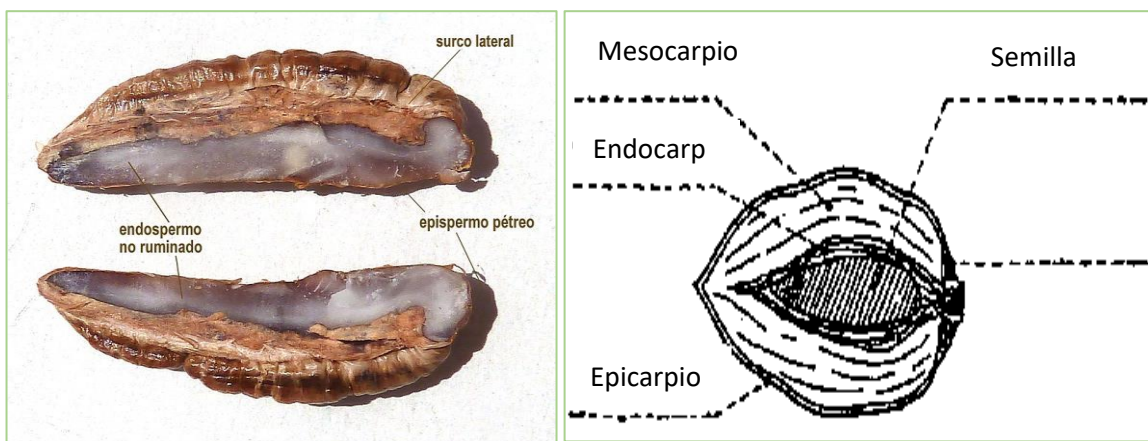


**Figura 10.** Racimo de dátiles. potencial máximo a partir de 10-15 años.

Imagen tomada de: Dátiles, propiedades y beneficios. Copyright, Naturvegan Ecológico S.L. 2012-2020

## ▫ Semilla

Al igual que con el fruto, las características de las semillas varían según la variedad, la fuente de polen y las condiciones de crecimiento. El peso de una semilla puede variar desde menos de 0.5 g hasta aproximadamente 4 g, con una longitud de aproximadamente 12 a 36 mm y una anchura de 6 a 13 mm. La semilla suele ser oblonga, con surcos ventrales, con un pequeño embrión y un endospermo duro, además, la semilla del dátil constituye entre el 6 y el 18% del peso total de un dátil maduro (Salomón-Torres et al., 2020).



**Figura 11.** Semilla de dátil.

Imagen tomada de Abdelouahhab Zaid (2002).

## Condiciones Climáticas

Los factores climáticos que influyen en el crecimiento del dátil, esencialmente son las altas temperaturas, clima seco, escasas lluvia y la baja humedad. Los dátiles pueden crecer en climas muy cálidos y secos, y son relativamente tolerantes con los suelos salados y alcalinos. Las palmas datileras requieren un verano largo e intensamente caluroso con poca lluvia y muy poca humedad durante el período desde la polinización hasta la cosecha, pero con abundante agua subterránea cerca de la superficie o el riego. Las palmas datileras pueden crecer desde una temperatura promedio de 12.7 a 27.5 ° C, resistir hasta 50 ° C y mantener cortos períodos de heladas a temperaturas tan bajas como -5 ° C. La temperatura ideal para el crecimiento de la palma datilera, durante el

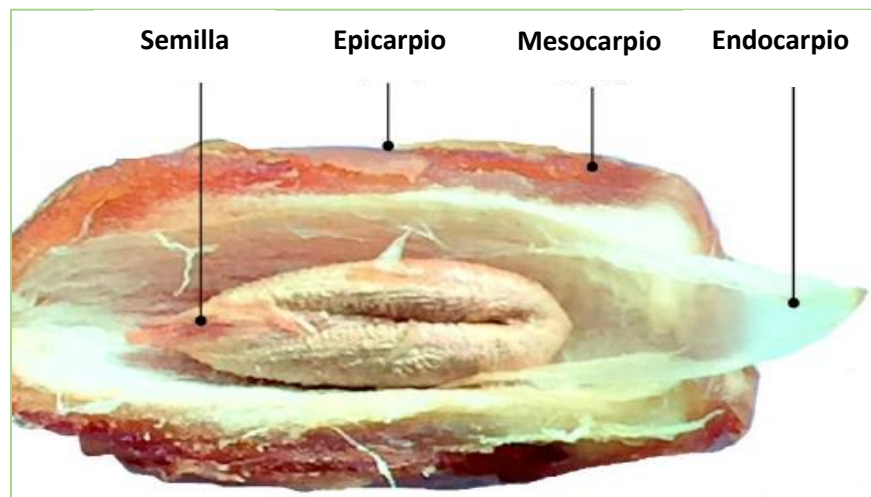
período desde la polinización hasta la maduración de la fruta, varía entre 21 y 27 °C de temperatura promedio (Chao y Krueger, 2007).

### Fruto: Dátil

#### Descripción

El dátil se compone de un pericarpio, mesocarpio, endocarpio y una semilla (también llamado grano, hueso o pireno). El mesocarpio, que representa la mayor parte de la pulpa del fruto, consiste en células parenquimatosas agrandadas y se divide en mesocarpio externo y mesocarpio interno intermedio por 3–10 capas de células taninas.

La semilla tiene un lado ventral caracterizado por un surco de profundidad y anchura variable a lo largo de su longitud. El lado dorsal de la semilla es convexo con un pequeño orificio poco profundo llamado el micropilo bajo el cual se encuentra el embrión. Las semillas de diferentes variedades de dátil difieren en la profundidad del surco y la posición del micropilo (central o periférico).

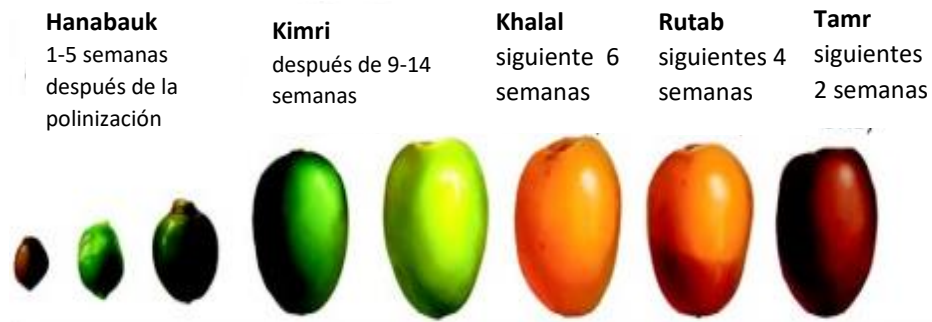


**Figura 12.** Capas del fruto de dátil.

Imagen tomada de Al-Shwyeh, H. (2019).

El dátil se desarrolla en cinco etapas diferentes, conocidas por sus nombres en árabe: **Hanabauk, Kimri, Khalal ( o Bisir ), Rutab y Tamar**. Dependiendo de la variedad, el dátil se vuelve comestible en las últimas tres etapas como resultado de la disminución de la amargura, el aumento de la dulzura y la mejora de la sensibilidad. Las diferentes variedades de frutos de dátiles se pueden recolectar de manera variable en las etapas **Khalal, Rutab y / o Tamar**, y el mejor momento de la cosecha depende de la variedad.

- En la etapa **Kimri**, el contenido de humedad de la fruta es bastante alto (85%). Esta etapa es en que el dátil aumenta de tamaño, peso y contenido de azúcar durante esta etapa. Su color verde comienza a volverse amarillo o rojo al final de esta etapa, dependiendo de la variedad del dátil.
- En la etapa **Khalal**, los dátiles son de color rojo, rosa o amarillo con textura dura. El contenido de humedad del dátil disminuye gradualmente y la sacarosa comienza a convertirse a los azúcares reductores (glucosa y fructosa). El aumento de peso del dátil es lento en esta etapa, y empieza a perder la astringencia.
- En la etapa **Rutab**, la punta del dátil comienza a tornarse marrón cuando inicia esta etapa. Por otro lado, empiezan a pierden su peso debido a la disminución de humedad, por lo que el contenido de humedad de la fruta en esta etapa es del 35%. El ablandamiento del tejido y el oscurecimiento de la piel también se producen en esta etapa (Nasir et al., 2015).
- En la etapa de **Tamar**, los dátiles varían en tamaño, forma, color, textura y sabor según la variedad y las condiciones agroclimáticas. La forma de los dátiles en **Tamar** varía de ovalada a cilíndrica con dimensiones de 3 a 11 cm de largo y 2 a 3 cm de diámetro y color de amarillo, marrón, rojo a negro, variando según el tipo de cultivar (Ghnimi et al., 2017).

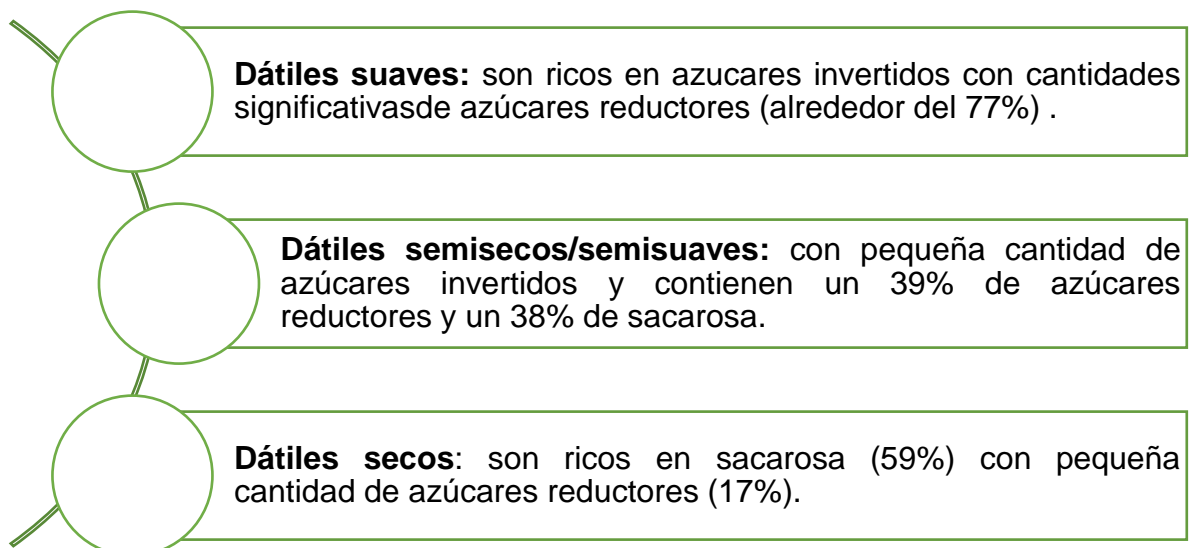


**Figura 13.** Etapas de maduración del fruto de dátil, comprendiendo un periodo de 150 días.

Imagen tomada de Al-Shwyeh, H. (2019).

Para los fines del consumo, las frutas de dátiles se utilizan en diferentes etapas de maduración, incluidas Khalal o **Besser** (iniciando su proceso de maduración, con un 50% de humedad), **Rutab** (casi maduro con 30% a 35% de humedad) y **Tamar** (totalmente maduro con un 10% a 30% de humedad) (Al-Shwyeh, 2019).

Los dátiles se clasifican en función de su contenido de azúcares invertidos (glucosa y fructosa); Se llevó a la clasificación de dátiles con (ver diagrama 1): (Nasir et al., 2015).



**Diagrama 1.** Clasificación del dátil de acuerdo a su contenido de azúcares invertidos.

Diagrama elaborado con el texto tomado de: Nasir (2015). *A review on the nutritional content, functional properties and medicinal potential of dates*. Openaccess 3(1).

También existe otra clasificación que consta en su contenido de azúcar (ver diagrama 2) (Nasir et al., 2015).

Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rico en sacarosa <b>40-65%</b>.</li> <li>• Contienen <b>20-40%</b> de glucosa y fructosa y <b>10-25%</b> de agua.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ricos en glucosa y fructosa <b>40-75%</b>.</li> <li>• Tiene cantidades menores de sacarosa <b>10-35%</b>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compuestos por <b>10-35%</b> de agua, <b>65-90%</b> de glucosa y fructosa y <b>0-10%</b> de sacarosa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto contenido de agua <b>35-75%</b>.</li> <li>• Contienen <b>35-37%</b> de glucosa y fructosa, y <b>0%</b> de sacarosa.</li> </ul>

**Diagrama 2.** Clasificación del dátil de acuerdo su contenido de azúcar.

Diagrama elaborado con el texto tomado de: Nasir (2015). *A review on the nutritional content, functional properties and medicinal potential of dates*. Openaccess 3(1).

### Valor Nutricional del Dátil

El dátil es una excelente fuente de energía, debido a su alto contenido de azúcares fácilmente digeribles como la glucosa y la fructuosa. Además de proporcionar energía, ayuda a combatir el estrés y estimula la pérdida de peso (Salomon-Torres et al., 2017).

#### ▫ **FIBRA**

El contenido de fibra dietética total en dátiles varía entre 6.5 y 11.5% según la variedad. Los tipos de fibra dietética insolubles y solubles representan de 84 a 94% y de 6 a 16%, respectivamente, al total de fibra dietética en el fruto del dátil. Las fibras dietéticas solubles contribuyen a la formación de un gel viscoso en el intestino que retarda la absorción intestinal de factores antinutricionales como el colesterol. Las fibras insolubles, por otro lado, proporcionan volumen y ayudan a la fermentación y la generación de ácidos grasos de cadena corta en el intestino.

Las semillas de dátiles representan alrededor del 10-15% del peso de la fruta según la variedad. Los carbohidratos de la semilla del dátil son principalmente de los tipos de fibra insoluble.

▫ **AZÚCARES**

Los carbohidratos son el componente más abundante en los dátiles y están presentes como azúcares reductores en forma de glucosa, fructuosa, manosa y maltosa, y como azúcares no reductores; principalmente en sacarosa y en pequeñas cantidades de polisacáridos tales como celulosa y almidón.

▫ **MINERALES**

Salomon en el 2017, menciona que el potasio es el mayor elemento mineral contenido en el dátil, seguido por el calcio, magnesio, fosforo, y en proporciones más pequeñas hierro, zinc, sodio, cobre y manganeso.

El alto contenido de potasio combinado con baja cantidades de sodio puede prevenir o controlar la hipertensión, así como las enfermedades cardiovasculares y renales.

▫ **VITAMINAS**

En comparación con otras frutas secas, el dátil puede considerarse una fuente razonable de vitaminas. El dátil fresco contiene concentraciones más altas de vitaminas en comparación con el dátil seco, ya que las vitaminas se pierden en el proceso de secado. El dátil seco puede considerarse como una fuente moderada de vitamina riboflavina, piridoxina, niacina y ácido fólico. La tiamina, el ácido ascórbico (vitamina C) y la vitamina A están presentes en concentraciones relativamente bajas en las fechas secas (Ali, 2012).

▫ **AMINOÁCIDOS**

Se han encontrado 17 aminoácidos en dátiles, estas investigaciones están hechas en diferentes variedades y estado de madurez. Las investigaciones encontraron patrones similares en el contenido de aminoácidos entre las variedades estudiadas. Los aminoácidos predominantes en los dátiles inmaduros son: glutámico, aspártico, lisina, leucina y glicina, mientras que en los dátiles en etapas maduras los aminoácidos que se encuentran en mayor concentración son: glutámico, aspártico, prolina y leucina.

Los aminoácidos esenciales están en una mayor concentración en los dátiles secos, esto debido principalmente a la reducción de agua, la cual se va reduciendo a través de las etapas de maduración. La variación entre los resultados reportados puede ser contribuida a las diferencias entre las variedades, estado de madurez y el origen de los dátiles, así como la variación entre los procedimientos analíticos (Ali, 2012).

### **Composición Química del Dátil**

El dátil es una fuente rica de metabolitos secundarios, entre ellos, los compuestos fenólicos, hidroxicinamatos, derivados del ácido gálico, ácidos monohidroxibenzoicos, flavonas y antocianinas. El dátil también es rico en carotenoides y provitaminas, sus principales pigmentos carotenoides son la luteína y el  $\beta$ -caroteno (Jain y Sciences, n.d.)

Los componentes más importantes de los dátiles son los carbohidratos en azúcares particulares, que pueden constituir hasta el 78% y proporcionar una fuente de energía fácilmente disponible para el cuerpo humano. Los azúcares son responsables del sabor dulce de los alimentos. El dátil contiene casi la mitad de la cantidad de azúcares en forma de fructosa, que es dos veces más dulce que la glucosa y puede provocar una sensación de saciedad.

Por otro lado, la pulpa y la semilla de dátil contienen una amplia gama de ácidos grasos saturados e insaturados. Los ácidos grasos con clasificación saturados incluyen los ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, margarico, araquídico, heneicosanoico, behénico y tricosanoico. Los ácidos grasos insaturados incluyen los ácidos palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico.

De manera más específica, el dátil contienen varios tipos de fitoquímicos, como los carotenoides (*betacaroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, neoxantina, etc.*), compuestos fenólicos, principalmente los ácidos cinámicos y sus derivados (*ferúlico, sinápico, siringico, vanílico, gálico, cafeico, protocatechuico, ácidos cumáricos y sus derivados como ácidos dactilferílicos, etc.*), flavonoides glucósidos (*luteolina, metil luteolina, quercetina y metil quercetina*) flavonas, flavonoles (*catequina, epicatequina, flavoxantina, antocianinas, etc.*). La concentración de estos fitoquímicos, sin embargo, disminuye con la etapa avanzada de madurez de la fruta. Los taninos en el dátil están

hechos principalmente de polifenoles y, en menor medida, de flavonas. Estos son responsables del color oscuro del dátil en el período posterior a la cosecha. Como ya se describió en las etapas de maduración, el sabor astringente de la fruta de dátil durante las primeras etapas de madurez está estrechamente asociado con su nivel de taninos que disminuye con la maduración de la fruta y casi desaparece en la etapa **Rutab**.

De manera ejemplificada en la tabla 4 se mencionan por algunos metabolitos secundarios ya identificados según a su clase correspondiente.

**Tabla 4.**

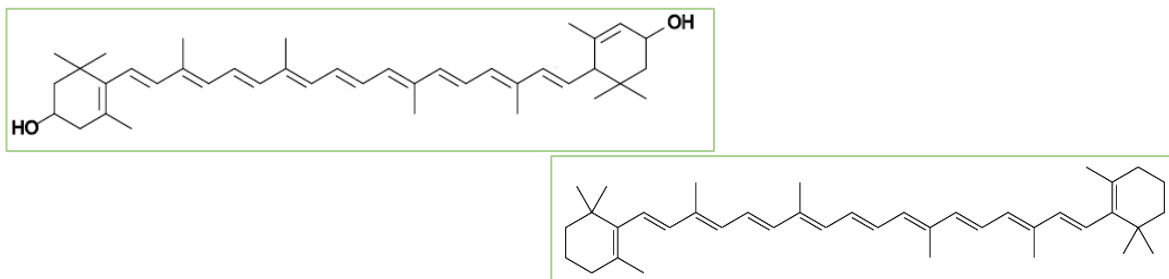
*Metabolitos secundarios identificados en el dátil.*

Clase	Compuestos
<b>Ácido benzoico y derivados</b>	Ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido sinápico
<b>Ácido cinámico y derivados.</b>	Ácido cafeico, ácido hidrocafeic, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido jeringico, ácido dactiliférico
<b>Glucósidos y ésteres de flavonoides</b>	Luteolina, quercetina, apigenina y, sulfato de quercetina ramnosil-hexoside, quercetina 3- O -rutinoside (rutina), sulfato de quercetina hexoside, quercetina acetil-hexoside, isoramnetina-3- O -rutinoside, isoramnetina hexoside, crisoeriol ramnosil-hexoside, isoramnetina acetilo -hexósido, quercetina 3- O -glucósido (isoquercitrina)
<b>Flavan-3-ols</b>	(+) - catequina, y (-) - epicatequina
<b>Proantocianidinas</b>	Oligómeros de procianidina basados en (-) - epicatequina, que incluyen procianidina B1, procianidina B2, procianidina trímero, procianidina tetramer, procianidina.
<b>Antocianinas</b>	Cianidina (en algunas variedades oscuras)

Texto tomado de Al-Shwyeh, H. (2019). *Date palm (Phoenix dactylifera L.) fruit as potential antioxidant and antimicrobial agents*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 11(1), 1

▫ **Carotenoides.**

El dátil puede considerarse una fuente moderada de carotenoides en comparación con otras frutas secas. Sin embargo, el nivel de carotenoides en la fruta de dátil puede variar según la variedad, la etapa de maduración, el secado y las condiciones posteriores a la cosecha. Los principales carotenoides que se encuentran en las fechas son luteína,  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y neoxantina (Ali, 2012).



**Figura 14.** Estructura de Luteína (izquierda) y  $\beta$ -Caroteno (derecha).

▫ **Compuestos polifenólicos.**

Comparativamente ante otras frutas, el dátil es considerado una buena fuente de compuestos fenólicos. Se han logrado detectar un total de nueve ácidos fenólicos libres y unidos, de los cuales cinco consistieron en derivados hidroxilados de ácido benzoico (*ácido gálico*, *ácido protocatecuico [PCA]*, *ácido p-hidroxibenzoico*, *ácido vanílico* y *ácido sirínico*) y cuatro fueron derivados de ácido cinámico. (*ácido cafeico*, *ácido p-coumarico*, *ácido ferúlico* y *ácido o-cumarico*).

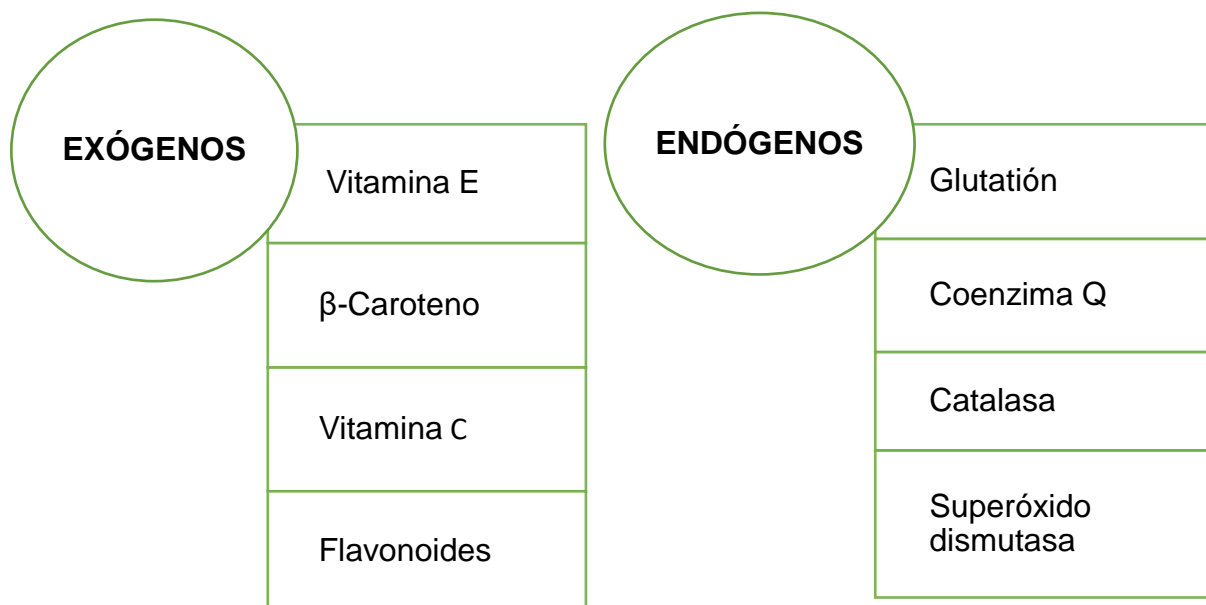
Los ácidos fenólicos predominantes fueron ácido protocatecuico (PCA), ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p-cumarico y ácido o-cumarico. En general, se ha registrado que los ácidos fenólicos totales de los dátiles secados al sol eran significativamente más altos que los de los dátiles frescos (Ali, 2012).

### Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de “antioxidante terminador de cadena” (Londoño, 2012).

Específicamente una sustancia antioxidante es aquella que presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al reaccionar con un radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos ( Dabrowska y Mir, 2009).

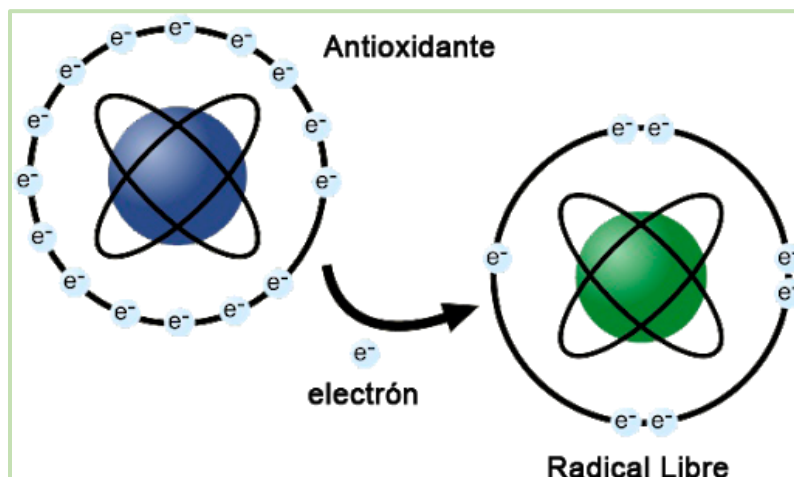
Existen dos vías fundamentales para proteger al organismo de los radicales libres; enzimáticos y no enzimáticos (endógenos y exógenos) y su interacción puede ser intracelular o extracelular. La vía endógena requiere apoyo externo y por ello se recomiendan los antioxidantes exógenos cuyo papel es relevante dado que son los que pueden formar parte de la dieta diaria, como los indicados en un apartado posterior. (ver diagrama 3)



**Diagrama 3.** Clasificaci6n de los antioxidantes.

Diagrama elaborado con el texto tomado de Coronado et al., (2015). *Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana*. Chil Nutr 42(2).

Ahora bien, un radical libre es aquella figura química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena, además por la vida media que es de microsegundos ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial (Coronado y Radilla , 2015).



**Figura 15.** Representación de un antioxidante ante un radical libre.

Imagen tomada de Desiree Kröper (2014).

Su configuración espacial les hace muy inestable, extraordinariamente reactivos, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un gran daño en ellas y en las membranas celulares. Los radicales libres cumplen numerosas funciones útiles en el organismo, el propio organismo fabrica radicales libres en cantidades moderadas para luchar, por ejemplo, contra las infecciones, pero en cantidades excesivas tienen el potencial de dañar nuestras células y el material genético allí contenido.

La mitocondria constituye la fuente principal de radicales libres, principal productor de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Como se sabe el 90% del total del oxígeno inhalado se consume en la mitocondria y alrededor del 2% del oxígeno reducido, se transforma en el radical superóxido ( $O_2\cdot$ ). Por otros mecanismos el superóxido se transforma en el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), que es aún más reactivo que el anterior.

Otro radical libre fisiológico es el óxido nítrico( $\text{NO}\cdot$ ), que se produce en el endotelio vascular como factor relajante. Este puede transformarse en peróxido nítrico( $\text{ONOO}$ ) que contribuye en gran medida a lesiones de tipo oxidativo en múltiples enfermedades (Hernández et al., 2008).

Ejemplos de otras fuentes antioxidantes son los peroxisomas, y también los leucocitos polimorfonucleares que constituyen una fuente importante, cuando en los procesos inflamatorios se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (Dabrowska y Mir, 2009).

Ahora bien, cuando la capacidad de control de las sustancias oxidantes es superada, se establece una situación conocida como estrés oxidante. El estrés oxidante es una condición que se manifiesta en el organismo cuando la producción de sustancias altamente reactivas supera los mecanismos antioxidantes; esta situación es responsable de la aparición de las enfermedades (Vallejo-Zamudio et al., 2017).

Se cree que los antioxidantes naturales presentes en el dátil son útiles para activar el sistema antioxidante enzimático y no enzimático. La principal actividad antioxidante del dátil se debe a los compuestos fenólicos, por lo que, sus efectos biológicos se pueden clasificar en dos grupos principales:

- 1) Prevención de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas del daño oxidativo al actuar como un eliminador de radicales libres.**
- 2) Capacidad para modular la fisiología celular mediante fisiología o bioquímica.**

Por lo tanto, los antioxidantes dietéticos en el dátil ayudan a proteger al cuerpo de diversos trastornos degenerativos como enfermedades neurológicas, cardiovasculares y úlceras gástricas al minimizar el estrés oxidativo.

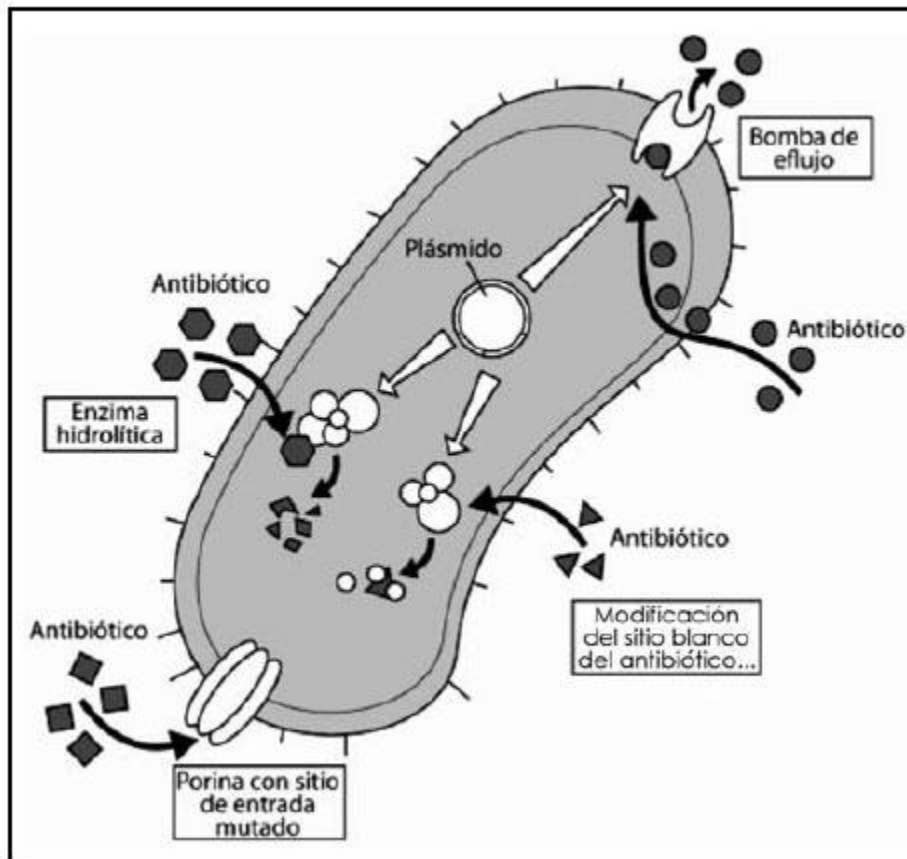
### Actividad Antibacteriana

El uso de compuestos orgánicos (extracto de algunas plantas) para el tratamiento de enfermedades infecciosas se conoce desde la antigüedad. Aproximadamente el 20% de las plantas que se encuentran en el mundo han sido sometidas a pruebas farmacológicas o biológicas, y un número sustancial de antibióticos nuevos introducidos en el mercado se obtienen de recursos naturales o semisintéticos. Se utiliza una amplia gama de partes de plantas medicinales como extracto para medicamentos crudos y poseen propiedades medicinales variadas.

Sin embargo, la resistencia que presentan las bacterias contra los antibióticos se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. El desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos, su uso indiscriminado e irracional y la presión evolutiva ejercida por el uso terapéutico ha favorecido el incremento de cepas resistentes. La resistencia bacteriana tiene una base genética intrínseca y una adquirida. A continuación, se describirá de manera breve los tipos de resistencia bacteriana que se presentan (Luz, 2013)

- 1) Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química:** es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo esta función. Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las beta-lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico.
- 2) Alteración del sitio blanco del antibiótico:** consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras.
- 3) Alteración en las barreras de permeabilidad:** este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad.

- 4) **Bombas de eflujo:** en la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos (Luz, 2013).



**Figura 16.** Mecanismos de resistencia de las bacterias.

Imagen tomada de Claudia Moreno (2009).

La resistencia hacia los antibióticos va en crecimiento y se muestra como una gran problemática, por lo que, surge nuevas alternativas naturales o sintéticas para el desarrollo de nuevos antibióticos.

# METODOLOGÍA

### Recolecta del material vegetal

El dátil de la variedad Medjool fue recolectado en plantaciones orgánicas localizadas en el Valle de Mexicali y La Laguna salada, en el municipio de Mexicali, B.C.



**Figura 17.** Mapa de Mexicali

Imagen tomada de Delegaciones de Mexicali, (2010). Divulgación de las historias regionales de Baja California Recuperado: <https://sites.google.com/site/dhirebajacfa/home/municipios/mexicali/delegaciones-municipales>

### Variación del fruto

El nombre de la variación sujeta al estudio es Medjool, utilizando la pulpa y semilla. Se utilizó tres pulpas con diferente ubicación de recolección y tres semillas con su respectiva ubicación de acuerdo a la pulpa.

Se le etiquetó de la siguiente forma, durante todo el proyecto se manejaron las etiquetas para mayor facilidad de identificación.



**Figura 18.** Representación ilustrativa de la pulpa y semilla.

Imagen tomada de Abdelouahhab Zaid (2002).

## Generación del Extracto

El dátil fue separado en pulpa y semilla, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente fue triturado. Para éste estudio, fueron generados 6 extractos mediante maceración metanólica (ver tabla 5).

**Tabla 5.**

*Ubicación, descripción y peso del material vegetal.*

<b>Etiqueta</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Descripción</b>	<b>Peso del Material Vegetal</b>
<b>M1</b>	Laguna Salada	Pulpa	125.2 g
<b>M2</b>	Laguna Salada	Semilla	8.416 g
<b>M3</b>	Valle de Mexicali	Pulpa	96.7 g
<b>M4</b>	Valle de Mexicali	Semilla	17.533 g
<b>M5</b>		Pulpa sin raleo	72.40 g
<b>M6</b>		Semilla sin raleo	9.865 g

Para la obtención de los extractos secos, el material vegetal se filtró y el sobrenadante fue concentrado a presión reducida, obteniendo los siguientes pesos: (ver tabla 6)

**Tabla 6.**

*Cantidad de extracto obtenido en cada maceración.*

<b>Extracto</b>	<b>Peso final</b>
<b>M1</b>	79.847 g
<b>M2</b>	5.763 g
<b>M3</b>	62.948 g
<b>M4</b>	6.429 g
<b>M5</b>	43.736 g
<b>M6</b>	5.664 g



Figura 19. Maceraciones de M1, M2 y M3.

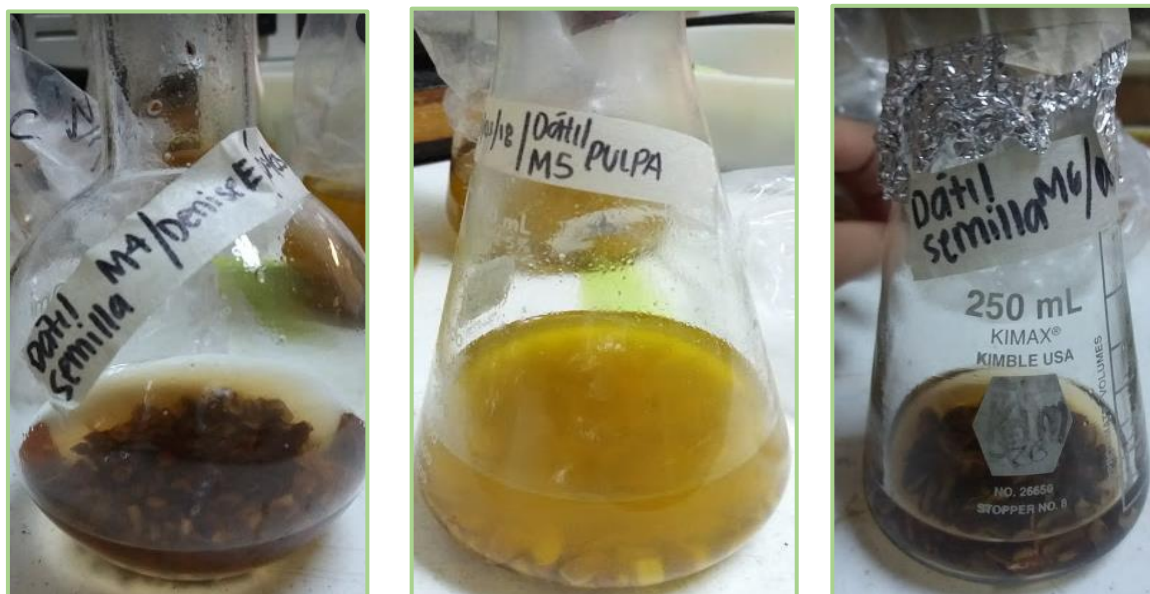


Figura 20. Maceración de M4, M5 y M6.

## Tamiz fitoquímico

La identificación de metabolitos secundarios en las muestras de dátil se realizó mediante diferentes pruebas cualitativas, las cuales, a través de manifestaciones físicas como coloración, presencia de espuma, precipitación, etc., indican la presencia de metabolitos mayoritarios. Para la realización de cada prueba, primeramente, se preparó una solución metanólica a una concentración de 1 mg/ mL. En la tabla 7 se ejemplifica los métodos a utilizar y los procedimientos para cada ensayo se describen a continuación:

**Tabla 7.**

*Método para la identificación de metabolitos secundarios.*

<b>Metabolito Secundario</b>	<b>Método</b>
<b>Alcaloides</b>	Mayer
	Wagner
	Dragendorff
<b>Taninos</b>	FeCl <sub>3</sub>
	Gelatina
<b>Saponinas</b>	Espuma
<b>Esteroides y Triterpenos</b>	Lieberman-Burchard
<b>Glucósidos Antraquinónicos</b>	Borntrager
<b>Cumarinas</b>	Erlich
<b>Carbohidratos</b>	Benedict
<b>Flavonoides</b>	Shinoda

## A. ALCALOIDES

En su entorno nativo por lo general los alcaloides se encuentran en forma de sales de ácidos orgánicos simples (*ej: ácido láctico*), o en ocasiones ácidos poco usuales (*ej: ácido quínico*). Los alcaloides son capaces de precipitar en presencia de algunos reactivos, como: Yoduro de Potasio y Mercurio (reactivo de Mayer), Yoduro de Potasio y Bismuto (reactivo de Dragendorff), una solución de Yodo con Yoduro de Potasio (reactivo de Wagner) (Gennaro,2003).

### - Procedimiento:

Se preparó una solución de la muestra a evaluar a una concentración de 1mg/mL en HCL al 5%, esta solución se calentó durante 5 minutos, y finalmente se adicionaron 2 gotas de cada reactivo específico. Se utilizó sulfato de quinina como control positivo, ver tabla 8 para interpretar resultados positivos.

**Tabla 8.**

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de alcaloides.*

	Reactivos		
	Mayer (+)	Dragendorff (+)	Wagner (+)
<b>Resultado Positivo</b>	Precipitado color crema	Precipitado café-rojo	Precipitado café-rojo

## B. TANINOS

Una de las propiedades más importantes de los taninos es su capacidad de unión a proteínas, favoreciendo su precipitación. Por otro lado, gracias a los grupos hidroxilo de sus núcleos fenólicos, los taninos también pueden formar quelatos con cationes metálicos, eliminando parcialmente, cantidades representativas de hierro y cobre disueltos. Este comportamiento es más evidente cuando se trata de taninos hidrolizables, que forman complejos (Álvarez, 2007).

### - Procedimiento:

Se tomó 1 mL de la solución metanólica preparada inicialmente, finalmente se adicionaron 8 gotas del reactivo  $\text{FeCl}_3$  y para la prueba de gelatina 15 gotas. Se utilizó ácido gálico como control positivo, ver tabla 9 para interpretar resultados positivos.

**Tabla 9.**

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de taninos.*

	Reactivos	
	Cloruro Férrico (+)	Gelatina (+)
<b>Resultados positivos</b>	Coloración verde, azul o negra	Precipitado blanco

### C. ESTEROIDES Y TRITERPENOIDES

Este grupo de metabolitos secundarios está constituido por numerosos compuestos estructuralmente muy similares, derivados mayormente del epoxiescualeno y, en menor número del propio escualeno. La reacción *Liebermann – Burchard* es utilizada para la determinación de colesterol, lo que da un color verde intenso. El color es debido al grupo hidroxilo (-OH) del colesterol que reacciona con los reactivos, lo que genera un aumento en la conjugación de la insaturación del anillo adyacente (Viracacha y Mora, 2018).

#### - Procedimiento:

Se tomó 1 mL de la solución metanólica preparada inicialmente, se agregó 1 mL de anhídrido acético y, finalmente 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se utilizó colesterol como control positivo, ver tabla 10 para interpretar resultados positivos.

**Tabla 10.**

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de esteroides y triterpenoides.*

Reactivo	
Anhídrido Acético/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (+)	
<b>Resultado Positivo</b>	Coloración azul-verde y violeta

## D. FLAVONOIDES

Los flavonoides pueden ser detectados mediante la reacción de Shinoda, la cual permite distinguir entre los diferentes esqueletos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavonona, etc,. En esta reacción, el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos hidrógeno molecular, que es eliminado en forma de gas, y cloruro de magnesio, el cual forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características (Rodríguez et al., 2012).

### - Procedimiento:

Se tomó 1 ml de la solución metanólica preparada inicialmente, se agregaron 3 gotas de HCl concentrado y se dejó reposar para una realizar una primera observación. Enseguida se adicionaron limaduras de magnesio y nuevamente se mantuvo en reposo para un análisis de cambios en la coloración. Se utilizó un extracto de cítricos como control positivo, ver tabla 11 para interpretar resultados positivos.

**Tabla 11.**

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de flavonoides.*

	Reactivos	
	HCl concentrado (+)	Limaduras de Mg metálico (+)
<b>Resultados Positivos</b>	Auronas o Chalconas: Coloración roja	Flavonas: Coloración naranja Flavonoles: Coloración roja Flavononas: Coloración magenta

## E. CARBOHIDRATOS

La prueba de Benedict plantea la reacción de identificación de azúcares reductores. Se fundamenta en que el ion cúprico proveniente del sulfato cúprico, es capaz de reducirse (en medio básico) por efecto del aldehído del azúcar a su forma de  $\text{Cu}^+$ . Este nuevo ion se observa como un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso (Huertas-Navarro, 2016).

### - Procedimiento:

Se tomó 1 mL de la solución metanólica preparada inicialmente, se añadieron 8 gotas de reactivo de Benedict y se calentó en baño maría durante 5-10 minutos. Se utilizó fructosa como control positivo, ver tabla 12 para interpretar resultados positivos.

### Tabla 12.

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de carbohidratos.*

Reactivo	
Benedict (+)	
<b>Resultado Positivo</b>	Precipitado café-rojo

## F. SAPONINAS

Las saponinas se clasificaron antiguamente como algunos de los glucósidos vegetales que forman una espuma jabonosa cuando se mezclan y se agitan con agua, por lo que se han utilizado de forma rutinaria como detergentes, espumantes y emulsificantes (Hernández-Guzmán y Hermosilla-Carazo, 2014).

### - Procedimiento:

Se preparó 1 mL de una solución acuosa de la muestra a evaluar a una concentración de 1mg/ mL, finalmente se agitó vigorosamente para observar la formación de espuma. Se utilizó un extracto de *Quillaja saponaria* como control positivo, ver tabla 13 para interpretar resultados positivos.

**Tabla 13.**

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de saponinas.*

	Reactivo
	Agua (+)
<b>Resultado positivo</b>	Espuma estable por lo menos 15 minutos

## G. GLUCÓSIDOS ANTRAQUINÓNICOS

Las antraquinonas generan color rojo en medio acuoso alcalino debido al estado de resonancia de los –OH fenólicos, se requiere que el núcleo antraquinona esté libre. En el caso de los glicósidos, previo a la reacción, es necesario llevar a cabo una hidrólisis y la posterior extracción de las agliconas en medio orgánico (Flores, 2011).

### - Procedimiento:

Se tomó 1 mL de la solución metanólica preparada inicialmente, se agregó 1 mL de HCl al 5%, seguido de 1 mL de cloroformo y, finalmente, 4 gotas de NH<sub>4</sub>OH al 10%. Se utilizó ácido carmínico como control positivo, ver tabla 14 para interpretar resultados positivos.

### Tabla 14.

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de glucósidos antraquinónicos*

Reactivos	
HCl/Cloroformo/NH <sub>4</sub> OH (+)	
<b>Resultado Positivo</b>	Anillo rosa-rojo en la superficie de la fase acuosa

## H. CUMARINAS

La prueba de Erlich genera una lactonización del ácido cis-*o*-hidroxicinámico o ácido cumarínico, determinándose la presencia de grupo furano para ello, la muestra se disuelve en etanol y se agrega una solución de *p*-dimetilaminobenzaldehído, en etanol formándose una coloración naranja (Ochoa y Sarmiento, 2018).

### - Procedimiento:

Se tomó 1 mL de la solución metanólica preparada inicialmente y calentar en baño maría, posteriormente se adicionan 2 gotas de reactivo de Erlich y finalmente, 1 gota de HCl concentrado. Para esta prueba no se utilizó ningún control positivo, ver tabla 15 para interpretar resultados positivos.

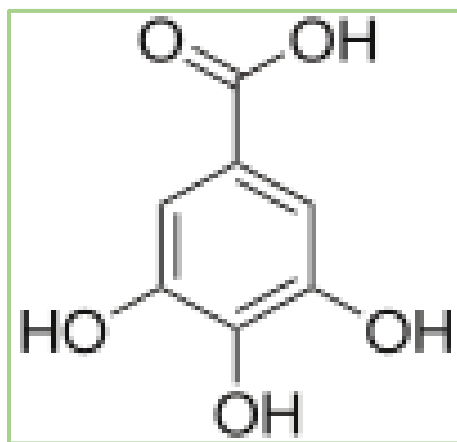
### Tabla 15.

*Manifestación de resultados positivos en la identificación de cumarinas.*

Reactivos	
Erlich/HCl (+)	
<b>Resultados Positivos</b>	Coloración naranja

### Cuantificación de polifenoles por el método de Folin de Ciocalteu.

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos denominados polifenoles, se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario. Algunos polifenoles son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, mientras que otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Quiñones et al., 2012).



**Figura 21.** Estructura de ácido gálico, ejemplo de un compuesto polifenólico.

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. El reactivo de Folin contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm (García et al., 2010).

**Metodología:**

Se preparó una solución de cada extracto a evaluar a una concentración de 1mg/mL, cada ensayo fue realizado por triplicado. Para cada experimento se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se adicionaron 3 mL de agua destilada, seguido de 0.1 mL de solución del extracto vegetal a evaluar, posteriormente se agregaron 0.5 mL de reactivo de folin y se mantuvo en reposo durante 3 minutos. Finalmente se adicionaron 2 mL de carbonato de sodio al 20%.

Se mantuvo en reposo 1 hora en condiciones ambientales de luz y temperatura. Terminada la hora, se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm, utilizando como blanco agua destilada.

Se promediaron las absorbancias y se determinó el contenido de polifenoles totales mediante la ecuación de la recta proveniente de la curva de calibración con ácido gálico. Los resultados son expresados en mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de extracto seco (mg EAG/ 100 g ES).

$$y = 0.1346x - 0.1279$$

$$r^2 = 0.99678$$

### Identificación de azúcares por derivatización química

La reacción de acetilación es una transformación comúnmente utilizada en síntesis orgánica tanto para obtener derivados de ácidos carboxílicos, como para proteger hidroxilos en reacciones de varios pasos. Las reacciones de acetilación suelen llevarse a cabo en presencia de piridina como catalizador a pesar de la toxicidad de la misma. La baja nucleofilicidad de los grupos hidroxilo en los carbohidratos conduce a la necesidad de activación de los agentes acilantes mediante la adición de derivados de piridina como co-catalizadores para acelerar la reacción, tal como 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Chikhale et al., 2017).

Para esto se utilizaron tres extractos de pulpa (M1, M3 y M5), antes de iniciar la reacción de acetilación se llevó a cabo la separación cromatográfica de cada uno de los extractos para identificar los posibles carbohidratos (azúcares) de alta polaridad. Para la correcta separación de los metabolitos del extracto, se probaron múltiples mezclas eluyentes, donde se encontró una mezcla terciaria, **butanol (4): ácido acético (1.5): agua (4.5)**, capaz de permitir una correcta separación, por lo tanto, se utilizó como fase móvil.



**Figura 22.** CCF del extracto M3 (pulpa). Doble recorrido con la fase móvil.



**Figura 23.** CCF del extracto M3 (pulpa) revelada con OLEUM. Doble recorrido con la fase móvil.

Además, se sometieron los extractos antes de la reacción de acetilación a un análisis en el equipo de Cromatografía de Gases-Espectrómetro de Masas y en el equipo de Infrarrojo, esto con el objetivo de tener una comparación del extracto crudo y el extracto acetilado, para una debida confirmación de la reacción.



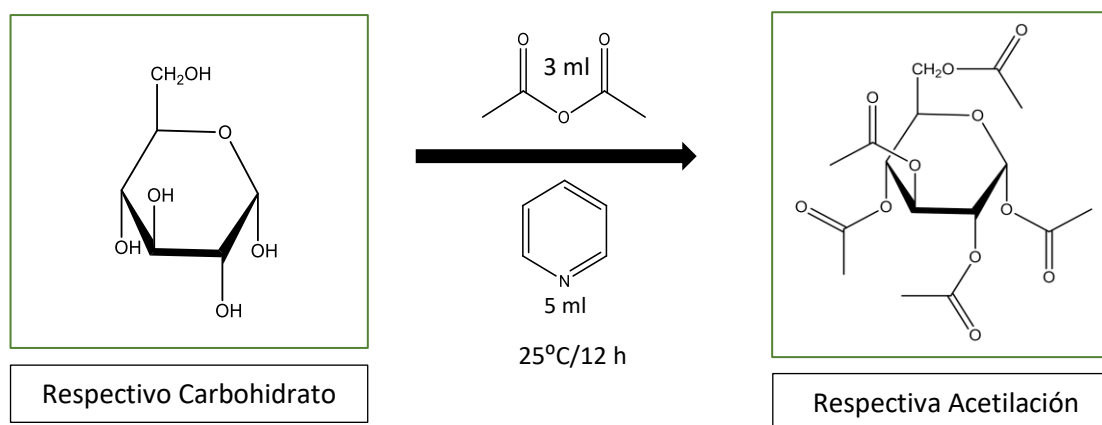
**Figura 24.** Equipo Infrarrojo.



**Figura 25.** Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas.

Imágenes tomadas de Innovatek (s.f.). Espectrómetro FT-IR Nicolet™ iS™5.  
Recuperado: <https://www.innovatek.com.co/espectrometro-ft-ir-nicolet-is5->

Una vez finalizado lo anterior, se inició con la reacción de acetilación, se siguió la metodología reportada por *Zachary D. Herde y colaboradores* (Herde et al., 2017) , la cual consiste en las siguientes condiciones:



**Figura 26.** Condiciones para la reacción de acetilación.

Se siguen los siguientes pasos para montar la reacción:

- 1.- En un matraz bola, se pesó 1g del extracto (M1, M3, M5).
- 2.- Se ambientó en un baño maría a 25°C, colocar el matraz y mantenerlo en agitación dentro de la campa de extracción.
- 3.- Se agregaron 3 ml de anhídrido acético.
- 4.- Se adicionaron 5 ml de piridina y tapar el matraz
- 5.- Se mantuvo la reacción por 12 horas.

Una vez concluidas las 12 horas de reacción se procedió al "work up" de acuerdo al siguiente procedimiento.

- 1.- Se inactivó la reacción agregando agua destilada al matraz bola.
- 2.- Se transfirió la mezcla de reacción obtenida a un embudo de separación.
- 3.- Se realizaron tres lavados con dicloro-metano, recolectando la fase orgánica.
- 4.- Usando la fase orgánica, se realizó otra serie de lavados.
- 5.- Se lavó tres veces con HCl 1M.
- 6.- Después, la fase orgánica recolectada se lavó con sulfato de Cu 10% cuatro veces.
- 7.- Finalmente, la fase orgánica recolectada se lavó con agua saturada con sal, dos veces.
- 8.- Se recolectó la fase orgánica final, y se agregó sal anhidra para eliminar cualquier remanente de agua y se filtró.

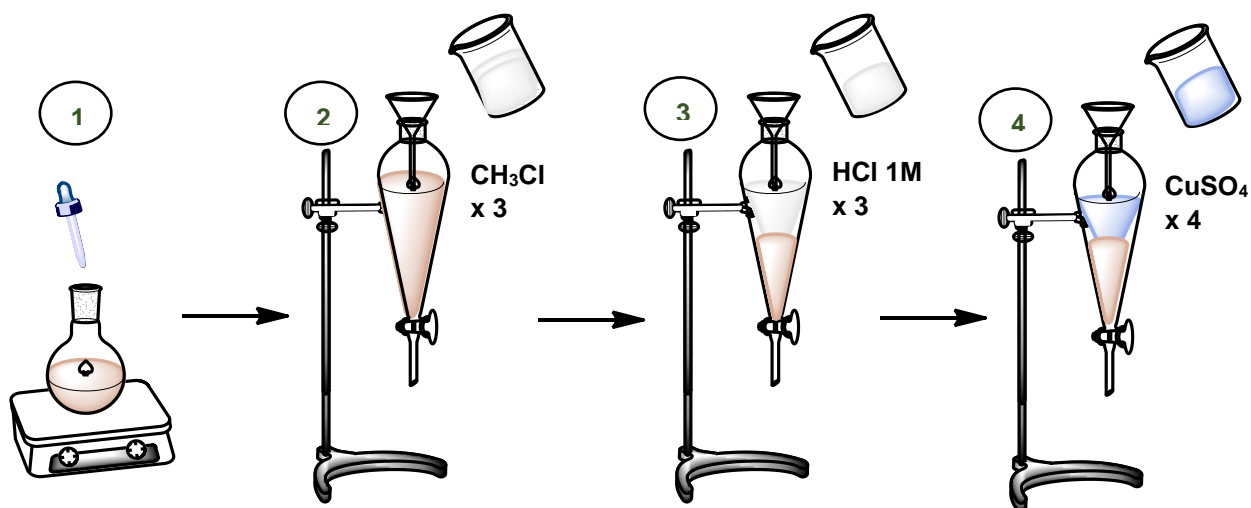
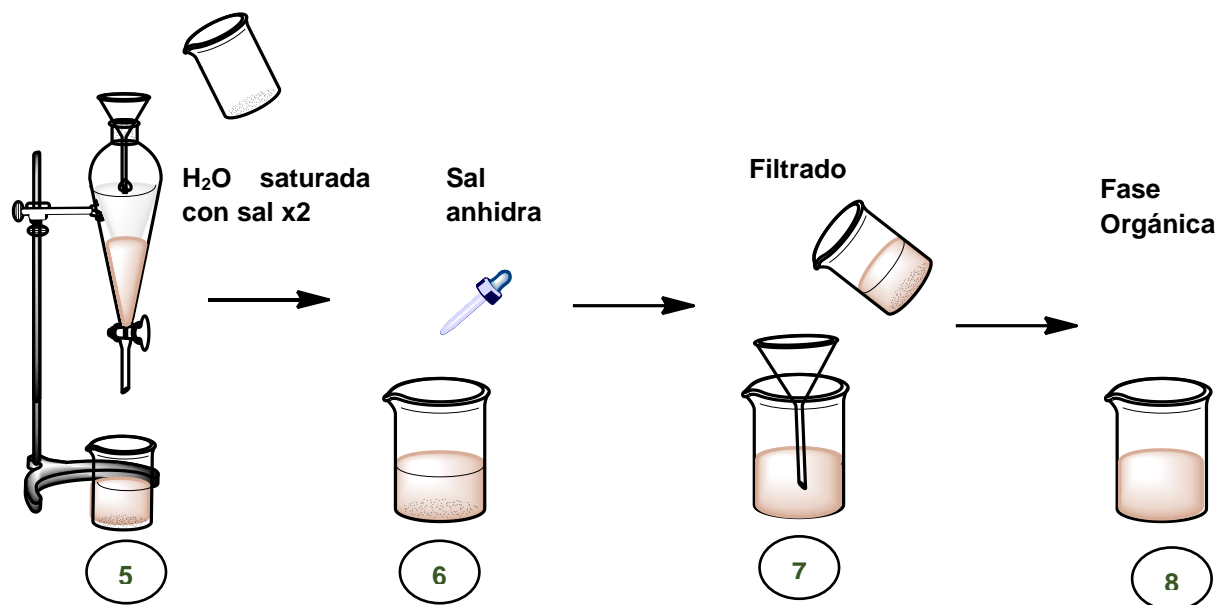


Diagrama 4. Pasos ilustrativos del work up.



Al terminar el work up, se realizó una cromatografía en capa fina comparativa del extracto crudo y el extracto acetilado, utilizando como fase móvil n-Hexano/Acetato de Etilo al 40%.

Después, se procedió a eliminar el solvente restante del extracto acetilado con ayuda del rotavapor a presión reducida.

Para concluir, el extracto acetilado se analizó en el equipo de Cromatografía de Gases acoplado a Masas e Infrarrojo anteriormente mencionados, esperando tener picos y bandas, respectivamente, características de una acetilación.

## Determinación del Grado de Sustitución de Grupos Acetilos

El estudio de la acetilación, dentro de la industria química, es de gran interés, además constituye una de las transformaciones más frecuentemente usadas en síntesis orgánica, ya que proporciona un medio eficiente y económico para la protección del grupo hidroxilo en un proceso sintético. Para llevar a cabo esta cuantificación se siguió el siguiente procedimiento experimental: (Silvana Caglieri et al,2019).

1. Se pesó aproximadamente 0.5 g del extracto acetilado en un vaso de precipitado.
2. Se agregaron 25 ml de una solución de NaOH a 0.5 M
3. Se dejó el sistema en agitación 72 horas a temperatura ambiente.
4. Una vez concluidas las 72 horas, se adicionaron de 3 a 5 gotas del indicador fenoftaleina.
5. De forma inmediata se realizó una titulación con una solución de HCl a 0.1 M hasta el punto final del indicador.
6. Se calculó el contenido del grupo acetilo, con la siguiente ecuación:

$$A\% = \frac{V \times N \text{ de HCl} \times 0.043}{m} \times 100$$

El grado de sustitución se calculó por el contenido de grupo acetilo (A), de acuerdo con la ecuación:

$$D_{ac} = \frac{162 \times A\%}{4300 - 42A\%} \times 100$$

Donde:

- V, el volumen de HCl 0.1 M utilizado
- C, es la normalidad de la solución de HCl = 0.1N
- m, es el peso de la muestra
- 0.043, miliequivalentes del grupo acetilo
- 162, peso molecular de la unidad de anhidro de glucosa
- 42, peso molecular del grupo acetilo – 1
- A%, porcentaje de grupos acetilos

(Guerra-Dellavalle et al., 2008).

## Ensayos antioxidantes: DPPH, ABTS y decoloración oxidativa del $\beta$ -caroteno

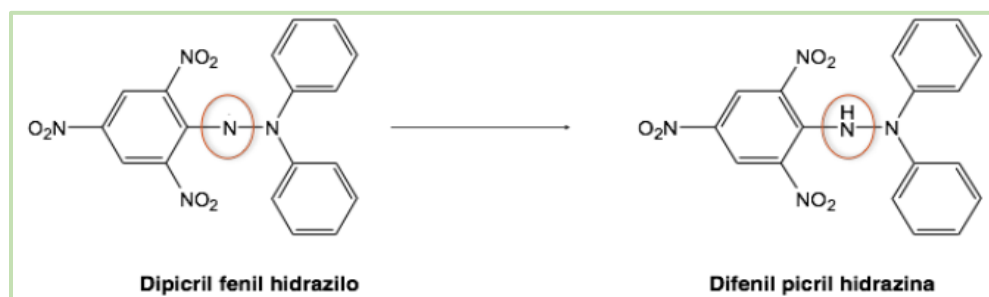
La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que una molécula antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres.

Es importante remarcar la diferencia entre actividad estabilizadora de radicales libres o antirradicalaria y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de reacción. Por su parte, la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa, por lo tanto, una alta actividad antirradicalaria no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante; en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante.

### Reducción del radical libre DPPH

#### 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

Existen muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, una de las técnicas más utilizadas se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción en solución etanólica alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical ( $R\cdot$ ) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (Garlick et al., 1965).



**Figura 27.** Reacción DPPH.

## Metodología

Se preparó una disolución del extracto a evaluar con las siguientes concentraciones:

**Pulpas: 1 mg/mL**

**Semillas: 0.05 mg/mL**

1. Se realizaron 10 diluciones seriadas, obteniendo las siguientes concentraciones:

Extracto	Concentración mg/mL									
<b>Pulpas</b>	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.01	0.005	0.0025	0.00125
<b>Semillas</b>	0.05	0.025	0.0125	0.006	0.003	0.001	0.0005	0.00025	0.0001	0.00005

2. Se preparó la solución del radical DPPH (7.5 mg/ 250 mL).
3. Se añadieron 500 µL de solución de DPPH a todos los tubos. Posteriormente se cubrieron de la luz y se dejaron reposar por un periodo de 30 min. Pasado el tiempo de incubación, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, se utilizó como blanco metanol. Cada experimento fue realizado por triplicado.
4. El porcentaje de actividad antioxidante (%AA) se determinó mediante la siguiente ecuación:

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

Donde:

Am= Absorbancia promedio de la muestra

Ac= Absorbancia de la muestra control (solución de DPPH)

5. Se graficaron los porcentajes respecto a la concentración evaluada, para obtener la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) expresada en mg/mL.

### Reducción del catión radical ABTS

#### ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

Este método fue propuesto en 1993 por Miller, se basa en la capacidad antioxidante del  $ABTS^{2+}$  para capturar aniones radicales de larga vida. En la prueba el ABTS es oxidado hasta formar el catión  $ABTS^+$  es oxidado por radical peróxido, por persulfato de potasio, por peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rábano u otro oxidante hasta formar el catión radical  $ABTS^{•+}$ , el cual presenta un intenso color verde-azul, la cual disminuye al entrar en contacto con compuestos antioxidantes. Una característica importante de este radical es que presenta solubilidad en medios polares y apolares y no es afectado por la fuerza iónica; por tanto, esta técnica permite evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y fluidos biológicos (Rodríguez et al., 2015).

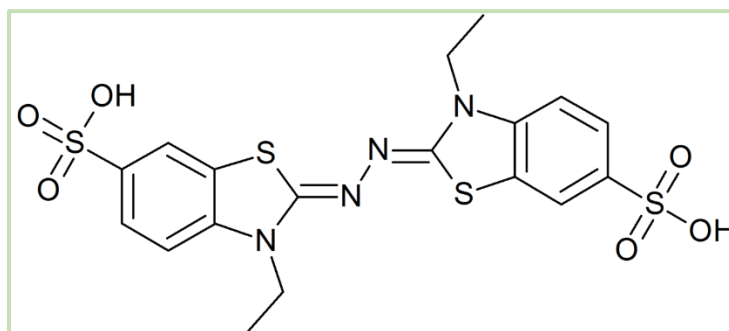


Figura 28. Estructura de ABTS.

## Metodología

### - Preparación del Radical ABTS

Se pesaron 0.0194 mg de ABTS y se mezclaron con 0.0033 mg de Persulfato de Potasio y 5 mL de agua destilada, para la preparación de la solución patrón de ABTS, esta mezcla se dejó en obscuridad durante 18 horas previas a la realización del ensayo.

### - Ensayo

Se prepararon soluciones patrones de las muestras a evaluar, a las siguientes concentraciones:

**Pulpas: 20 mg/mL**

**Semillas: 2 mg/mL**

1. Se realizaron 10 diluciones seriadas de las muestras por triplicado, obteniendo las siguientes concentraciones:

Extracto	Concentración mg/ml									
<b>Pulpas</b>	20	10	5	2.5	1.25	0.6	0.3	0.15	0.075	0.037
<b>Semillas</b>	2	1	0.5	0.25	0.125	0.6	0.3	0.15	0.075	0.037

2. Se preparó una solución diluida de ABTS, para ello se tomaron 150  $\mu$ L de la solución patrón del catión-radical y se llevaron a 15 mL con metanol.
3. Finalmente, se mezclaron 980  $\mu$ L de la solución diluida de ABTS y 20  $\mu$ L de la solución correspondiente de la muestra a evaluar. Después de 7 minutos de incubación, se lee la absorbancia de las soluciones a 734 nm.

- 
4. El porcentaje de actividad antioxidante se determinó mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

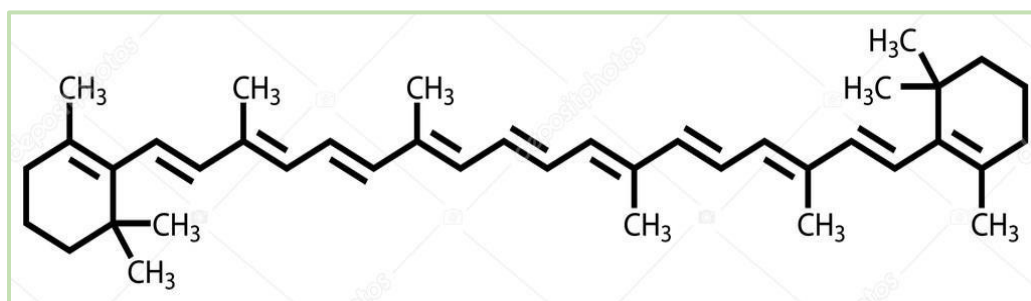
Am= Absorbancia promedio de la muestra

Ac= Absorbancia de la muestra control (solución de ABTS)

5. Concentración evaluada, para obtener la concentración efectiva media (CE50) expresada en mg/mL.

### Decoloración oxidativa de $\beta$ -Caroteno

El mecanismo involucrado en la técnica de la decoloración oxidativa del sistema agua,  $\beta$ -caroteno y ácido linoleico, implica la formación de radicales libres a partir del ácido graso, formados por la sustracción de un átomo de hidrógeno de uno de sus grupos metilenos y catalizado por el calor, estos radicales atacan las moléculas de  $\beta$ -caroteno, lo que conlleva a una pérdida de insaturaciones y por consiguiente, de la coloración naranja característica, por lo que el “blanqueamiento” de carotenoides puede ser inhibido o disminuido por los antioxidantes que donan átomos de hidrógeno para neutralizar radicales del medio oxidativo. (Leon-García y Reyes-Zaquinaula, 2017).



**Figura 29.** Estructura de  $\beta$ -Caroteno.

## Metodología

1. Se colocó en burbujeo 60 mL de agua destilada.
2. Solución de  $\beta$ -Caroteno: Se pesaron 0.2 mg de  $\beta$ -Caroteno y se disolvieron en 2 mL de cloroformo, enseguida se adiciona 20  $\mu$ L de ácido linoleico y 200  $\mu$ L de Tween 20, la solución se homogeneizo y se dejó a temperatura ambiente y obscuridad hasta la evaporación total del solvente.
3. Se prepararon las soluciones de las muestras a evaluar, todas a una concentración de 0.5 mg/mL.
4. Emulsión de  $\beta$ -Caroteno: una vez evaporado el cloroformo, se adicionaron 50 mL de agua destilada previamente en burbujeo y se agitó hasta observar una total disolución.
5. Se mezclaron 2.5 mL de la emulsión preparada anteriormente con 350  $\mu$ L de la solución patrón de la muestra a evaluar, y se realizó de inmediato una primera lectura (T0) a una longitud de onda de 470 nm.
6. Las muestras fueron mantenidas en baño maría a 50°C durante 120 min, posteriormente se realizó una lectura final (T120).
7. El porcentaje de actividad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Actividad Antioxidante: } \left[ 1 - \left( \frac{\text{Am}^0 - \text{Am}^{120}}{\text{Ac}^0 - \text{Ac}^{120}} \right) \right] \times 100$$

Donde:

$\text{Am}^0$ = Promedio de las absorbancias de la muestra a tiempo cero.

$\text{Am}^{120}$ = Promedio de las absorbancias de la muestra a tiempo 120 min.

$\text{Ac}^0$ = Promedio de las absorbancias de la emulsión sola a tiempo cero.

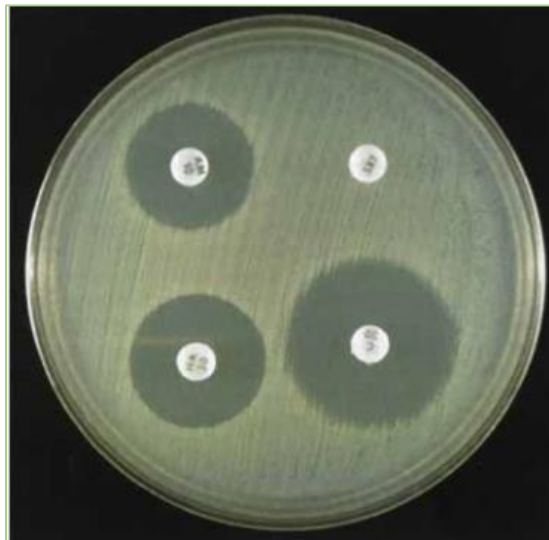
$\text{Ac}^{120}$ = Promedio de las absorbancias de la emulsión sola a tiempo 120 min.

## Evaluación Antimicrobiana

### ANTIBIOGRAMA

El antibiograma por el método de Kirby Bauer, es uno de los métodos que el *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* recomienda para la determinación de sensibilidad bacteriana frente a compuestos antimicrobianos. Además, es un método cualitativo que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable, y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido (Taroco et al., 2008).

El método de Kirby Bauer consiste en depositar discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos, sobre la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, tan pronto el disco impregnado se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar, de manera radiante a través del espesor, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Picazo et al., 2017).



**Figura 30.** Ejemplo de antibiograma.

Tomada del *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. (OMS, 2004)

Para la realización de los ensayos antimicrobianos, las cepas utilizadas fueron proporcionadas por la Dra. Lilia Angélica Hurtado, encargada del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Los microorganismos trabajados fueron los siguientes (ver tabla 16):

**Tabla 16.**

*Bacterias utilizadas en antibiograma.*

CEPAS
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>

## Metodología

### - Preparación del inóculo:

1. Se resembró cada cepa en agar nutritivo 24 horas previas a su utilización, y se mantuvieron en incubación a 37°C.
2. Una vez lista la cepa, se preparó un inóculo a 0.5 según la escala del nefelómetro de McFarland.

### - Preparación de discos:

1. Se preparó una solución saturada del extracto a evaluar en 500 µl de metanol.
2. Se tomó un disco y se impregnó con 40 uL de la solución saturada de la muestra, enseguida se adicionó una segunda alícuota del mismo volumen para finalmente dejar secar. Este procedimiento se realizó con cada muestra.

- **Antibiograma:**

1. Con un hisopo se inoculó en tres a cuatro direcciones por la superficie de una placa de agar Müller Hinton, girando la caja de manera sucesiva en ángulos de 90 grados.
2. Con pinzas estériles, se tomaron cada uno de los discos con las muestras a evaluar y se colocaron sobre la superficie de la placa, presionando levemente para evitar su desprendimiento. Como control fueron utilizados discos con penicilina (antibiótico control) y agua estéril.
3. Se dejaron en incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C con la placa invertida.
4. Pasadas las 24 horas, se realizó la medición del diámetro de inhibición que presentó cada disco, estos datos fueron comparados con las tablas de interpretación internacional.

# DISCUSIÓN DE RESULTADOS

**Screening Fitoquímico.****Tabla 17.***Identificación de metabolitos secundarios en extractos de pulpa y semilla.*

Pruebas	Método	Resultados					
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
Alcaloides	Mayer	N	N	N	N	N	N
	Wagner	N	N	N	N	N	N
	Dragendorff	N	N	N	N	N	N
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	N	P	N	P	N	P
	Gelatina	P	P	P	P	P	P
Saponinas	Espuma	N	P	N	P	N	N
Esteroides y Triterpenos	Lieberman-Burchard	P	P	P	P	P	P
Glucósidos Antraquinónicos	Borntrager	N	P	N	P	N	P
Cumarinas	Erlich	N	P	N	P	N	P
Carbohidratos	Benedict	P	P	P	P	P	P
Flavonoides	Shinoda	N	P	N	P	N	P

**P:** Positivo, **N:** Negativo; **M2:** Flavonoides de tipo Auronas y/o Chalconas, Flavononas; **M4:** Flavonoide de tipo Flavononas; **M6:** Flavonoides de tipo Auronas y/o Chalconas, Flavona.

De los resultados mostrado en la tabla 17, los extractos que corresponden a las semillas M2, M4 y M6 presentaron pruebas positivas para taninos, esteroides, triterpenos, glucósidos antraquinónicos, cumarias, carbohidratos, flavonoides y saponinas, exceptuando esta última prueba para el extracto de semilla número M6.

Respecto a los extractos de pulpa correspondientes a M1, M3 y M5 mostraron contenido de carbohidratos, esto confirma una de las características más sobresalientes de la pulpa de dátil, la cual es, tener una rica presencia de carbohidratos en forma de azúcares que le otorgan su sabor dulce. En estos mismos extractos podemos observar la presencia de taninos. Cabe mencionar, que estos productos al ser un extracto rico en azúcares, estos metabolitos pueden estar en perfecto enlace con glúcidos, conocidos como taninos hidrolizables.

### Identificación de azúcares por derivatización química.

Se llevó a cabo la misma reacción con los tres extractos de pulpa (**M1, M3, M5**), obteniendo los siguientes pesos. (ver tabla 18)



**Figura 31.** Reacción de Acetilación a tiempo 0.



**Figura 32.** Reacción de Acetilación después de 12 horas.

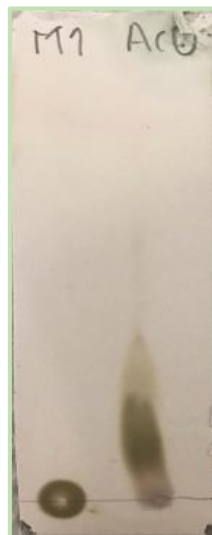
**Tabla 18.**  
*Peso de los extractos acetilados*

Extracto	Pesos
M1	1.15 g
M3	0.795g
M5	0.483 g

A continuación, se muestran las cromatografías de capa fina correspondientes al extracto crudo y extracto acetilado de las tres pulpas utilizando n-Hexano/Acetato de Etilo 40% como fase móvil.



**Figura 33.** CCF de extracto M1 y su acetilación (AcO).



**Figura 34.** CCF de extracto M1 y su acetilación (AcO) revelado con OLEUM.



**Figura 35.** CCF de extracto M3 y su acetilación (AcO).



**Figura 36.** CCF de extracto M3 y su acetilación (AcO) revelado con OLEUM.



**Figura 37.** CCF de extracto M5 y su acetilación (AcO).



**Figura 38.** CCF de extracto M5 y su acetilación (AcO) revelado con OLEUM.

Para caracterizar cada uno de los extractos acetilados, se utilizaron las técnicas de espectroscopía Infrarroja y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

Con la técnica de espectroscopía Infrarroja se hizo un análisis comparativo con el extracto crudo y el acetilado, y sobresalen bandas anchas a 3274, 3258 y 3244  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración del grupo funcional O-H característica de los carbohidratos presentes en el extracto crudo. De manera visual encontramos los espectros en anexo 1, anexo 3 y anexo 5.

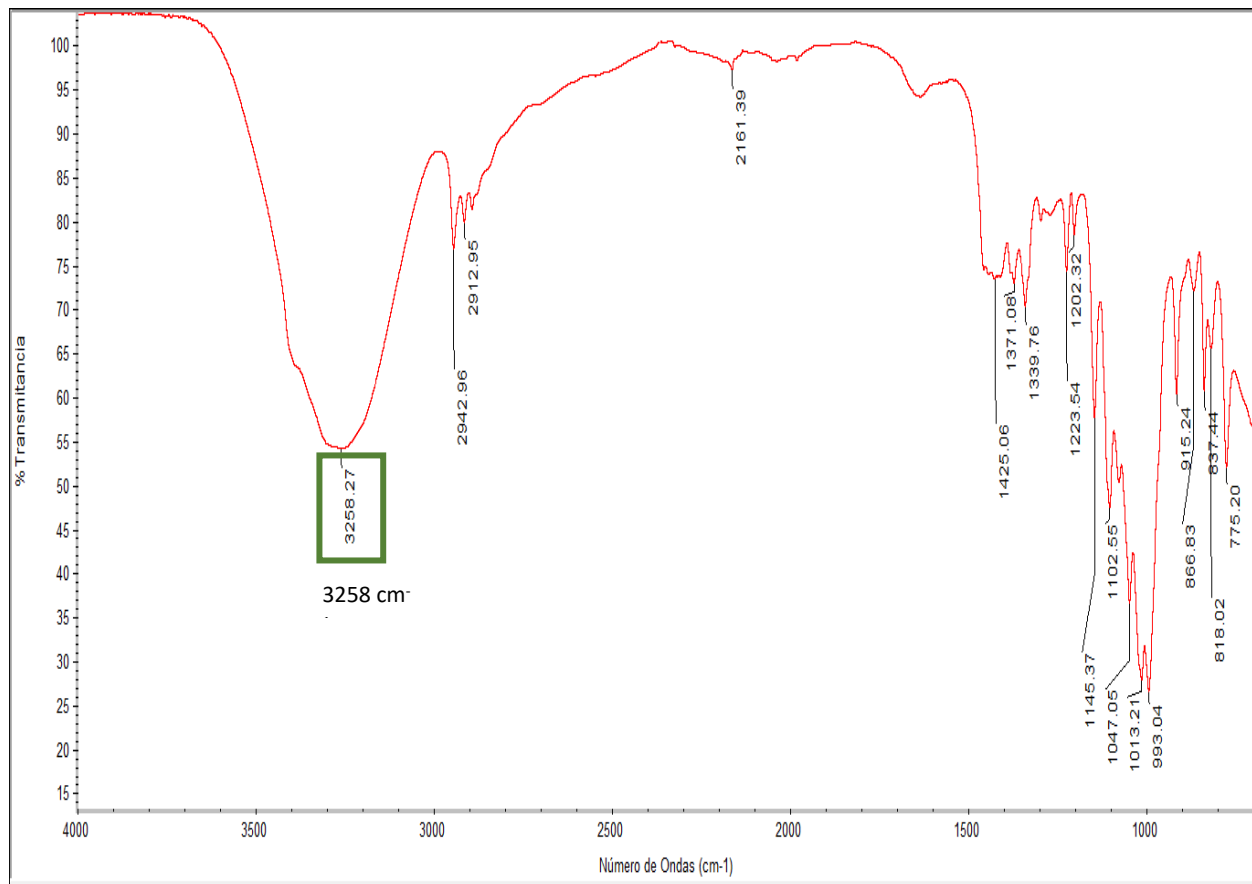


Figura 39. Espectro de Infrarrojo. Muestras M1 (extracto crudo).

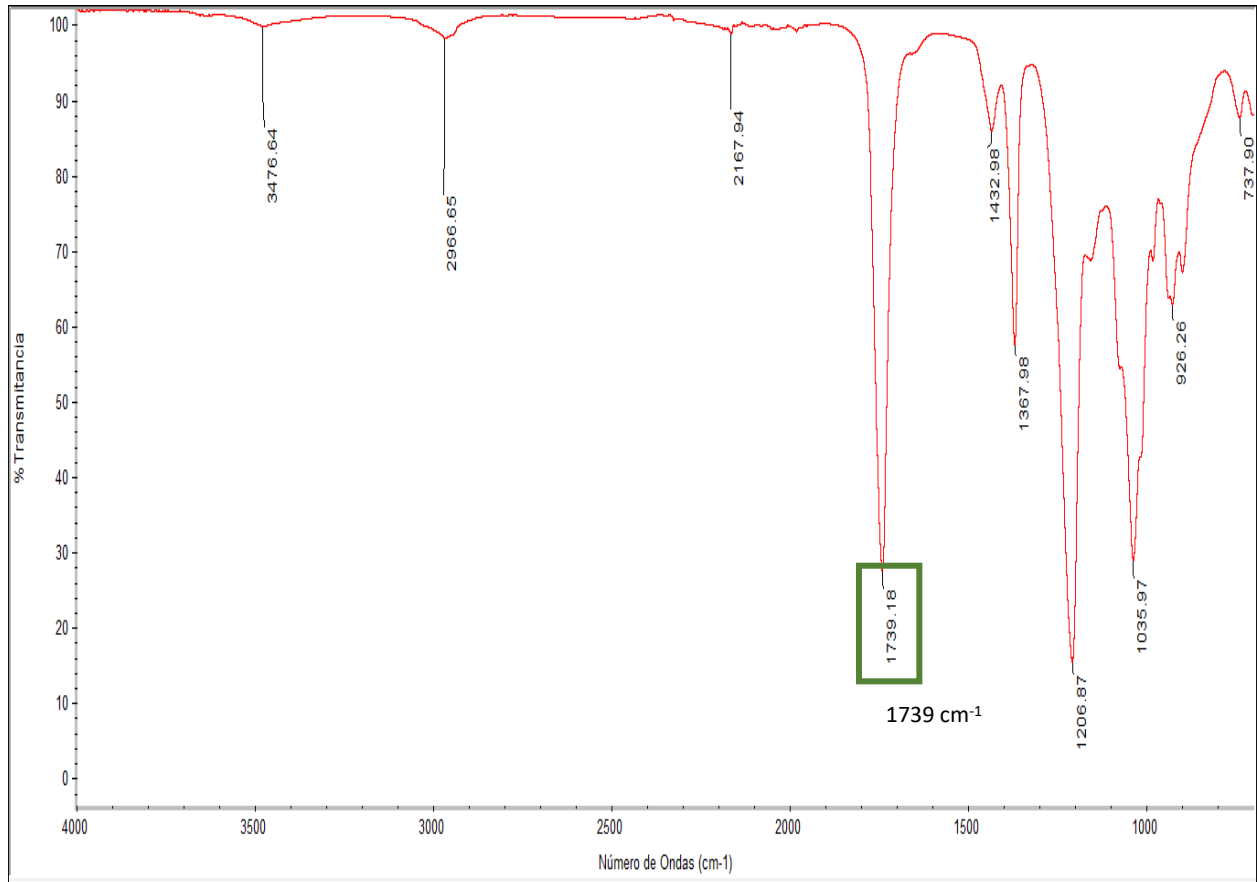


Figura 40. Espectro de Infrarrojo. Muestra M1 (extracto acetilado).

En el análisis de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) la confirmación de la reacción se observó con el tiempo de retención del fragmento 43 m/z correspondiente al peso molecular del grupo Acetilo.

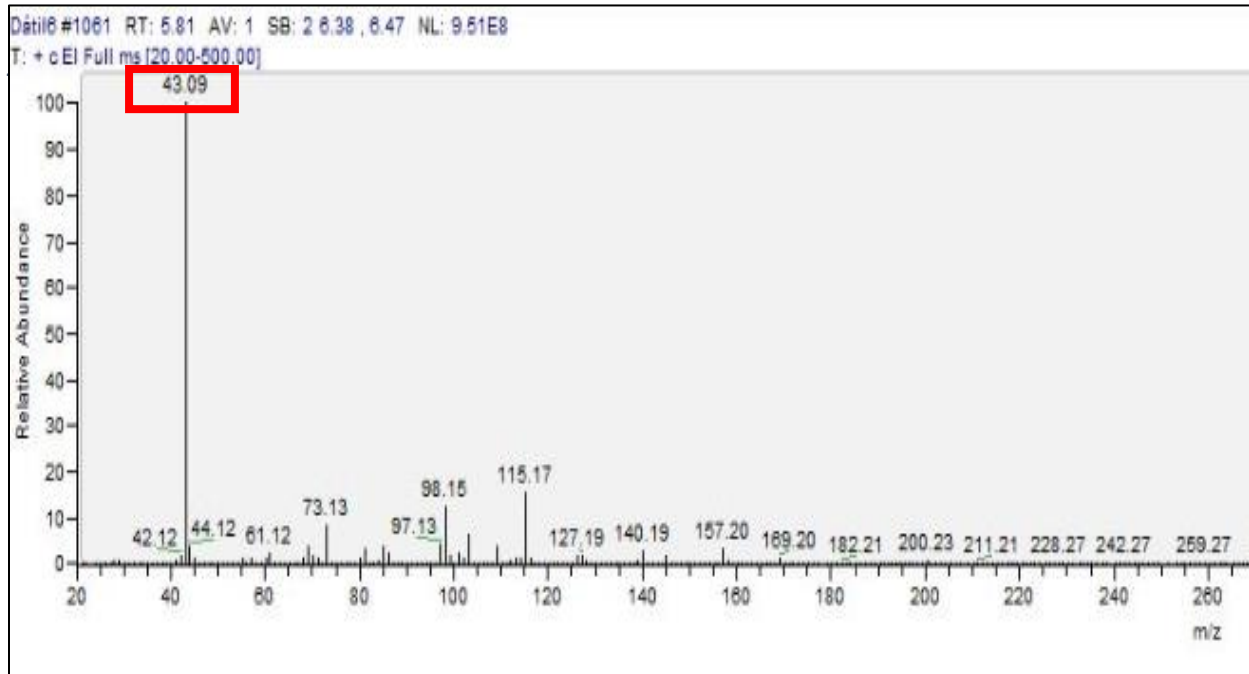
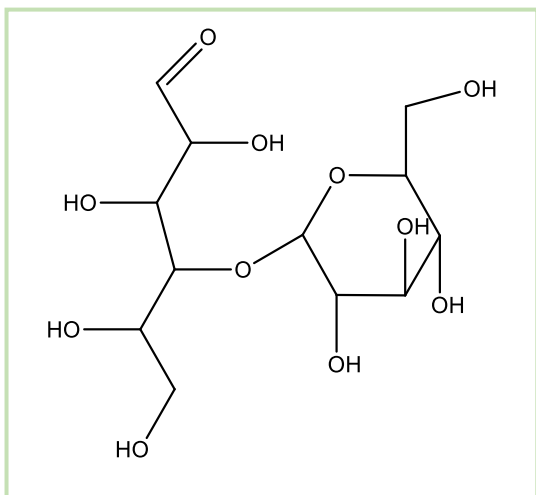
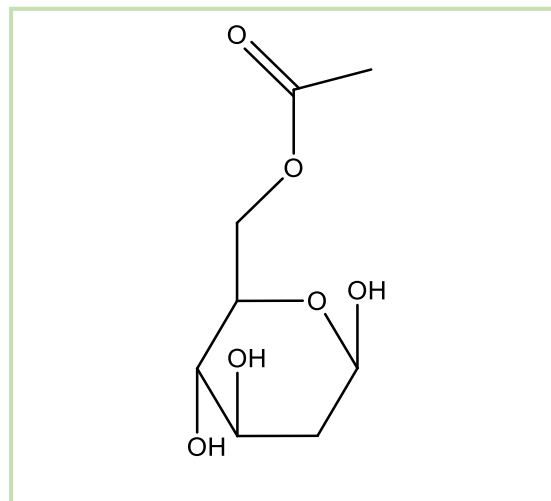


Figura 41. Espectro de masas del extracto M1 acetilado.

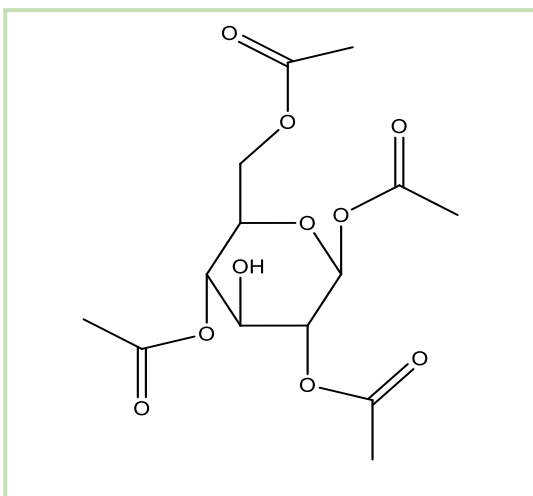
Además, la base de datos del programa del CG-EM, confirmó la existencia de diferentes carbohidratos acetilados, los ejemplos están descrito en las figuras 44, 45, 46 y 47.



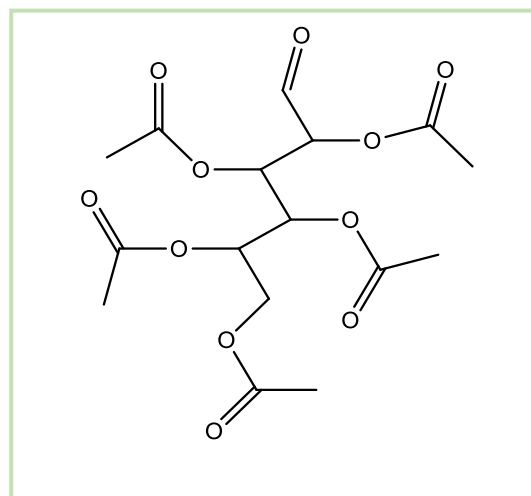
**Figura 42.** Estructura de D-Glucosa,4-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil.



**Figura 43.** Estructura de 6-O-Acetilhexipiranososa.



**Figura 44.** Estructura de 1,2,4,6-Tetra-O-acetilhexipiranososa.



**Figura 45.** Estructura de D-Glucosa penta acetato.

## Determinación del grado de sustitución de grupos acetilos.

### M1 ACETILADO

- Contenido de Acetilos

$$A(\%) = \frac{25.8 \text{ ml} \times 10^{-3} \times 0.1 \text{ M} \times 43}{180.15 \text{ g}} \times 100$$

$$A(\%) = 11.09 \%$$

- Grado de Sustitución

$$DS_{ac} = \frac{162 \text{ g} \times 11.09 \%}{4300 - 42(11.09)}$$

$$DS_{ac} = 0.468$$

### M3 ACETILADO

- Contenido de Acetilos

$$A(\%) = \frac{20.3 \text{ ml} \times 10^{-3} \times 0.1 \text{ M} \times 43}{180.15 \text{ g}} \times 100$$

$$A(\%) = 8.72 \%$$

- Grado de Sustitución

$$DS_{ac} = \frac{162 \text{ g} \times 8.72 \%}{4300 - 42(8.72\%)}$$

$$DS_{ac} = 0.359$$

### M5 ACETILADO

- Contenido de Acetilos

$$A(\%) = \frac{21 \text{ ml} \times 10^{-3} \times 0.1 \text{ M} \times 43}{180.15 \text{ g}} \times 100$$

$$A(\%) = 9.03 \%$$

- Contenido de Acetilos

$$DS_{ac} = \frac{162 \text{ g} \times 9.03 \%}{4300 - 42(9.03\%)}$$

$$DS_{ac} = 0.373$$

La modificación química de los extractos presentó los siguientes porcentajes de grupos acetilos (A%) y grado de sustitución (DS): (ver tabla 19)

**Tabla 19.**  
*Resultados de A% y DS.*

Porcentaje de grupo acetilo (A%) y determinación del grado de sustitución (DS)		
Extracto Modificado	A%	DS
<b>M1 – AcO</b>	11.09 %	0.468
<b>M3 – AcO</b>	8.72 %	0.359
<b>M5 – AcO</b>	9.03 %	0.373

Estos resultados nos muestran la cantidad de grupos acetilos incluidos en cada molécula, tentativamente, carbohidratos presentes en los extractos de pulpa. Este tipo de modificaciones estructurales hacen un cambio en la naturaleza hidrofílica del extracto brindando mejores propiedades.

Un resultado satisfactorio es la disminución de la polaridad de cada extracto permitiendo un recorrido a través de una CCF, además de facilitar su análisis mediante CG-ES.

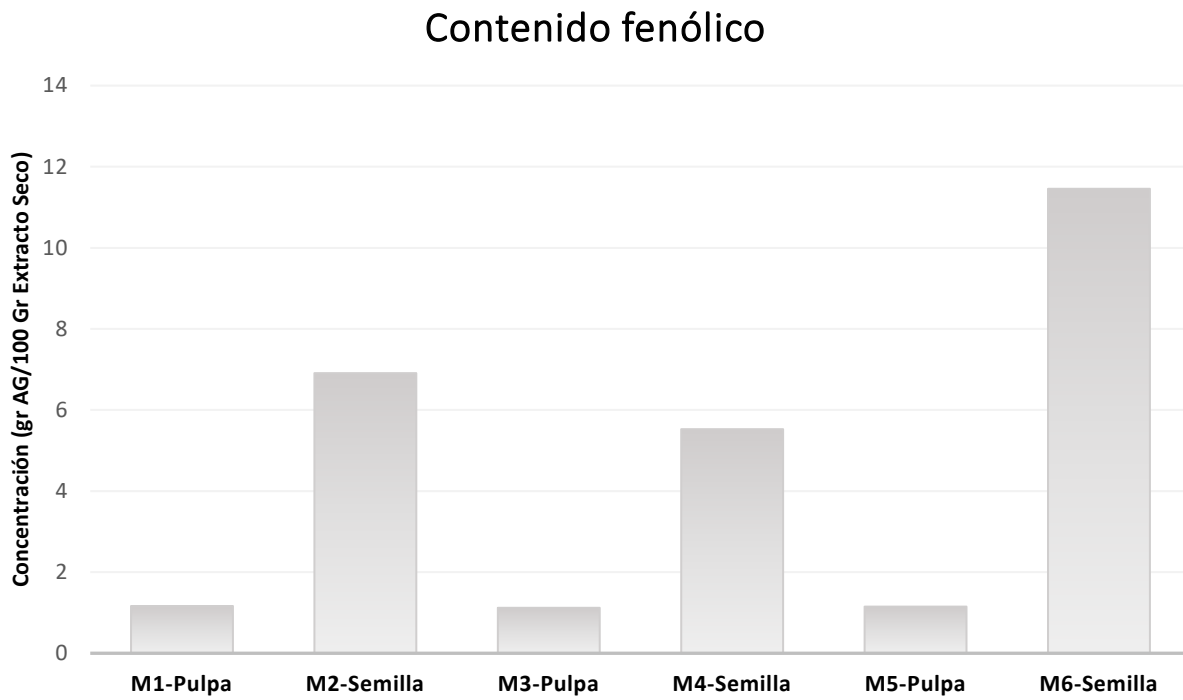
### Cuantificación de Polifenoles

En la tabla 20 se muestran la concentración de compuestos de tipo poli fenólicos de cada uno de los extractos. Los resultados con mayor concentración de estos componentes son de los extractos de semilla, esto se relaciona con las funciones biológicas más importantes de las semillas, 1) generar una síntesis activa de metabolitos secundarios para la protección de la misma o del fruto ante condiciones climática extremas, ataque de microorganismos (bacterias, virus y hongos), 2) atracción de agentes dispersadores de semillas. (Sepúlveda Jiménez 2003).

#### Tabla 20.

*Concentración de polifenóles presentes en cada extracto de pulpa y semilla.*

<b>Contenido de compuestos polifenólicos</b>	
<b>Extracto</b>	<b>Concentración mg de Ácido Gálico/100 g seco</b>
<b>Pulpa M1</b>	1.05
<b>Semilla M2</b>	12.55
<b>Pulpa M3</b>	1.13
<b>Semilla M4</b>	8.88
<b>Pulpa M5</b>	1.05
<b>Semilla M6</b>	22.96

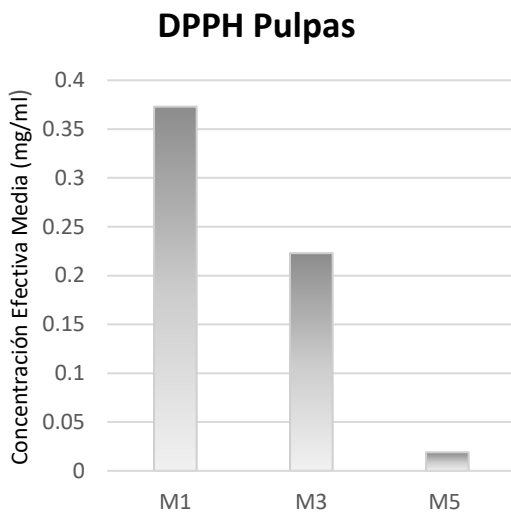


**Gráfica 1.** Contenido de polifenoles.

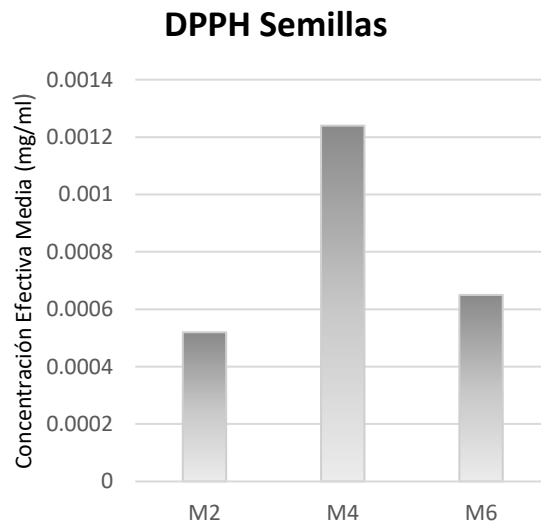
## Pruebas Antioxidantes

### Reducción del radical libre DPPH

Una vez más, los resultados más relevantes en las técnicas antioxidantes empleadas, son las de los extractos de semillas de manera comparativa con los extractos de pulpa. Se pudo observar que los extractos de semillas superan el control utilizado mientras que los extractos de pulpa requieren mayor concentración para alcanzar el 50% de esta inhibición oxidativa.



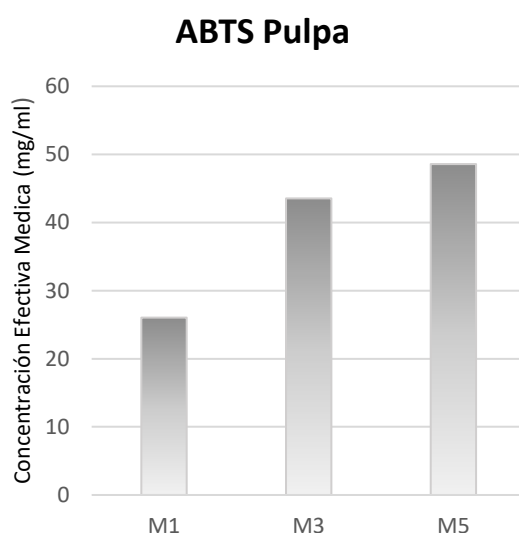
Gráfica 2. CE<sub>50</sub> pulpas DPPH.



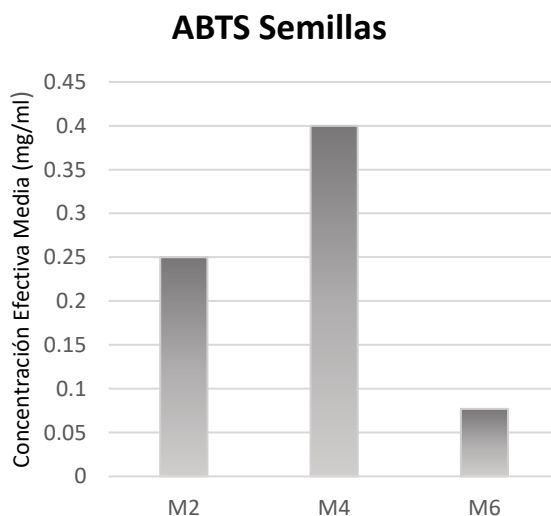
Gráfica 3. CE<sub>50</sub> semillas DPPH.

### Reducción del catión radical ABTS+

En la técnica de reducción del catión radical ABTS<sup>+</sup>, ninguno de los extractos presenta mejor actividad antioxidante que el control, esto no quiere decir que no presentan buena actividad, sino que requieren una concentración mayor para alcanzar el 50% de inhibición del catión radical ABTS<sup>+</sup>. De manera comparativa, los resultados indican que los extractos de semilla mantienen el mejor perfil antioxidante respecto a los extractos de pulpa.



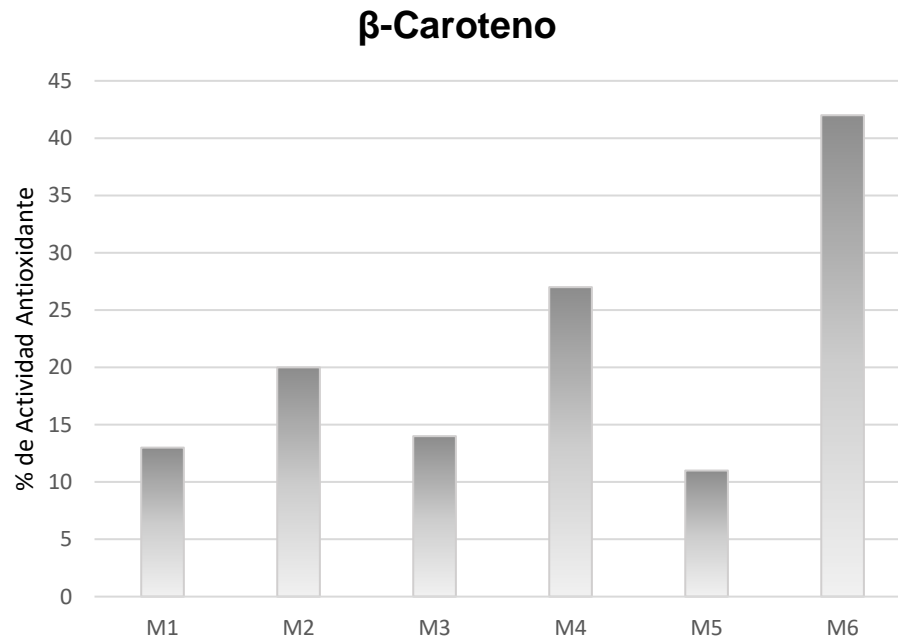
Gráfica 4. CE<sub>50</sub> Pulpas (ABTS).



Gráfica 5. CE<sub>50</sub> Semillas (ABTS).

## Decoloración Oxidativa del $\beta$ -Caroteno

Por otro lado, la técnica de  $\beta$ -Caroteno mostró que el extracto M6 correspondiente a las semillas fue el más activo, y una vez más se observa que estos extractos presentan un mayor efecto respecto a los de pulpa.



**Gráfica 6.** Porcentaje de Actividad Antioxidante de pulpas y semillas ( $\beta$ -Caroteno).

En la tabla 21 se muestra de forma resumida la concentración efectiva media de cada extracto en las tres diferentes técnicas. Vemos que en las tres técnicas los extractos de semilla son los mejores candidatos por presentar una concentración mínima que alcanza el 50% de actividad antioxidante. De forma más específica obtenemos los mejores resultados en la técnica de DPPH que los extractos de semilla superan el control utilizado.

Por otro lado, los extractos de pulpa no reflejan resultados tan favorables si se compara con los de semilla esto no quiere decir que no presenten actividad antioxidante, sino que se requiere mayor concentración para inhibir el 50% de los radicales libres en el medio.

**Tabla 21.**

*Concentración efectiva media en DPPH y ABTS, Porcentaje de Actividad Antioxidante en  $\beta$ -Caroteno.*

Extracto	Técnica Antioxidante		
	DPPH CE <sub>50</sub> (mg/ml)	ABTS CE <sub>50</sub> (mg/ml)	$\beta$ -Caroteno AA%
M1	0.373	26.04	13
M2	0.00052	0.25	20
M3	0.223	43.54	14
M4	0.00124	0.4	27
M5	0.019	48.58	11
M6	0.00065	0.077	42
<b>Controles</b>	Quercetina 0.003 mg/ml	Quercetina 0.05 mg/ml	$\alpha$ -tocoferol 60%

### Evaluación antibacteriana

La prueba de antibiograma permitió identificar la resistencia o inhibición que presentaron las bacterias frente a los extractos de pulpas y semillas.

- *Escherichia coli*



**Figura 46.** Antibiograma con *E.coli* expuesta a los extractos de semillas.



**Figura 47.** Antibiograma con *E.coli* expuesta a los extractos de pulpa.

**Tabla 22.**

Halos de inhibición en *E.coli*.

EXTRACTO	DIÁMETRO	R/I/S
M1	0 mm	Resistente
M2	0 mm	Resistente
M3	0 mm	Resistente
M4	0 mm	Resistente
M5	0 mm	Resistente
M6	0 mm	Resistente
Penicilina-P	0 mm	Resistente
Penicilina-S	0 mm	Resistente

Esta cepa se manifestó resistente ante los 6 extractos y ante el antibiótico control. No se observó ningún halo de inhibición alrededor de los discos. (ver tabla 22)

- *Staphylococcus aureus*



**Figura 48.** Antibiograma *S.aureus* ante los extractos de pulpa.



**Figura 49.** Antibiograma *S. aureus* ante los extractos de semilla.

**Tabla 23.**

Halos de inhibición en *S.aureus*

EXTRACTO	DIAMETRO	R/I/S
M1	0 mm	Resistente
M2	0.7 mm	Resistente
M3	0 mm	Resistente
M4	0.9 mm	Resistente
M5	0 mm	Resistente
M6	0.7 mm	Resistente
Penicilina-P	2.3 cm	Resistente
Penicilina-S	2.5 cm	Resistente

Estos resultados de inhibición corresponden a *Staphylococcus aureus* donde observamos halos de inhibición en los extractos de semillas, sin embargo, de acuerdo al CLSI el diámetro presente no representa una medida de característica "Sensible" para la bacteria. (ver tabla 23)

- *Klebsiella pneumoniae*

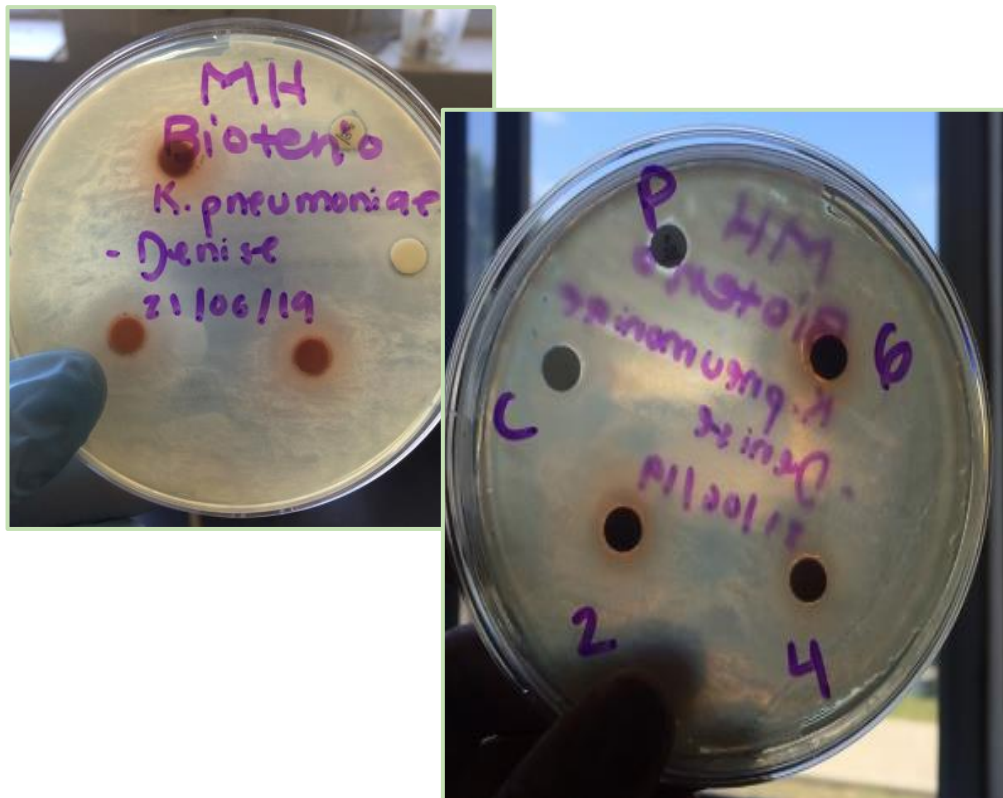


Figura 50. Antibiograma *K. pneumoniae* ante los extractos de semillas.

Tabla 24.

Halos de inhibición *K.pneumoniae*

EXTRACTO	DIAMETRO (mm)	R/I/S
M2	0	Resistente
M4	0	Resistente
M6	0	Resistente
Penicilina	0.6	Resistente

La bibliografía menciona que los extractos de semillas presentan mejores resultados en evaluación de sensibilidad bacteriana, por tal motivo, las siguientes evaluaciones son realizadas únicamente con extractos de semillas. En *K.pneumoniae* la evaluación muestra resistencia ante los extractos. (ver tabla 24)

- *Streptococcus pyogenes*

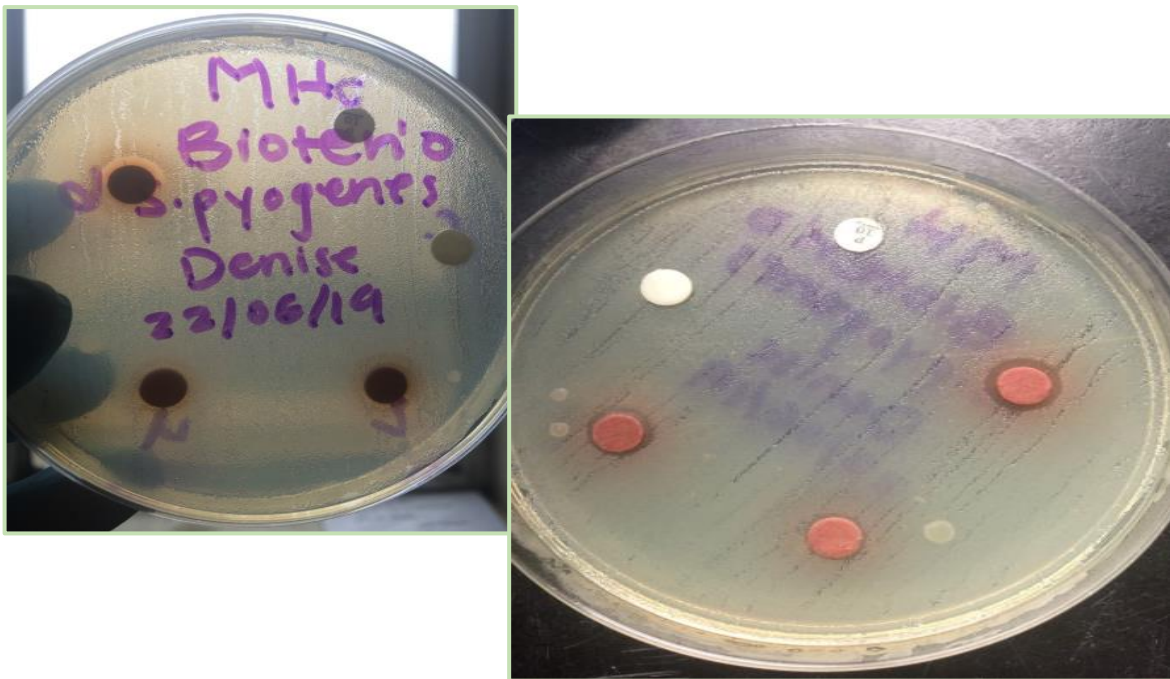


Figura 51. Antibiograma *S.pyogenes* ante los extractos de semillas.

Tabla 25.  
Halos de inhibición *S.pyogenes*

EXTRACTO	DIAMETRO	R/I/S
M2	1 cm	Resistente
M4	1.1 cm	Resistente
M6	1.3 cm	Resistente
Penicilina	0	Resistente

Los extractos de dátil muestran inhibición ante bacterias gram positivas. *S. pyogenes* es una bacteria gram positiva que carece de lipopolisacáridos en su membrana externa, lo que las hace más susceptibles ante antimicrobianos en comparación con las gram negativas. Sin embargo, los extractos de semilla presentan inhibición, pero de acuerdo al CLSI el diámetro no se considera sensible para la bacteria. ( ver tabla 25)

- *Enterococcus faecalis*



Figura 52. Antibiograma *E. faecalis* ante los extractos de semillas.

Tabla 26.  
Halos de inhibición *E. faecalis*

EXTRACTO	DIAMETRO	R/I/S
M2	0.9 mm	Resistente
M4	0.8 mm	Resistente
M6	1 cm	Resistente
Penicilina	1.6 cm	Sensible

Ante *E. faecalis* observamos un halo de inhibición en los tres extractos, pero siguen siendo resultados de resistencia ante los extractos. Aunque esto al ser un estudio preliminar no se descartan los resultados de una posible inhibición ante otras cepas bacterianas. (ver tabla 26)

# CONCLUSIONES

Mediante la realización del proyecto se llegaron a las siguientes conclusiones:

La cuantificación de compuestos polifenólicos en este estudio mostró que los extractos de las semillas presentan mayores cantidades de estos componentes, de los cuáles el de mayor concentración fue el identificado como M6 con 22.96 mg EAG/100g.

Los resultados de la reacción de acetilación y la determinación del grado de sustitución de los carbohidratos presentes en la pulpa, fue requerido para la identificación de estos azúcares, y los resultados fueron verificados por CCF y CG-EM.

Los extractos de pulpa y semilla se sometieron a una evaluación antioxidante con las técnicas de ABTS, DPPH y de la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno, y de estos estudios solo se observó un efecto de inhibición oxidativa con la técnica de DPPH, en donde los extractos de semilla M2, M4 y M6 superaron al control con una  $CE_{50}$  de 0.00052 mg/ml, 0.00124 mg/mL y 0.00065 mg/mL respectivamente.

De los experimentos cualitativos de inhibición antibacteriana con las cepas, *E. faecalis* y *S.aureus*, los extractos de semillas presentaron halos de inhibición de 0.7 – 0.9 mm, los cuales indican resistencia.

El estudio antimicrobiano frente a *K. pneumoniae*, *S.pyogenes* y *E.coli*, no se observaron halos de inhibición con un diámetro representativo de sensibilidad, sin embargo, se sugiere experimentos cuantitativos para identificar la concentración capaz de lograr inhibir el crecimiento bacteriano.

# REFERENCIA

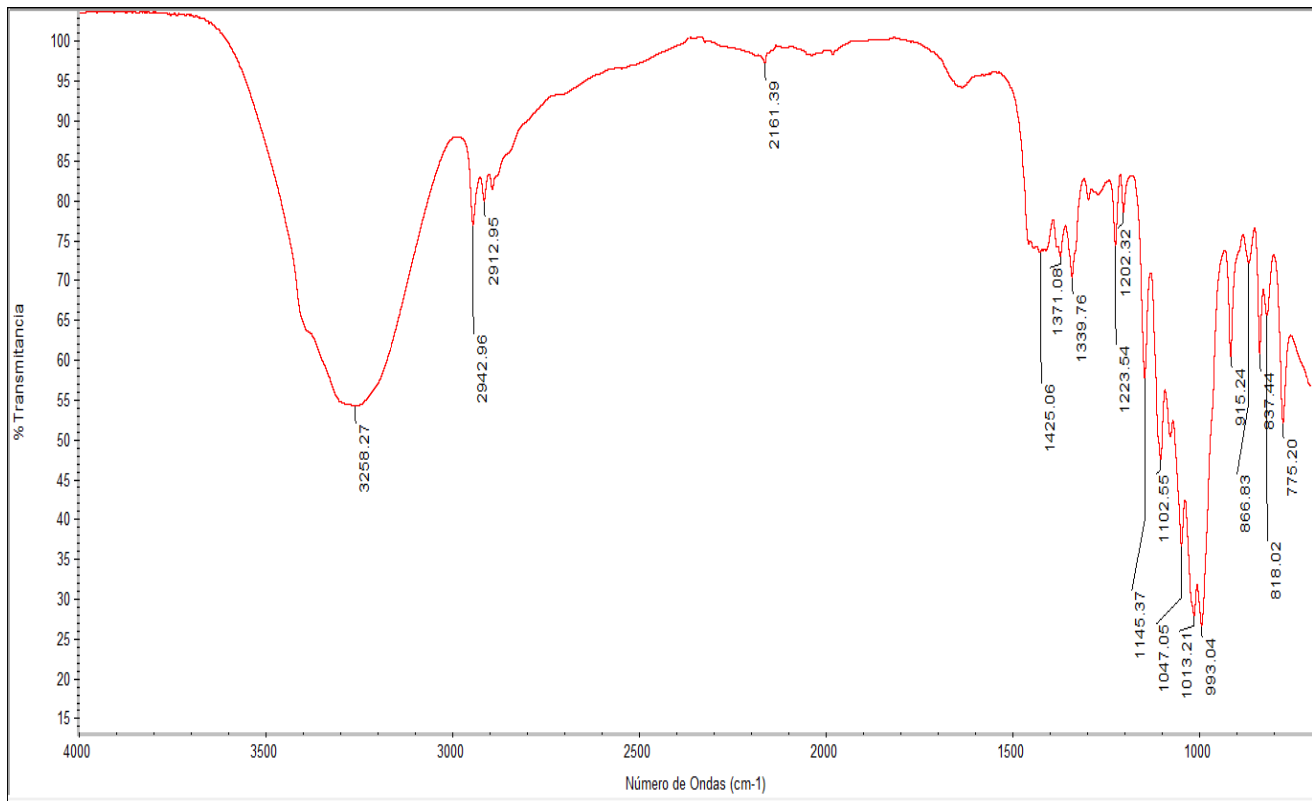
- A. Manickavasagan, M. Mohamed Essa, E. Sukumar. (2012.). Dates Production, Processing, Food, and Medicinal Values. Boca Raton: CRC Press.
- Al-Shwyeh, H. (2019). Date palm ( Phoenix dactylifera L.) fruit as potential antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 11(1), 1. [https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS\\_168\\_18](https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_168_18)
- Alfonso R. Gennaro. (2003). *Farmacia*. Buenos Aires:: Médica Panamericana.
- Ali, A. (2012). *26 Nutritional and Medicinal Value of Date Fruit*. May 2014.
- Andrea, L., & Murcia, V. (2018). *Extracción e identificación de lípidos*.
- Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Meurlay, D. Le, & Louaileche, H. (2013). Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (Phoenix dactylifera L.) cultivars: A comparative study. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.005>
- Claudia Moreno M, C., Rubén González E, R., & Constanza Beltrán, C. (2009, agosto). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69(2). Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl>
- Chao, C. C. T., & Krueger, R. R. (2007). The date palm (Phoenix dactylifera L.): Overview of biology, uses, and cultivation. *HortScience*.
- Chikhale, R. V., Pant, A. M., Menghani, S. S., Wadibhasme, P. G., & Khedekar, P. B. (2017). Facile and efficient synthesis of benzoxazole derivatives using novel catalytic activity of PEG-SO<sub>3</sub>H. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(5), 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.011>
- Cosme, P. I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural*, 23–26.
- Criado Dabrowska, C., & Moya Mir, M. S. (2009). Vitaminas y antioxidantes. *Departamento De Medicina De La Universidad Autonoma De Madrid*, 5–33. [http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS\\_Y\\_ANTIOX\\_EL\\_MEDICO.pdf?botsearch](http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf?botsearch)
- De Grenade, R. (2013). Date palm as a keystone species in Baja California peninsula, Mexico oases. *Journal of Arid Environments*, 94, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2013.02.008>
- De, R., Española, S., Picazo, E. J. J., Cantón, R., Gómez-lus, M. L., & Rodríguez-avial, C. (2017). OMS | La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. *Who*. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- Desiree Kröper. (2014). Antioxidantes – Parte 1. Enero, 2020, de Salud es vida. Sitio web: <http://salud.esvida.org/estilo-de-vida/antioxidantes-parte-1/141672.html>
- FAO. (2002). Land preparation, planting operation and fertilization requirements. In A. Zaid (Ed.), *Date palm cultivation* (UNOPS-Da, p. 1). Food and agricultural organization of the United Nations.
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2010). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Universidad Politecnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos.*, 1–9. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia\\_Mart?nez\\_et\\_al.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia_Mart?nez_et_al.pdf?sequence=1)
- GARLICK, D. G., COURTICE, F. C., & MUNOZ-MARCUS, M. (1965). Plasma Lipoproteins in Hyperlipaemic States in Man and in the Rabbit. *Australasian Annals*

- of Medicine*, 14(2), 102–110. <https://doi.org/10.1111/imj.1965.14.2.102>
- Ghnimi, S., Umer, S., Karim, A., & Kamal-Eldin, A. (2017). Date fruit (Phoenix dactylifera L.): An underutilized food seeking industrial valorization. *NFS Journal*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.12.001>
- Guerra-Dellavalle, D., Bello-Pérez, L. A., González-Soto, R. A., Solorza-Ferial, J., & Arámbula-Villa, G. (2008). Effect of reaction time on the acetylation of plantain starch. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7(3), 283–291.
- H, M. C., & V, C. R. (2015). *Antioxidantes : perspectiva actual para la salud humana* *Antioxidants : present perspective for the human health*. 42(7).
- Herde, Z. D., John, P. D., Alvarez-Fonseca, D., Satyavolu, J., & Burns, C. T. (2017). Stereoselective acetylation of hemicellulosic C5-sugars. *Carbohydrate Research*, 443–444, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.03.008>
- Hern, L. B. L., Titular, I., Nacional, C., Natural, M., & Adjunta, P. (n.d.). *ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES : Actualidades sobre los antioxidantes en los*.
- Hernández Guzmán, A. C., & Hermosilla Carazo, V. J. (2014). *Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala* *Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala*. 73. [http://www.repositorio.usac.edu.gt/2065/1/06\\_3661.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/2065/1/06_3661.pdf)
- Investigaci, R., & Group, A. A. E. B. (2007). *Tanino: la revolución enológica mito o realidad*. 1–15.
- Jain, S. M., & Sciences, A. (n.d.). *Secondary metabolites in date palm*.
- Leon García, C. D., & Reyes Zaquinaula, P. X. (2017). *Estandarización De La Técnica Blanqueamiento Del Betacaroteno Para La Evaluación De La Actividad Antioxidante De Extractos Lipofílicos: Plantas Medicinales, Frutos Y Microalgas*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/27662>
- Londoño, J. L., & Químico Farmacéuti-Co, P. (n.d.). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad PARTE III / PART III*. 129–162.
- Luz, I. A. P. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4.5(3), 186–191.
- Maitén y Catalina Guerrico. (2019.). *6 plantas medicinales para desintoxicar tu cuerpo*. Enero,2020, de El Diario Sitio web: <https://eldiariiony.com/2019/02/14/1986503>
- MsC. Yaima Esperanza Pérez Campos,. (2014). 18(10), 1467–1474.
- Muriel Gros-Balthazard.(2013). Hybridization in the genus Phoenix: A review. *Food Agric*, 25 (11): 831-842. DOI: 10.9755
- Nasir, M. U., Hussain, S., Jabbar, S., Rashid, F., Khalid, N., & Mehmood, A. (2015). *A review on the nutritional content , functional properties and medicinal potential of dates Date varieties of the world Nutritional value and functional properties of dates Proximate composition of dates*. 3(1), 17–22.
- Ochoa, L., & Sarmiento, A. (2018). *ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE VEGETAL Bucquetia glutinosa (L. f.) DC. (Melastomataceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA*. 83.
- P. Koleff, S. O. y E. M. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Conabio*, 62, 12–15.
- Pla, D. L., Miranda, U. F. De, Casanoves, F., Rica, T., & Rienzo, J. Di. (2011). *Universidad*

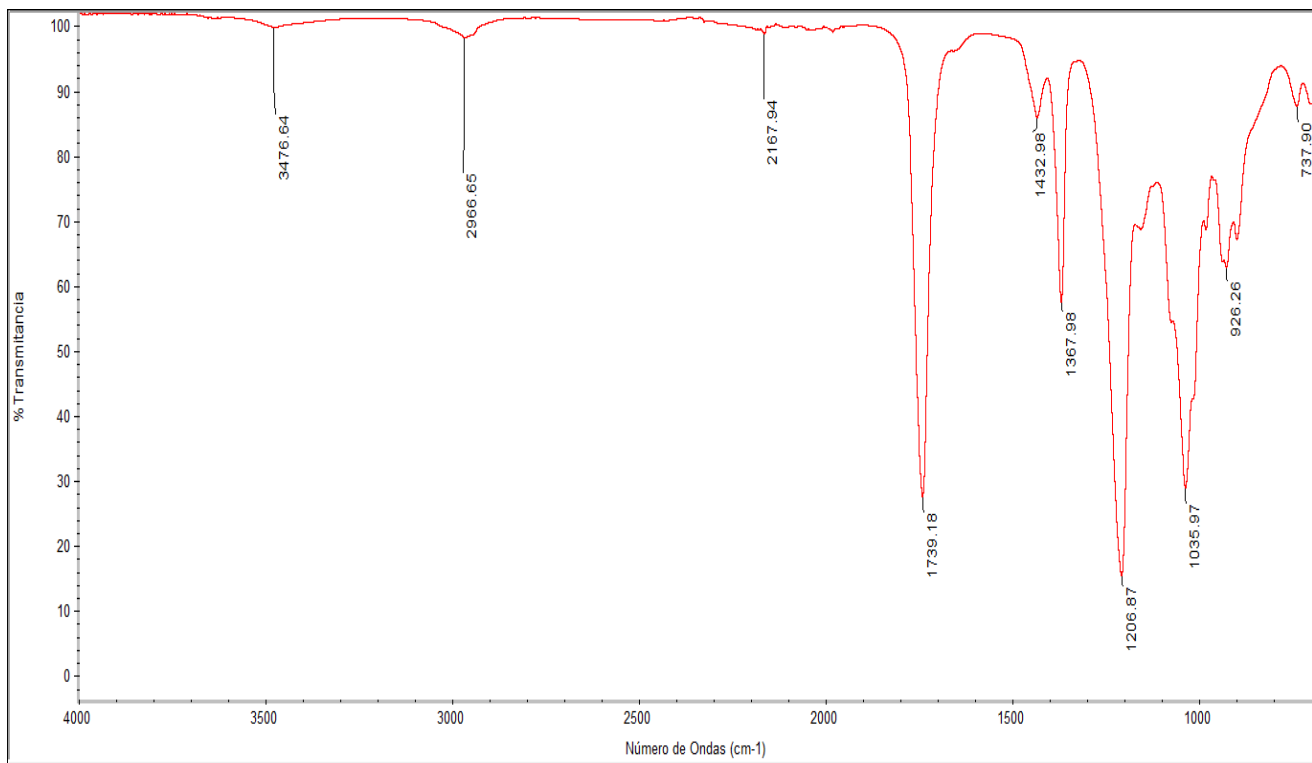
- Nacional de la Patagonia San Juan Bosco Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.* 1–3.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Alexandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rodríguez, A., Marino, N., Enríquez, G., & Katherine, L. (2012). *Identificación Preliminar De Fitoconstituyentes En Las Inflorescencias.*
- Rodríguez, O. E., Andrade, W. A., & Diaz, F. E. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. ( Papaveraceae ) Antioxidant activity of extracts from leaves of *Bocconia*. *Journal of Technology*, 14 (2), 21–36.
- Salomon-Torres, R., Ortiz-Uribe, N., & Villa-Angulo, C. (2017). Composición Nutricional y Funcional del Dátil (*Phoenix Dactylifera* L.) Variedad Medjool. *Revista Universitaria Nueva Epoca*, 92(November), 14–20.
- Salomón-Torres, R., Sol-Uribe, J. A., Valdez-Salas, B., García-González, C., Krueger, R., Hernández-Balbuena, D., Norzagaray-Plasencia, S., García-Vázquez, J. P., & Ortiz-Uribe, N. (2020). Effect of Four Pollinating Sources on Nutritional Properties of Medjool Date (*Phoenix dactylifera* L.) Seeds. *Agriculture*, 10(2), 45. <https://doi.org/10.3390/agriculture10020045>
- Schlaepfer, L., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(4).
- Sepúlveda-jiménez, G. (2003). Sepúlveda Jiménez , Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario. *Rev Mex Fitopatol*, 21(3), 355–363. <http://redalyc.uaemex.mx>
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suarez, D. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. In *Uniagraria*.
- Silvana, I., Caglieri, C., Héctor, I., & Macaño, R. (n.d.). *Application of the theories of functional density and møller - plesset second order in the study of alcohols acetylation Introducción.*
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacterología y Virología Médica*, 36(Cim), 663–671.
- Tatiana Alejandra, H. N. (2016). *Unidad Didáctica para la Identificación Cualitativa - Estrategia de aulas para la Construcción de las Loncheras Saludables.* 173:67. <http://www.bdigital.unal.edu.co/55024/7/TatianaAlejandraHuertasN.2016.pdf>
- Valdes Cobos, A. (2013). Conservación y uso de plantas medicinales: el caso de la región de la Mixteca Alta Oaxaqueña, México. *Ambiente y Desarrollo*, 17(33), 87–99.
- Vallejo-zamudio, E., Rojas-velázquez, A., & Torres-bugarín, O. (2017). *Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes.* 104–111.

# APÉNDICE

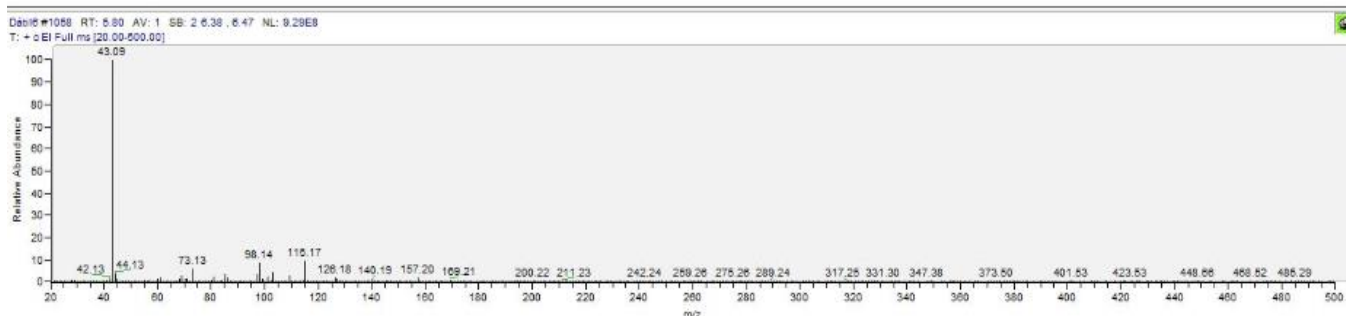
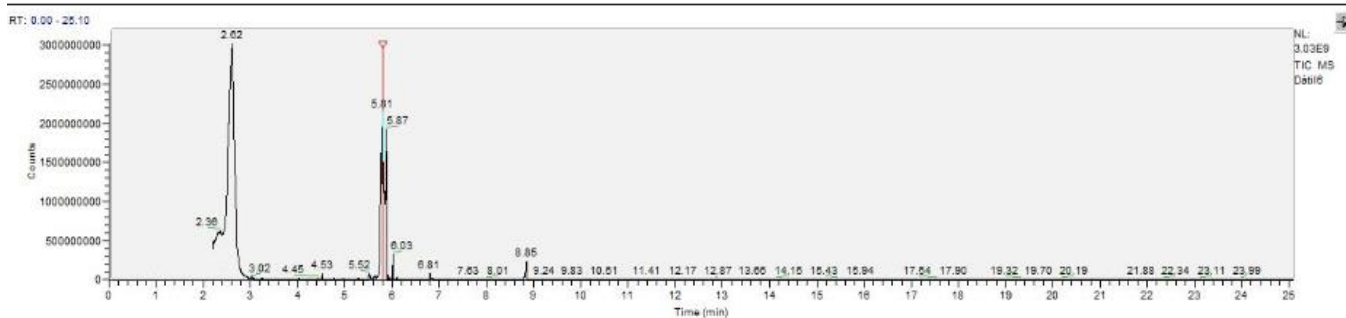
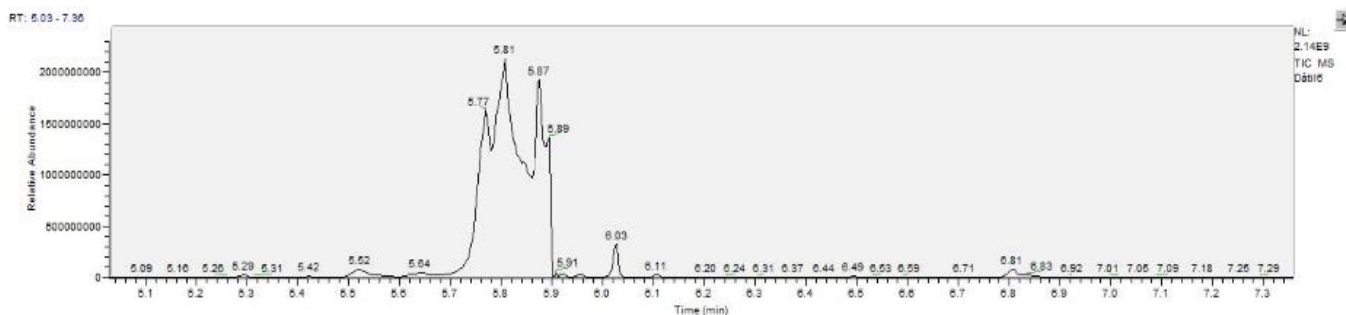
# ANEXO



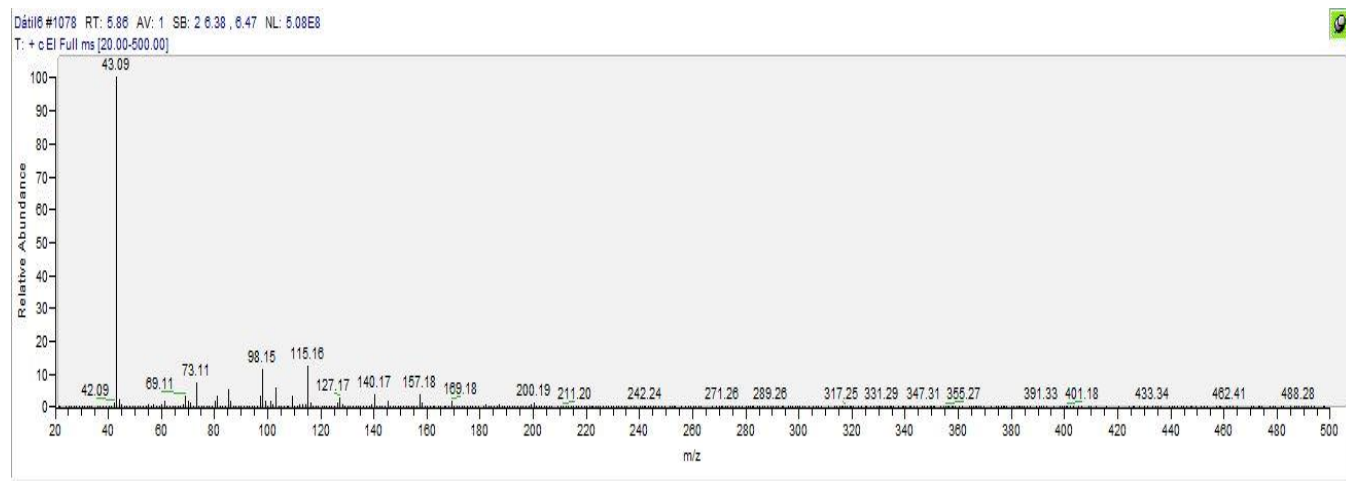
Anexo 1. Infrarrojo del extracto crudo de M1.



Anexo 2. Infrarrojo del extracto acetilado de M1.

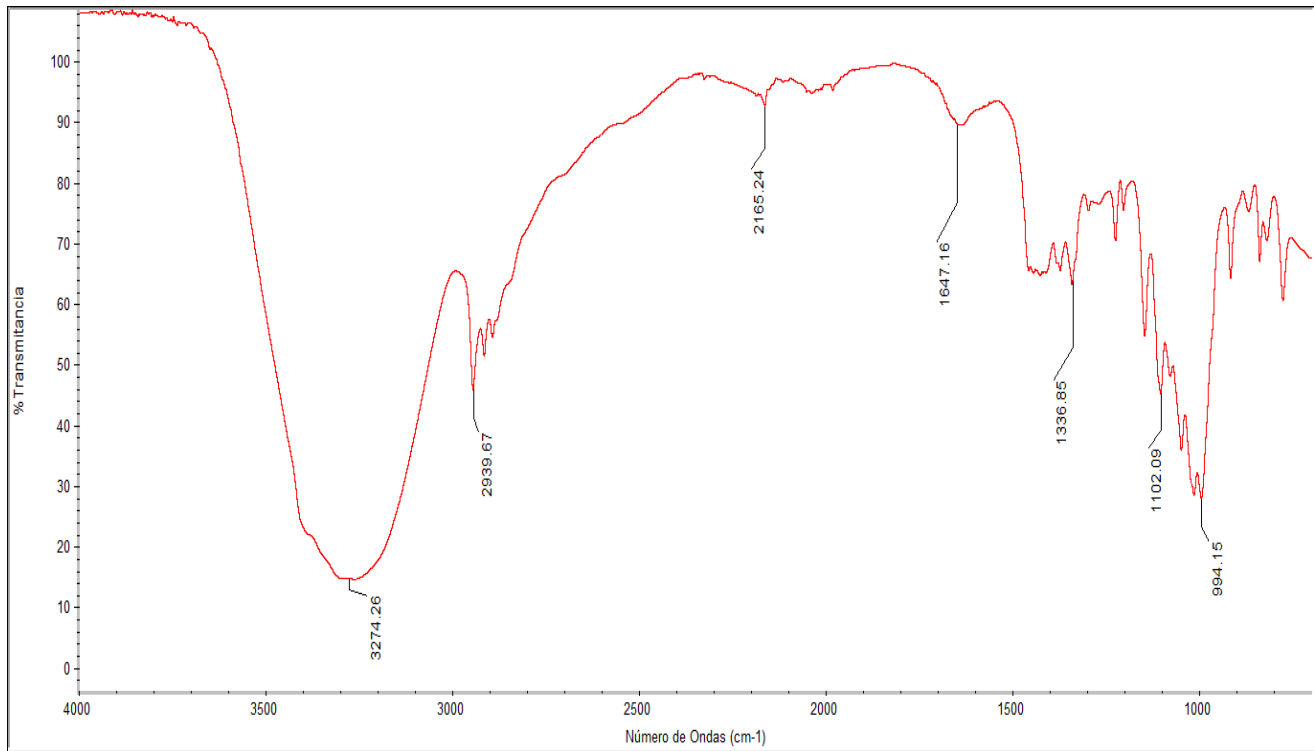


**Anexo 3.** Cromatograma de Gases y Espectro de Masas del extracto acetilado M1.

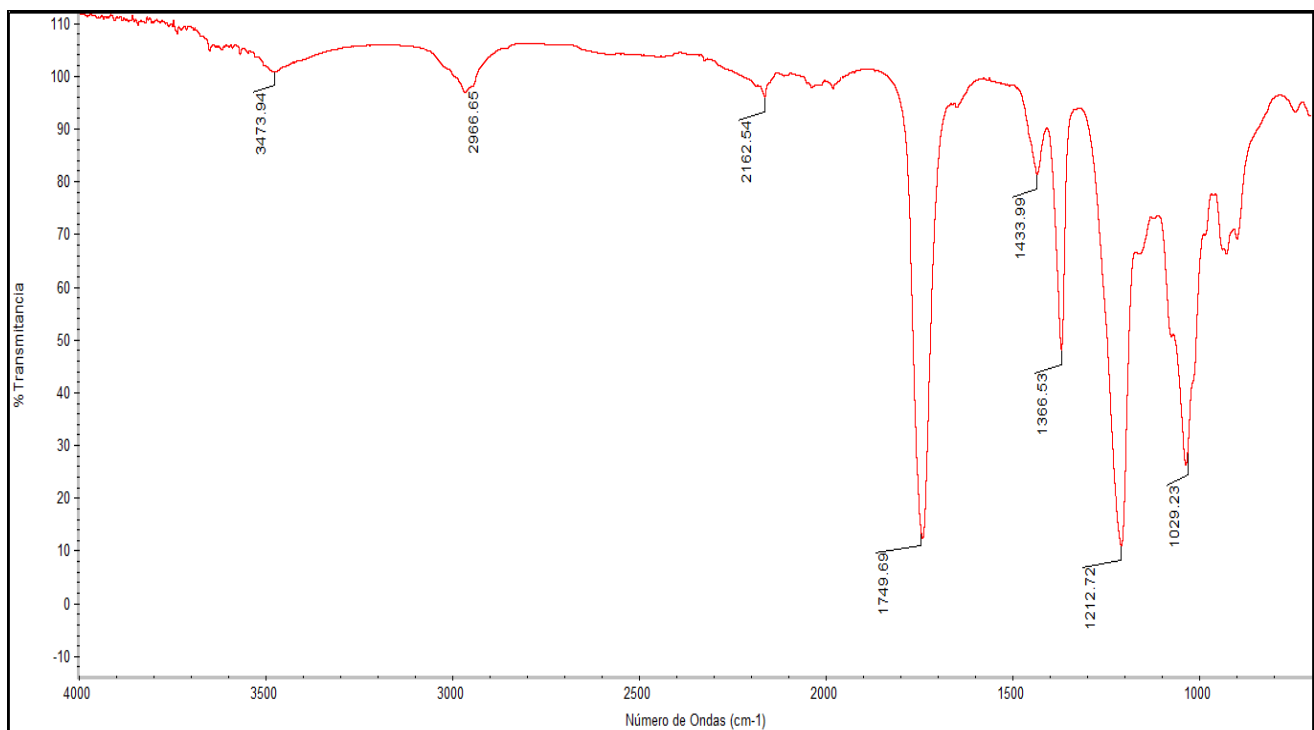


**Anexo 4.** Ejemplo espectro de masas de extracto acetilado M1 a tiempo 5.87 min.

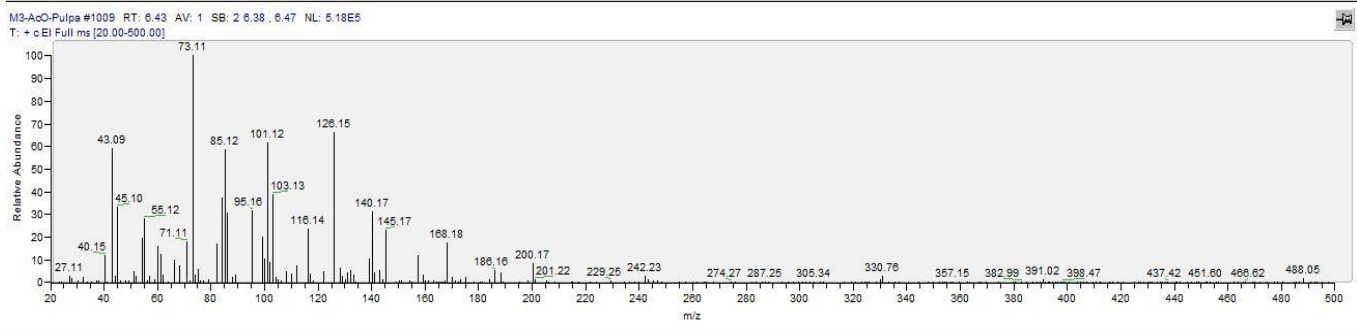
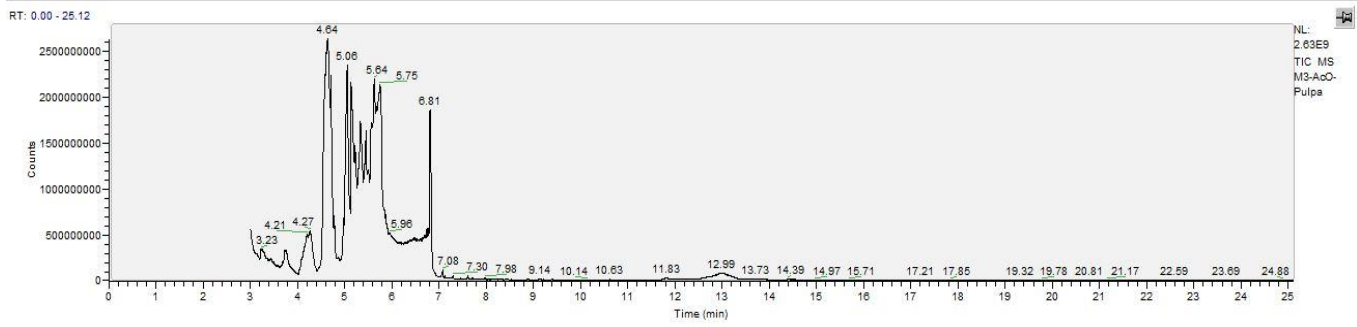
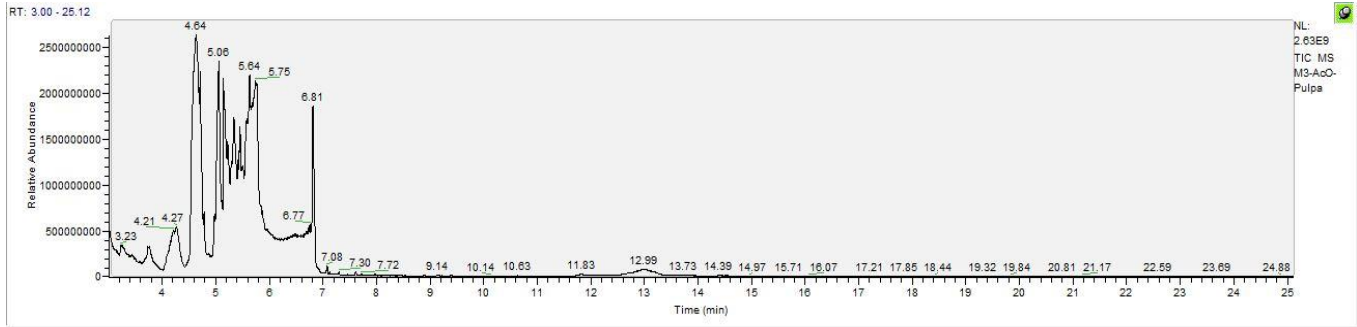
(Pico base 43 m/z representativo de la acetilación)



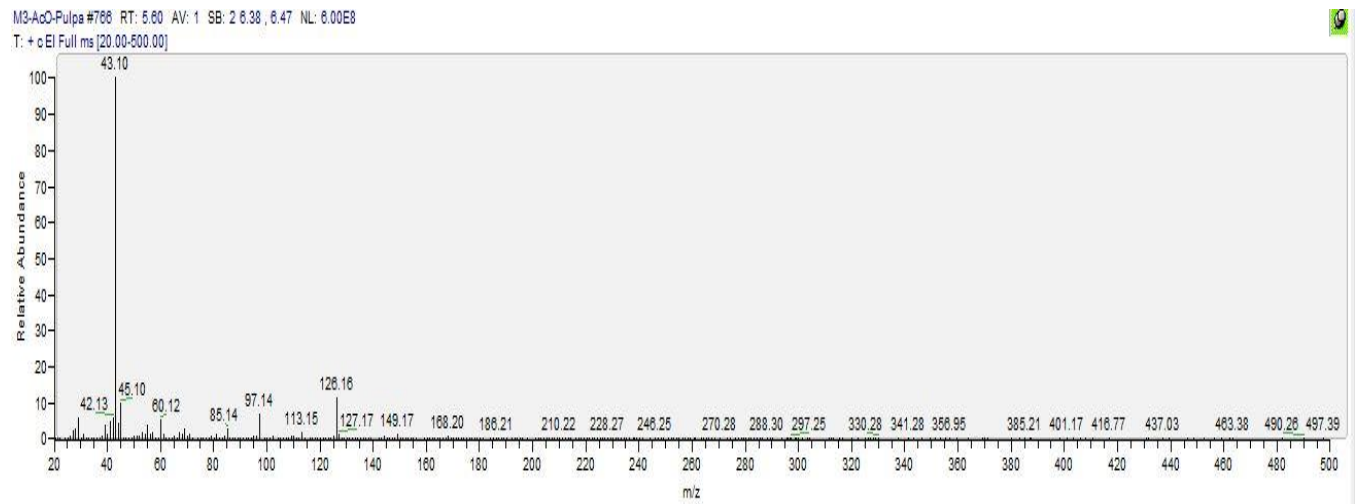
**Anexo 5.** Infrarrojo del extracto crudo de M3.



**Anexo 6.** Infrarrojo del extracto acetilado de M3.

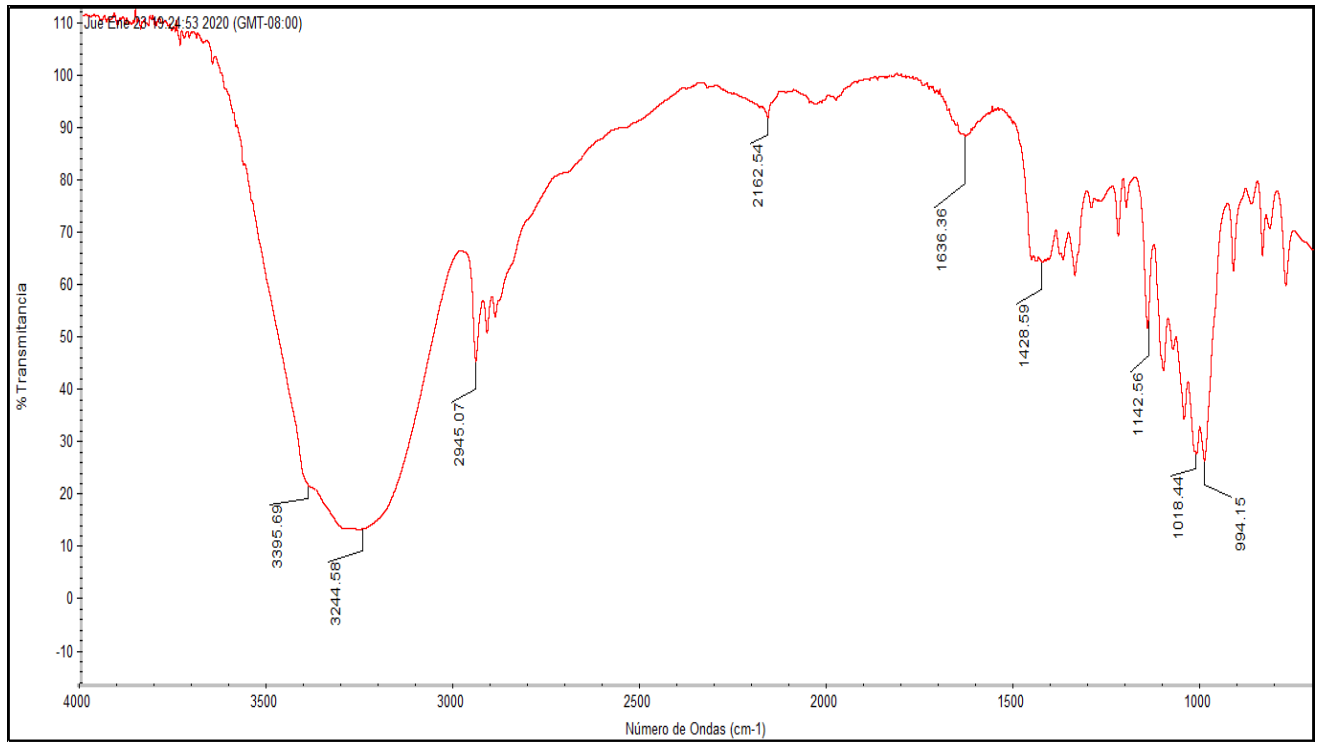


**Anexo 7.** Cromatograma de Gases y Espectro de Masas del extracto acetilado M3

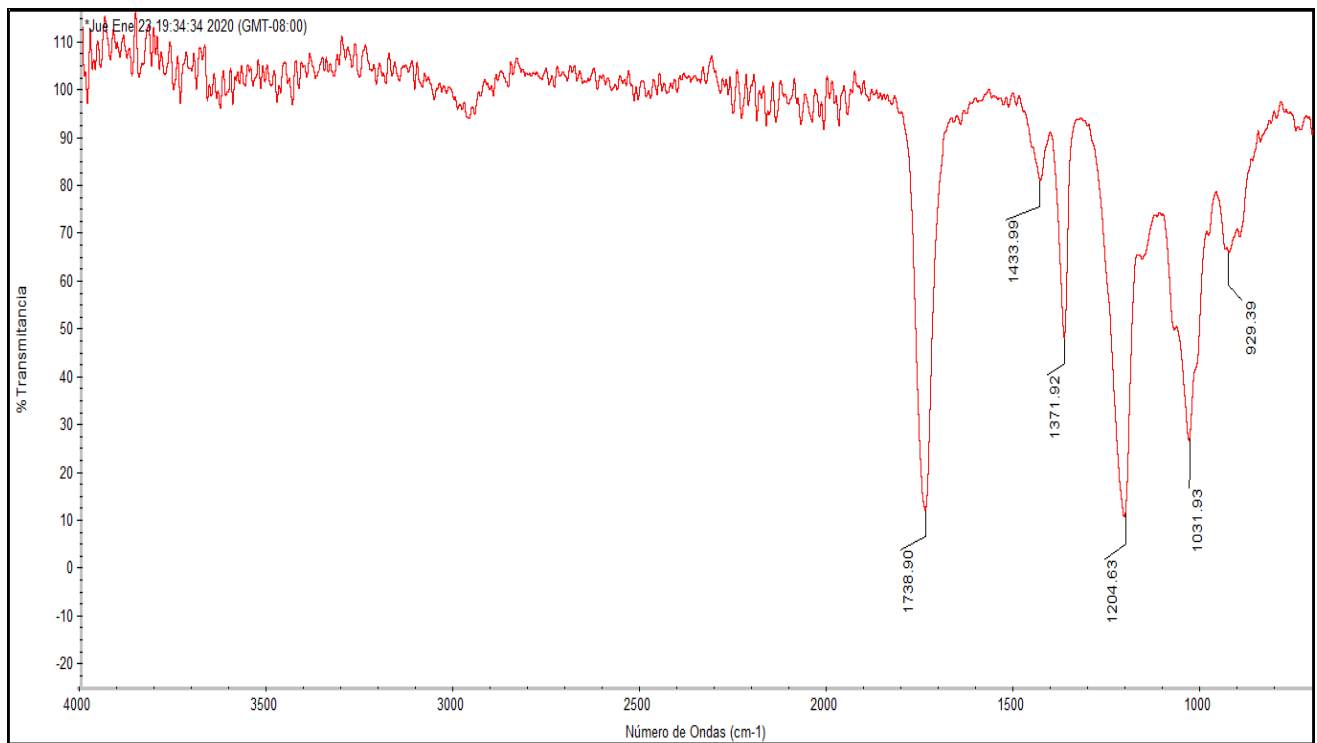


**Anexo 8.** Ejemplo espectro de masas de extracto acetilado M3 a tiempo 5.60 m/z

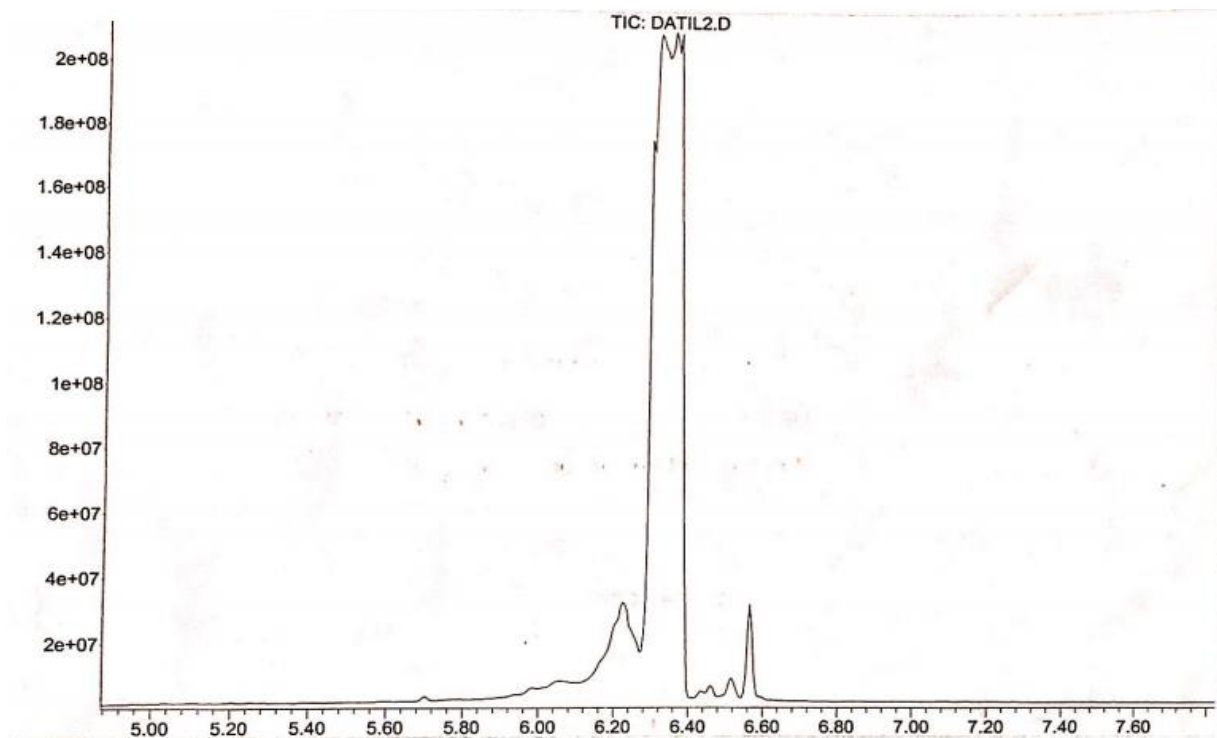
(Pico base 43 m/z representativo de la acetilación)



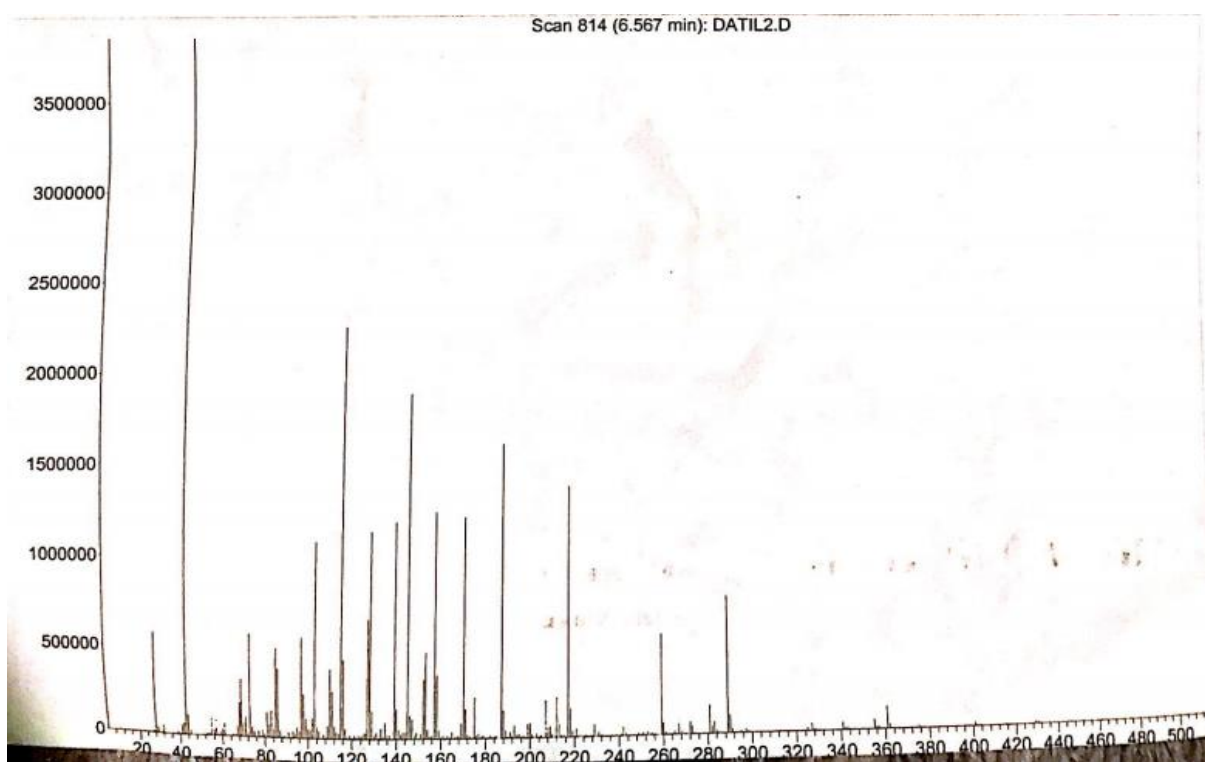
**Anexo 9.** Infrarrojo del extracto crudo de M5.



**Anexo 10.** Infrarrojo del extracto acetilado de M5.



**Anexo 11.** Cromatografo de Masas del extracto acetilado M5.



**Anexo 12.** Ejemplo espectro de masas de extracto acetilado M5 a tiempo 6.56 m/z.

(Pico base 43 m/z representativo de la acetilación)

# TÉCNICAS EXPERIMENTALES

### **Espectroscopia uv-vis**

Las mediciones de absorbancia de las pruebas antioxidantes se realizaron en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC, modelo Genesys 20, en celdas de cuarzo de 10 mm.

### **Espectroscopía de Infrarrojo**

Los espectros de Infrarrojo fueron realizados en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet is5. Los valores de transmitancia (u) están expresados en  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Espectrometría de Masas**

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

### **Técnica Cromatográfica: Cromatografía de Capa Fina**

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

### **Programas informáticos**

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

### **Técnicas experimentales: Condiciones de reacción**

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