



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE COMPUESTOS CON
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA RAÍZ DE *Iostephane heterophylla* (CAV.)
BENTH (ASTERACEAE)”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

DIANA VICTORIA NAVARRETE CARRIOLA

ASESOR

DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE

CO-ASESOR

DRA. MARÍA PAULINA AYDEE FUENTES BENITES

ASESOR EXTERNO

DRA. LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ



Toluca, Estado de México

Marzo 2019

ÍNDICE

NDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XIII
CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1 ANTECEDENTES DE <i>Iostephane heterophylla</i>.....	5
2.1.1 Generalidades.....	5
2.1.2 Morfología	5
2.1.3 Etnobotánica.....	6
2.1.4 Fitoquímica	7
2.2 COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS PLANTAS	9
2.2.1 Metabolitos secundarios.....	9
2.2.1.1 Fenoles	9
2.2.1.2 Flavonoides.....	10
2.2.1.3 Taninos	11
2.2.1.4 Terpenos.....	12
2.2.1.5 Alcaloides.....	13
2.2.1.6 Saponinas	14
2.2.1.7 Azúcares reductores	14
2.2.1.8 Glucósidos cionogénéticos y cardiotónicos	15
2.2.1.9 Cumarinas.....	16
2.2.1.10. Antroquinonas	16
2.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO	17
2.3.1 Aislamiento de metabolitos secundarios.....	18
2.3.1.1 Extracción con solventes.....	18
2.3.1.2 Ultrasonido.....	18
2.3.2 Caracterización de metabolitos secundarios	19

2.3.2.1. <i>Screening fitoquímico</i>	19
2.3.2.2. <i>Espectrofotometría</i>	20
2.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	20
2.4.1 Radicales libres	20
2.4.2 Estrés oxidativo	21
2.4.3 Antioxidantes	21
2.4.4 Importancia de los antioxidantes de las plantas para la salud	22
2.4.5 Determinación de la actividad antioxidante	23
2.4.5.1 <i>Medición de la actividad antioxidante</i>	23
CAPITULO III	27
JUSTIFICACIÓN	27
CAPITULO IV	29
HIPOTESIS	29
CAPITULO V	31
OBJETIVOS	31
CAPITULO VI	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	34
6.2 MATERIAL VEGETAL	35
6.2.1 <i>Colecta</i>	35
6.2.2 <i>Siembra</i>	35
6.2.3 <i>Desinfección de la raíz</i>	35
6.2.4 <i>Preparación de la muestra</i>	35
6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	36
6.3.1 <i>Extracción secuencial</i>	36
6.4 SCREENING FITOQUÍMICO	37
6.4.1 <i>Pruebas colorimétricas</i>	37
6.4.2 <i>Cromatografía en capa fina</i>	38
6.4.3 Cuantificación de metabolitos secundarios	40
6.4.3.1 <i>Flavonoides totales</i>	40
6.4.3.2 <i>Fenoles totales</i>	41
6.4.3.3 <i>Taninos condensados</i>	41
6.4.3.4 <i>Saponinas totales</i>	41

6.4.3.5 Azúcares reductores	42
6.4.3.6 Alcaloides.....	42
6.5 Determinación de la actividad antioxidante	43
6.5.1 Método DPPH.....	43
6.5.2 Método ABTS	43
6.6 Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD	44
CAPITULO VII.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
7.1 Determinación taxonómica	46
7.2 Obtención de extractos	46
7.3 Screening Fitoquímico	47
7.3.1 Pruebas colorimétricas	47
7.3.2 Análisis cromatográfico de los extractos	49
7.3.3 Cuantificación de metabolitos secundarios	53
7.3.3.1 Flavonoides.....	54
7.3.3.2 Fenoles totales.....	55
7.3.3.3 Taninos condensados	56
7.3.3.4 Saponinas	57
7.3.3.4 Azúcares reductores	57
7.3.3.5 Alcaloides totales	58
7.4 Determinación de la capacidad antioxidante	60
7.4.1 Método DPPH.....	60
7.4.2 Método ABTS	61
7.5 Análisis de los extractos por HPLC-DAD.....	62
CAPITULO VIII.....	65
CONCLUSIONES.....	65
CAPITULO IX.....	67
PERSPECTIVAS	67
CAPITULO X.....	69
REFERENCIAS	69
ANEXOS	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	7
Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT	23
Tabla 3. Pruebas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios en la raíz de <i>I. heterophylla</i>	37
Tabla 4. Reveladores para cromatografía en capa fina en la identificación de metabolitos secundarios en la raíz de <i>I. heterophylla</i>	39
Tabla 5. Rendimientos de extracción, empleando diferentes solventes, en las raíces de <i>I. heterophylla</i> de dos sitios de colecta.	47
Tabla 6. Análisis cualitativo de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso de raíz <i>I. heterophylla</i> de dos sitios de colecta	48
Tabla 7. Tiempos de retención obtenidos a través del perfil cromatográfico de los extractos de raíz de <i>I. heterophylla</i> y los estándares	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Iostephane heterophylla</i> (Cav.) Benth. (Asteraceae).....	6
Figura 2. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu	10
Figura 3. Esqueleto principal de los flavonoides	11
Figura 4. Estructura química de los taninos	12
Figura 5. Estructura química y clasificación de los terpenos	12
Figura 6. Estructura propuesta del complejo de verde de bromocresol–cinconina.	13
Figura 7. Estructura de los tipos de saponinas.....	14
Figura 8. Estructura general de una antraquinona, antrona, oxantrona, antrano y diantranol.....	17
Figura 9. Reacción del DPPH con el antioxidante.....	25
Figura 10. Estructura del ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante ...	26
Figura 11. Proceso de extracción de los compuestos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	36
Figura 12. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: Lieberman-Burchard.	50
Figura 13. Placas cromatográficas de los extractos; reveladores: A) Vainillina/H ₂ SO ₄ y B) p-anisaldehído.	51
Figura 14. Placas cromatográficas de los extractos; reveladores: A. AlCl ₃ y B. Reactivo citrobórico.....	51
Figura 15. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: Cloruro férrico.	52
Figura 16. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: KMnO ₄ 10%.	52
Figura 17. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	53
Figura 18. Contenido de flavonoides totales en los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	54
Figura 19. Contenido de fenoles totales en los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	55
Figura 20. Contenido de taninos condensados en los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	56
Figura 21. Contenido de saponinas totales en los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	57
Figura 22. Contenido de azúcares reductores en los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	58
Figura 23. Contenido de alcaloides totales en los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	59
Figura 24. Resultados de la capacidad antioxidante por el método DPPH de los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	60
Figura 25. Resultados de la Capacidad Antioxidante por el método ABTS de los extractos de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	61

ABREVIATURAS

ABTS: Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico

ACN: Acetonitrilo

AcOH: Ácido acético glacial

ADN: Acido desoxirribonucleico

AP: Extracto acuoso Puebla

AT: Extracto acuoso Timilpan

BCG: Verde de bromocresol

CH₂Cl₂: Diclorometano

CHCl₃: Cloroformo

DMII: Diabetes Mellitus tipo II

DP: Extracto diclorometánico Puebla

DPPH: 1,1-difeneil-2-picril-hidrazilo

DT: Extracto diclorometánico Timilpan

EA: Extracto acuoso

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EC: Equivalentes de catequina

EDiosg: Equivalentes de diosgenina

EGlu: Equivalentes de glucosa

EGram: Equivalentes de Gramina

EH: Extracto hexánico

EM: Extracto metanólico

EQ: Equivalentes de Quercetina

ES: Extracto seco

ET: Ensayos basados en la transferencia de electrones

FT: Fenoles totales

FVT: Flavonoides totales

H₂O: Agua

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HAT: Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno
HCl: Ácido clorhídrico
HCN: Ácido cianhídrico
HP: Extracto hexánico Puebla
HT: Extracto hexánico Timilpan
Hz: Hertz
KHz: Kilohertz
mL: mililitros
MP: Extracto metanólico Puebla
MT: Extracto metanólico Timilpan
msnm: metros sobre el nivel del mar
Na₂HPO₄: Fosfato dibásico de potasio
nm: nanómetros
RLO: Radicales libres de Oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
°C- Grados centígrados
μL: microlitros
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography)
DAD: Detector de arreglo de diodos (Diode Array Detector)

RESUMEN

Las enfermedades crónicas no transmisibles son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, siendo la diabetes tipo II (DM-II), una de las principales. Varias de estas patologías han sido relacionadas y vinculadas con el estrés oxidativo en los últimos 40 años.

La DM-II representa aproximadamente del 90 al 95% de todos los casos de diabetes mellitus; es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica debido a defectos o alteraciones en la secreción o bien la acción de insulina. Uno de los problemas secundarios más graves de esta enfermedad es la aparición de úlceras o heridas en los pies conocido como “pie diabético”, donde la amputación es el principal tratamiento quirúrgico, por lo que la población se ve forzada a buscar nuevas alternativas terapéuticas, entre ellas la medicina tradicional, basada principalmente en las plantas medicinales.

En este sentido, una especie que ha llamado la atención es la raíz de *I. heterophylla*, comúnmente conocida como liga o raíz del manso, esta especie se ha utilizado para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los cuales destaca el pie diabético, no obstante, no hay la información científica disponible para avalar su actividad terapéutica. Por ello en el presente trabajo se planteó como objetivo el extraer y caracterizar fitoquímicamente los extractos de esta raíz, con el propósito de relacionarlos con la capacidad antioxidante de la misma, dado que existen numerosos trabajos en los cuales la actividad antioxidante de un compuesto o planta se relaciona directamente con su actividad biológica, ya sea antimicrobiana y/o hipoglucemiante, entre otras.

En el presente trabajo se obtuvieron extractos de la raíz de *I. heterophylla*, utilizando los solventes hexano, diclorometano, metanol y agua. Los extractos obtenidos fueron analizados para establecer un perfil fitoquímico de los principales metabolitos secundarios contenidos en la raíz de la especie bajo estudio. Mediante una identificación química cualitativa para grupos funcionales específicos y cromatografía en capa fina, fue posible registrar en los extractos la presencia de fenoles, flavonoides, saponinas esteroideas y triterpénicas, taninos condensados, triterpenos, y glucósidos cardiotónicos en específico sesquiterpenlactonas y alcaloides.

Por otra parte, se realizó la cuantificación de los metabolitos con mayor presencia e importancia en los extractos, siendo estos los fenoles, flavonoides, taninos condensados, saponinas, azúcares reductores y alcaloides. Los resultados obtenidos indican que el mayor contenido de flavonoides fue encontrado en el extracto metanólico, conteniendo 188.81 ± 0.13 mg EQ/g de extracto, seguido del extracto acuoso, con 180.93 ± 0.04 mg EQ/g de extracto. En el caso de fenoles el extracto acuoso presentó la mayor cantidad con 443.24 ± 6.76 mgEAG/g de extracto. Para taninos condensados el extracto metanólico presentó el mayor contenido con 224.36 ± 5.36 mg EC/g de extracto. En el caso de las saponinas, el extracto hexánico presentó el mayor contenido con 480.61 ± 8.12 mgED/g de

extracto. En alcaloides y azúcares reductores el extracto metanólico presentó mayor cantidad con 10.12 ± 0.71 mgEGram/ g de extracto y 130.67 ± 2.00 mgEGlu/g de extracto respectivamente.

Así mismo, se efectuó una separación y análisis (UV-vis) para la identificación de compuestos fenólicos, el cual se realizó por cromatografía líquida de alta resolución, utilizándose un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Encontrándose la presencia de ácido clorogénico, ácido cafeico, hesperidina y epicatequina para el extracto metanólico y acuoso.

Dentro de este mismo contexto y dado que el principal objetivo del presente trabajo fue extraer compuestos con actividad antioxidante, se procedió a evaluar dicha actividad en los diferentes extractos obtenidos. Para tal fin se emplearon las técnicas de DPPH y ABTS.

El extracto que presentó mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH fue el metanólico con 93.31%, seguido de los extractos acuosos con un 90.93%, mientras que en el radical ABTS^{•+} se obtuvo un 99% de porcentaje de inhibición, tanto para los extractos metanólicos como acuosos, que comparados con otras raíces con el mismo uso etnobotánico, la raíz de *I. heterophylla* muestra mayor porcentaje de inhibición, por lo que muy probablemente su actividad farmacológica puede estar basada en buena medida en la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios que contiene, posicionando a esta especie como una fuente importante de compuestos antioxidantes naturales.

ABSTRACT

Chronic noncommunicable diseases are one of the main causes of mortality worldwide, being diabetes type II (DM-II), one of the main. Several of these pathologies have been related and linked to oxidative stress in the last 40 years.

DM-II represents approximately 90 to 95% of all cases of diabetes mellitus; is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia due to defects or alterations in the secretion or the action of insulin. One of the most serious secondary problems of this disease is the appearance of ulcers or sores on the feet known as "diabetic foot", where amputation is the main treatment, so the population is forced to seek new therapeutic alternatives, among they traditional medicine, based mainly on medicinal plants.

In this sense, a species that has attracted attention is the root of *I. heterophylla*, commonly known as the ligament or root of the meek, this species has been used for the treatment of various ailments, among which the diabetic foot stands out, nonetheless, there is no scientific information available to support your therapeutic activity. Therefore, in the present work the objective was to extract and characterize phytochemically the extracts of this root, with the purpose of relating them to the antioxidant capacity of the same, given that there are numerous works in which the antioxidant activity of a compound or plant It is directly related to its biological activity, whether it is antimicrobial and / or hypoglycaemic, among others

In the present work extracts of the root of *I. heterophylla* were obtained, using the solvents hexane, dichloromethane, methanol and water. The obtained extracts were analyzed to establish a phytochemical profile of the main secondary metabolites contained in the root of the species under study. By means of a qualitative chemical identification for specific functional groups and thin layer chromatography, it was possible to record in the extracts the presence of phenols, flavonoids, steroid and triterpene saponins, condensed tannins, triterpenes, and cardiotonic glycosides in specific sesquiterpenectones and alkaloids.

On the other hand, the quantification of the metabolites with greater presence and importance in the extracts was carried out, being these the phenols, flavonoids, condensed tannins, saponins, reducing sugars and alkaloids. The results obtained indicate that the highest flavonoid content was found in the methanolic extract, containing 188.81 ± 0.13 mg EQ / g of extract, followed by the aqueous extract, with 180.93 ± 0.04 mg EQ / g of extract. In the case of phenols, the aqueous extract showed the highest amount with 443.24 ± 6.76 mgEAG / g of extract. For condensed tannins the methanolic extract showed the highest content with 224.36 ± 5.36 mg EC / g of extract. In the case of saponins, the hexane extract showed the highest content with 480.61 ± 8.12 mgED / g of extract. In alkaloids and reducing sugars the methanolic extract showed a greater quantity with 10.12 ± 0.71 mgEGram / g of extract and 130.67 ± 2.00 mgEGlu / g of extract respectively

Likewise, an analysis and identification of phenolic compounds was carried out, which was done by high resolution liquid chromatography, using a diode array detector (HPLC-DAD). Found the presence of chlorogenic acid, caffeic acid, hesperidin and epicatechin for the methanolic and aqueous extract.

Within this same context and given that the main objective of this work was to extract compounds with antioxidant activity, we proceeded to evaluate this activity in the different extracts obtained. For this purpose, the DPPH and ABTS techniques were used.

The extract that reported the highest percentage of inhibition of the DPPH radical was methanolic with 93.31%, followed by aqueous extracts with 90.93%, while the radical ABTS^{•+} obtained a 99% percentage inhibition, both for methanolic extracts as aqueous, compared with other roots with the same ethnobotanical use, the root of *I. heterophylla* shows a greater percentage of inhibition, so that its pharmacological activity may very well be based in good measure on the antioxidant capacity of the secondary metabolites it contains, positioning this species as an important source of natural antioxidant compounds.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, entre ellas las patologías más importantes son la obesidad, diabetes tipo II, hiperlipidemia, envejecimiento prematuro, cataratas, carcinogénesis y aterosclerosis, las cuales en los últimos 40 años, han sido relacionadas con el estrés oxidativo (Hybertson et al., 2011; Rivera et al., 2011). Sin embargo, el acceso de los pacientes al sector salud en países como México, no está totalmente garantizado y a esto se suma al costo de los medicamentos para el tratamiento de enfermedades. Por lo que el uso de la medicina tradicional ha registrado un aumento a partir de 1990 en países desarrollados y subdesarrollados, lo que la posiciona como una importante alternativa para la eliminación de microorganismos potencialmente patógenos y para el tratamiento de enfermedades crónicas no trasmisibles (OMS, 2013).

En México las plantas medicinales han sido utilizadas desde la antigüedad hasta el día de hoy por nuestros grupos étnicos, y actualmente constituyen una de las manifestaciones del acervo cultural que nos legaron nuestros antepasados, a pesar de ser usadas como un alternativa terapéutica no se encuentra disponible la información científica que la valide, debido a que en la mayoría de los casos el conocimiento se transmite de generación en generación, existiendo así un vacío en el conocimiento exacto de la composición química de las plantas (Meyer et al., 1982).

Adicionalmente, existe un enorme interés por la conservación de la naturaleza y la búsqueda de una vida más natural combatiendo las principales enfermedades que aquejan a la población. Se ha estimulado la investigación de nuevos compuestos químicos con actividad biológica, siendo el reino vegetal una fuente importante de nuevos agentes farmacológicos, ya que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios. Por ello, el estudio y la investigación ayudan a comprender la bioquímica y fisiología de los organismos que los producen y su mejor aprovechamiento con fines farmacológicos (propiciando así que la caracterización e identificación se realice con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas, como técnicas cromatográficas, analíticas, etc.) (Willimason et al., 1996; Domínguez 1988).

El conocimiento de los constituyentes químicos presentes en las plantas que son consideradas medicinales, pero que se encuentran en regiones geográficamente distintas y con condiciones ambientales diferentes (altura, suelo, temperatura y nutrientes) es muy importante, ya que nos permite comparar los grupos fitoquímicos presentes que proveen la actividad antioxidante en sus extractos y tener bases para su validación científica (Avalos, 2014).

Tal es el caso de la raíz de *Iostephane heterophylla* que forma parte de las plantas medicinales más utilizadas dentro de la zona norte del Estado de México como tratamiento en primer instancia por una gran parte de la población que padece alteración clínica de origen neuropático inducida por la hiperglucemia (Pie diabético).

Por lo anterior, la finalidad del presente proyecto fue estudiar a las raíces de *I. heterophylla* siendo sometidas a un estudio fitoquímico para identificar sus compuestos con actividad

antioxidante, con el ánimo no sólo de sustentar su uso popular sino también encontrar posibles moléculas con potencial actividad farmacológica que puedan resolver parcialmente algunos de los problemas con que se enfrenta hoy la terapéutica.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE *Iostephane heterophylla*

2.1.1 Generalidades

La especie *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. (*Asteraceae*) es comúnmente conocida en su zona geográfica por los nombres comunes "escorcionera" o "manso" (incluyendo "hierba de manso" y "raíz de manso") éste último se aplicó a inicios del período colonial, aunque fue reconocido como morfológicamente diferente de la escorzonera europea utilizada en el tratamiento de picaduras de animales tóxicos (*Scorzonera hispanica* L.) (Hernández, 1959; Nuez y Hernández, 1994). Otros nombres comunes utilizados en una base más local son: "bauji" (Nayarit), "corsonera" (Sonora), "coyori" (Chihuahua), "cuauhtlotlanenci" (Hidalgo), "cuatlotlanenzi", "gentiana de país" (Michoacán), "hierba del oso" y "liga" (Estado de México), "tecpahtli", "tlacopatli" (Jalisco), "tlalpopolote" y "zacapal" (Morelos) (Martínez, 1989, Villavicencio, 1995).

I. heterophylla es una hierba perenne de los bosques de pino-roble y roble de las montañas (1.500 a 3.000 msnm) en el centro y norte de México, desde el norte en Chihuahua al sur en Oaxaca. De las cuatro especies del género *Iostephane* restringidas en México, este taxón tiene la distribución biogeográfica más amplia, mientras que los otros taxones están limitados a regiones más pequeñas de la Sierra Madre Occidental o a las montañas de Oaxaca y Chiapas. Perteneciente a la tribu *Heliantheae* y a la familia de las *Asteraceae*, es bien conocida en la medicina tradicional mexicana. Está asociada a matorrales xerófilos, bosques de encino y de pino (Mendoza, 2009).

2.1.2 Morfología

La subscapiforme hierba perenne (Fig.1) tiene una raíz central en forma de un huso que crece a más de 45 cm de longitud y hasta 8 cm de ancho, y está cubierta por cantos corrugados longitudinales. La raíz da lugar al caudex erguido y arbolado, de 2 a 7 cm de largo, desde donde crece la roseta basal de las hojas. Las hojas alternas miden hasta 40 cm de largo y 15 cm de ancho, son lineales-lanceoladas a ovadas en su forma, algunas ampliamente lobuladas, cubiertas con pubescencia estriada y con pecíolos ligeramente alados. Florecen de 5 m a 15 dm de altura, y por lo general tiene una sola cabeza individual (aunque se pueden encontrar hasta cinco cabezas adicionales en algunas hierbas). La inflorescencia tiene de 2 a 3 filarios seriados, 15 a más flores de disco amarillo (algunas veces con lóbulos púrpuras) y 8 a 21 flujos de rayos uniseriados con lígulas de color blanco a rosado de hasta 5 cm de largo y 15 mm de ancho (Mendoza, 2009).



Figura 1. *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. (Asteraceae)

Fuente: Propia

2.1.3 Etnobotánica

La raíz, fresca o seca, suele usarse con motivos medicinales en todo México para aliviar el dolor de espalda y de los riñones, el cataplasma se aplica tópicamente al sitio del dolor. Una aplicación generalizada promueve la cicatrización de heridas en la piel y en llagas; el cataplasma de la raíz fresca es usado como tópico, mientras que la raíz en polvo o la raíz quemada es esparcida sobre el área afectada y vendada. Además es utilizada para aliviar reumatismo y artritis por frotación de una tintura alcohólica o el extracto acuoso en las articulaciones. En el centro de México, la decocción de 20 g por cada 1.50 litros de agua de *I. heterophylla* se bebe diariamente para tratar la diabetes, desordenes gastrointestinales y padecimientos de hígado y finalmente para la esterilidad como componente del complejo cachana (Aguilar *et al.*, 1993).

Por otro lado la raíz seca con el cuachalalate, el árnica, la yerba mora y la sircua constituyen los ingredientes del té "úlceros" el cual es popular en la ciudad de Chihuahua para curar úlceras estomacales (Bye, 1986); otros usos locales en Morelos incluyen el tratamiento de los baños post-parto en el "temascal" (baños indígenas mexicanos). A su vez, la gangrena fue curada usando polvo de la raíz tostada. En cambio en la zona norte del Estado de México es utilizado para realizar lavados y cataplasmas a las úlceras propiciadas por el pie diabético (Martínez, 1989).

Esta especie (reportada por el nombre de Náhuatl "*chipaoacític*" o "hierba contraria a los venenos") ha sido identificada en el periodo Colonial mexicano como un tratamiento efectivo para las heridas, mordeduras y dolores, las cuales se tratan con el cataplasma o

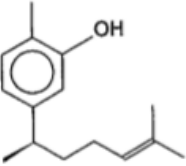
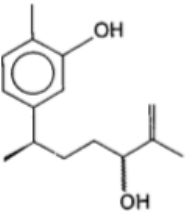
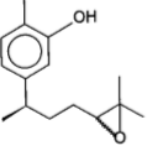
decocciones de las raíces (Valdés y Flores, 1985). Normalmente la raíz se recoge de las poblaciones silvestres durante la estación seca después de que las hojas y los escapes se hayan marchitado y antes del rebrote.

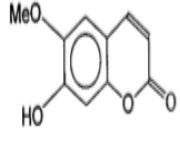
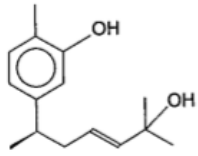
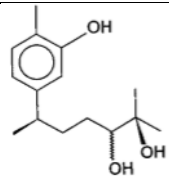
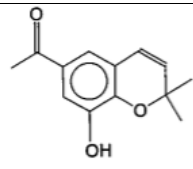
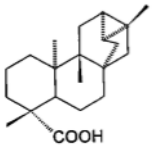
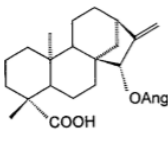
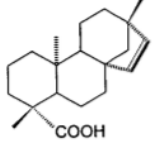
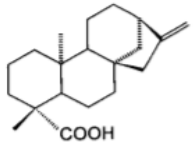
También se informan algunos usos no medicinales por ejemplo en el centro de México, las raíces frescas destilan una sustancia parecida a la resina, de color marrón rojizo, que los cazadores de aves aplican a las ramas arbóreas cerca de los agujeros para atrapar a los pequeños pájaros cantores que más tarde se venden en las ciudades. Los indios tarahumara de Chihuahua usan la raíz como fuente de tinte vegetal para lana y pieles curtidas (Aguilar *et al.*, 1993).

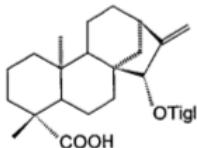
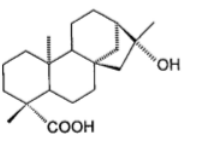
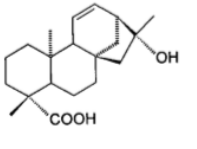
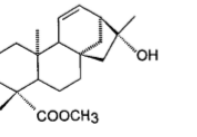
2.1.4 Fitoquímica

Los estudios químicos de las raíces de *I. heterophylla* han identificado sesquiterpenos, diterpenos, cumarinas, glucósidos y cromenos como los principales constituyentes (Tabla 1). Algunos de estos metabolitos mostraron diversas acciones biológicas. El ácido diterpeno traquio- banoico mostró una actividad antimicrobiana marginal frente a dermatofitos tales como *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum* y la levadura *Candida albicans* (Aguilar *et al.* 2001). Este mismo compuesto mostró actividad citotóxica contra células UISO-SQC-1. Además, el sesquiterpénico xanthorizol mostró un efecto citotóxico marginal frente a las células KB (Aguilar *et al.* 2001) y este último compuesto, así como el ácido traqueibanoico y el glicósido de dihidroxi-xanthorizol inhibieron la contracción inducida por tonicidad del útero de rata (Ponce-Monter *et al.* 1999). El propio xanthorizol induce la relajación independiente del endotelio de la aorta torácica de rata.

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de la raíz de *I. heterophylla*

NOMBRE	ESTRUCTURA	REFERENCIA
Xanthorizol		Aguilar <i>et al.</i> , (1993)
12,13-dihidro-12-hidroxi-13-en-xanthorizol		Aguilar <i>et al.</i> , (1993)
12,13-dihidro-12,13-epoxi-xanthorizol		Aguilar <i>et al.</i> , (2000)

Escopoletina		Aguilar <i>et al.</i> , (1993)
12,13-dihidro-13-hidroxi-11-en-xantorrizol		Aguilar <i>et al.</i> , (1993)
12,13-dihidro-12,13-dihidroxi-xantorrizol		Aguilar <i>et al.</i> , (2000) Bohlman <i>et al.</i> , (1977)
8-hidroxi-6-acetil-2, 2-dimetil-cromeno		Aguilar <i>et al.</i> , (1995)
Ácido traquiloban-19-oico		Aguilar <i>et al.</i> , (1993) Herz <i>et al.</i> , (1983) Bohlman <i>et al.</i> , (1977) Pyreck <i>et al.</i> , (1970)
Ácido 15 α -angelolloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico		Aguilar <i>et al.</i> , (1993) Herz <i>et al.</i> , (1983) Bohlman <i>et al.</i> , (1977)
Ácido <i>ent</i> -beyer-15-en 19-oico		Oberti <i>et al.</i> , (1980) Henrick <i>et al.</i> , (1964)
Ácido <i>ent</i> -kaur-16-en 19-oico		Aguilar <i>et al.</i> , (1993)

Ac. 15 α -tigloiloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico		Aguilar <i>et al.</i> , (1993) Herz <i>et al.</i> , (1983) Bohlman <i>et al.</i> , (1977)
16 α hidroxí-ent-kaurano		Herz <i>et al.</i> , (1983)
Ácido 16 α hidroxí-ent-kaur-11-en-19-oico		Ohno <i>et al.</i> , (1981) Aguilar <i>et al.</i> , (1993) Herz <i>et al.</i> , (1983)
Ester metílico del ácido 16 α hidroxí-ent-kaur-11-en-19-oico		Aguilar <i>et al.</i> , (1993) Herz <i>et al.</i> , (1983)

2.2 COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS PLANTAS

Las plantas medicinales se componen en su gran mayoría de metabolitos secundarios llamados también principios activos, los cuales a través del metabolismo secundario se sintetizan, estos principios activos se definen como “sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal” (Pengelly, 1996).

Al paso de los años la investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los terpenos, saponinas, fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos, quinonas, alcaloides, entre otros, que son aislados y caracterizados en los extractos vegetales crudos que “son mezclas complejas que están constituidas por cientos de estos compuestos” (Bruneton, 1991).

2.2.1 Metabolitos secundarios

2.2.1.1 Fenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo amplio de sustancias químicas, con estructuras, propiedades químicas y actividad biológica diferente, englobando más de 8,000 compuestos distintos (Martínez *et al.*, 2000).

Gran parte de los compuestos fenólicos que se encuentran en la naturaleza poseen cierta actividad biológica o farmacológica. La función de estos compuestos en las plantas es diverso, se encuentran como precursores de compuestos de mayor complejidad o interviniendo en procesos de regulación y control del crecimiento de las plantas además de servir como medio defensivo de las mismas. A su vez se ha demostrado que los componentes fenólicos son los principales antioxidantes derivados de plantas. La actividad química de estos compuestos se ha comprobado en estudios de modelos *in vitro* para inhibir la oxidación (Barrera et al., 2004).

El método usado comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos es el que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Los cuales son cromógenos de color azul intenso como resultado de la reacción (Fig. 2), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen, 1985).

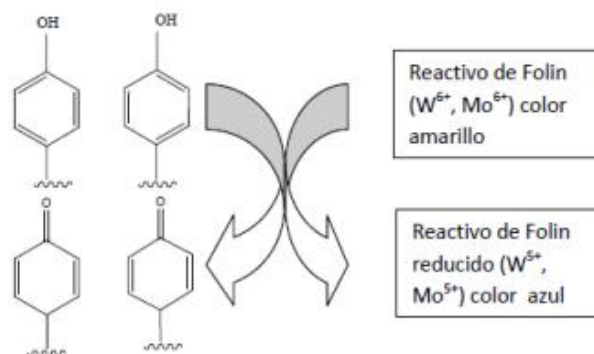


Figura 2. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Llenera, 2011)

2.2.1.2. Flavonoides

Son compuestos polifenólicos con una estructura química de quince carbonos, con dos anillos aromáticos y pueden presentar numerosos sustituyentes en su esqueleto (Fig. 3), los tipos de flavonoides están relacionados por una ruta biosintética común, la que incorpora precursores de las rutas del shiquimato y la acetato-malonato. Posteriores modificaciones ocurren en varios estados, lo que resulta en la extensión de la hidroxilación, metilación, isoprenilación, dimerización y glicosilación, produciendo O y C-glicósidos (Lock et al., 2006)

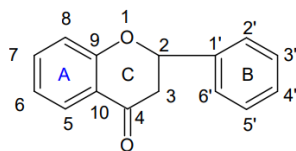


Figura 3. Esqueleto principal de los flavonoides (Lock et al., 2006)

Por lo tanto un componente muy común en los flavonoides son carbohidratos que se les encuentra naturalmente como glucósidos, tanto los azúcares como los grupos hidroxilo aumentan la solubilidad de los flavonoides, en cambio, otros sustituyentes, como los grupos metilos y los isopentilos, causan que los flavonoides sean lipófilos (Crozier et al., 2008). Además poseen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante, a su vez se les han atribuido efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, entre otros (Lock et al., 2006).

Generalmente se puede realizar métodos de identificación cualitativos como: ensayo de Shinoda, ensayo con Zn/HCl (Lock et al., 2006). Y para la cuantificación de flavonoides totales se emplea el método reportado por Pekal et al. (2013), que se basa en la reacción formada por los iones de aluminio con las estructuras generales de flavonoides formando un complejo de coloración amarilla, esta reacción se lleva a cabo en dos etapas. 1. Los grupos hidroxilo del anillo B de los flavonoides en las posiciones C2' y C3' en presencia de H₂O, MeOH y acetato sufren una oxidación convirtiéndose en carbonilos. 2. La presencia de AlCl₃ promueve cambios en el anillo B en C5' y el aluminio se coordina con oxígeno del C4' y el carbonilo de C3'.

2.2.1.3. Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios polifenólicos de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada y con sabor astringente. Pueden encontrarse en todas las partes de la planta, por ejemplo en tallos, madera, hojas, semillas y cúpulas. Los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas u otros (Khanbabaee y Ree, 2002).

Los taninos, de acuerdo a Khanbabaee y Ree (2002) se puede clasificar de la siguiente forma:

- **Taninos Hidrolizables:** Se hidrolizan por la acción de los ácidos, bases o enzimas en un azúcar un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del ácido utilizado se produce una subclasificación, los galotaninos (ácido gálico) y elagitaninos (ácido elágico) (Fig. 4). Se conoce que no precipitan con soluciones de bromo y que al reaccionar con FeCl₃ dan una coloración azul.
- **Taninos Condensados:** Los Taninos condensados, son derivados de unidades de flavan 3,4- dioles, conocidos como proantocianidinas condensadas (Fig. 4), al ser tratados con ácidos a temperaturas altas se origina una polimerización progresiva

hasta dar taninos amorfos o taninos rojos. Al reaccionar con FeCl_3 se produce una coloración verde y precipita con soluciones de bromo.

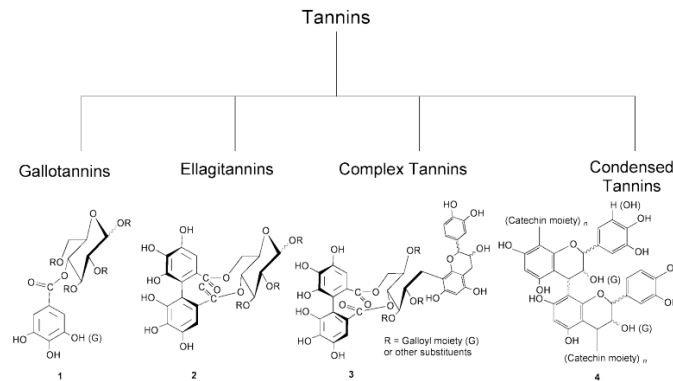


Figura 4. Estructura química de los taninos (Khanbabaee y Ree, 2002)

Dentro de las propiedades farmacológicas reportadas de los taninos se destaca su propiedad astringente, actúan como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad debido al efecto antiséptico, se les atribuye propiedades vasoconstrictoras, además es conocida la propiedad antioxidante, comportándose como captadores de radicales libres (Carretero, 2000).

2.2.1.4. Terpenos

Son la clase más común de compuestos químicos que se encuentran en los aceites esenciales, están formados de unidades de isopreno; dos unidades de isopreno combinadas se denomina terpeno, se clasifican de acuerdo con el número de unidades de isopreno: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpeno, triterpenos y tetraterpenos (Fig. 5) (Cuevas et al., 2016).

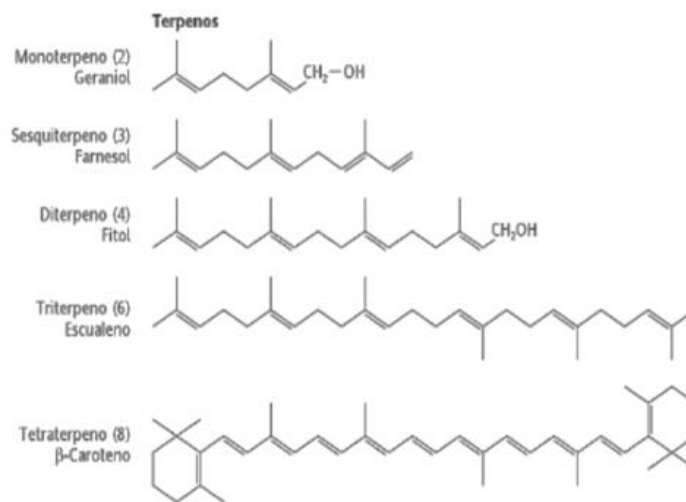


Figura 5. Estructura química y clasificación de los terpenos (Cuevas et al., 2016).

Los terpenos naturales se encuentran en plantas y animales en cantidades diminutas; se les puede encontrar en raíces, rizomas, tallos, hojas, flores, frutos y semillas, estos desempeñan un papel importante como reguladores del crecimiento de las plantas (Breitmaier, 2006).

2.2.1.5. Alcaloides

Alcaloide proviene de la palabra “álcali” que significa “base”. Son bases orgánicas que contienen uno o más nitrógenos y que pueden estar como una amina o amida, los nitrógenos pueden conformar grupos funcionales distintos en la misma molécula y generalmente provienen de los aminoácidos, teniendo un intervalo de sus pesos moleculares entre los 100-900 g/mol (Arango, 2008). La mayoría son incoloros, sólidos cristalinos, ópticamente activos, levorrotarios con excepción de la cinchonina y la laudanosina (Shamsa et al., 2008), estos se encuentran presentes en todas las partes de la planta (hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces), tienen un papel defensivo contra patógenos (Farrán et al., 2017). Debido a su gran actividad biológica, han sido usados como productos farmacéuticos, narcóticos y pociones (Crozier et al, 2008).

Para el estudio de éstos, se realizan pruebas cuali-cuantitativas, las técnicas cualitativas más empleadas se basan en la capacidad que los alcaloides tienen para formar sales; al combinarse con el yodo y los metales pesados se forman precipitados. Los reactivos más comunes para detectarlos son: Dragendorff, Mayer y Wagner (Arango, 2008).

Para la cuantificación se utiliza el método reportado por Shamsa y et al. (2008), que consiste en la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol (Fig. 6) a un pH 4.7, que absorbe a 470 nm. Este método es sencillo, rápido, sensible, requiere de un espectrofotómetro de UV-Vis, el complejo obtenido es muy estable y es nula o escasa la interferencia por otros compuestos.

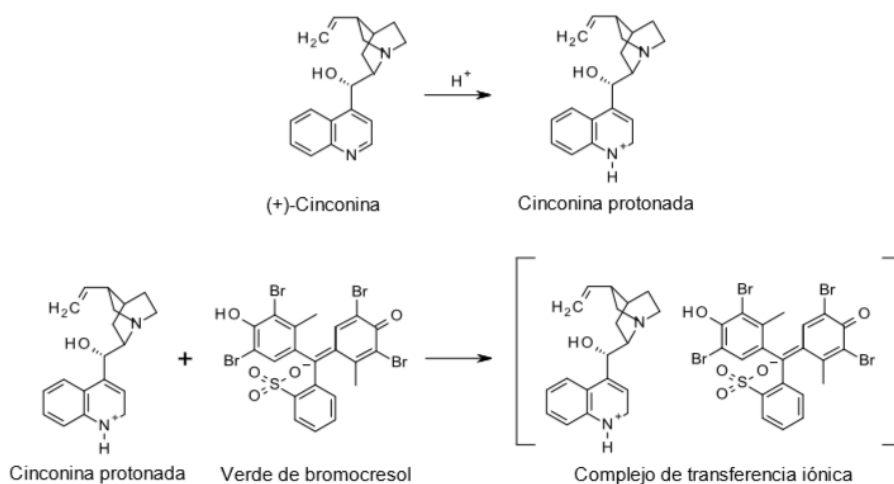


Figura 6. Estructura propuesta del complejo de verde de bromocresol–cinchonina (Rajendraprasad et al., 2010).

2.2.1.6 Saponinas

Su nombre proviene de la palabra latina “sapo” que significa “jabón”, esto debido a que han sido utilizados como jabones durante muchos años, son glucósidos de alto peso molecular, su estructura consiste en un azúcar unido a un triterpeno o a una aglicona esteroide (Fig. 7) (Hostettmann y Marston, 2005).

La definición clásica de saponinas se basa en su actividad ya que muchas tienen propiedades detergentes, tienen actividad hemolítica, con sabor amargo; sin embargo estas características no son comunes en todas las saponinas (Hostettmann y Marston, 2005). Las saponinas han sido utilizadas en muchos medicamentos y medicina ancestral, especialmente en el continente Asiático, por tal motivo existe gran interés para realizar investigación de sus propiedades farmacológicas y biológicas (Hostettmann y Marston, 2005).

En su estructura tienen en común la unión de una o más cadenas de azúcar al aglicón, existen tres tipos de saponinas: glucósidos triterpénicos, glucósidos esteroideos y glucósidos alcaloides esteroideos; las saponinas monodesmosídicas tienen una sola cadena de azúcar, las bidesmosídicas tienen dos cadenas de azúcar y las tridesmosídicas tienen tres cadenas de azúcar (Hostettmann y Marston, 2005).

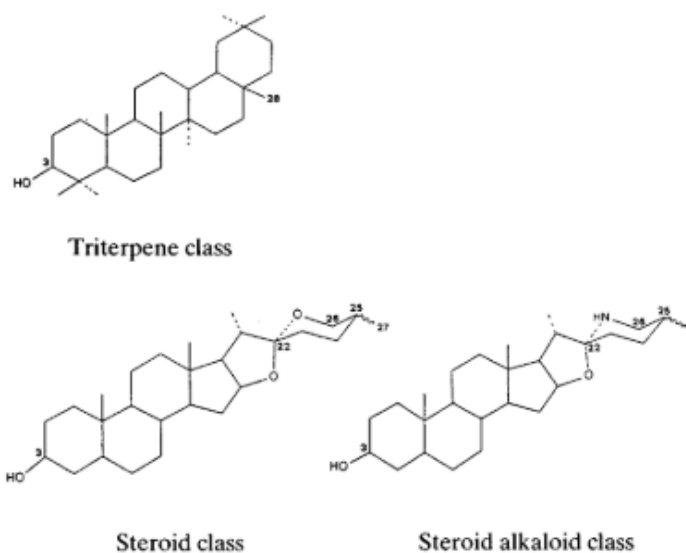


Figura 7. Estructura de los tipos de saponinas (Hostettmann y Marston, 2005).

2.2.1.7. Azúcares reductores

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas (Hernández, 1997)

Se pueden cuantificar usando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como producto de la reacción se forma un complejo amarillo (3-amino-5-nitrosalicílico) que se cuantifica por espectrofotometría de absorción. El método es selectivo porque el DNS reacciona únicamente con azúcares reductores. Dado que la estructura de las saponinas está constituida por una aglucona (sapogenina) y una o varias cadenas de azúcares, en este método la saponina se hidroliza para separar la parte glucona (compuesta por azúcares simples de 1 a 5 unidades) de la sapogenina. Estos azúcares simples no pueden ser hidrolizados a moléculas más pequeñas y pueden reaccionar como reductores con otras moléculas (Hernández, 1997).

2.2.1.8. Glucósidos cianogénicos y cardiotónicos

Los glucósidos cianogénicos (GC) estructuralmente están formados por un azúcar, un grupo ciano y un derivado carbonílico (aldehído o cetona). Casi todas las sustancias cianógenas son cianohidrinadas unidas a un azúcar cuya hidrólisis enzimática libera un cianuro; este proceso también se conoce como cianogénesis (Ringuelet y Viña, 2013).

La cianogénesis está considerada como un mecanismo de protección de la planta contra depredadores e inclusive herbívoros (Ilza y Pinotti, 2000). Estos principios activos tienen la capacidad de almacenar nitrógeno reducido y azúcar, utilizado en su metabolismo primario cuando sea exigido (Zagrobely et al., 2008).

La mayor parte de la cianogénesis se lleva a cabo por la hidrólisis de la β -glucosidasa, dando lugar a la producción de azúcares y una cianhidrina que se degrada fácilmente a HCN con una cetona u aldehído (Serratos et al., 2008). La toxicidad de los glucósidos cianogénicos se debe a la producción de HCN, desencadenando procesos de intoxicación por cianuro y de varias enfermedades crónicas (Cressey et al., 2013). Este HCN es altamente fitotóxico y alelopático, inhibe la respiración celular en plantas y animales e interfiere en otros procesos íntimamente relacionados con el crecimiento (Gonzalez y Sotomayor, 2005).

Los glucósidos cianogénicos se clasifican en cuatro grupos en función de la estructura química de la aglicona: 1) glucósidos derivados de la 2-hidroxi-2-fenilalanina o derivados de ésta. Se trata de compuestos que tienen sustituyentes o grupos hidroxilo o alquilo en el anillo aromático, como es el caso de la amigdalina. 2) glucósidos derivados de las agliconas alifáticas saturadas. 3) glucósidos con la aglicona que contiene un doble enlace en posición alfa o beta al grupo nitrilo. 4) glucósidos con la aglicona alicíclica insaturada, como por ejemplo la ginocardina (Valladolid, 2014).

Se conocen aproximadamente 25 glucósidos cianogénicos diferentes, de los cuales la amigdalina, la durrina, la linamarina, la lotaustralina, la prunasina y la taxifilina son los de mayor importancia en las plantas comestibles (Quiroga y Olmos, 2009)

Los cardioglucósidos, también llamados glucósidos cardiotónicos, son sustancias de gran importancia en la regulación de la actividad cardíaca (en dosis ínfimas); ejemplo de los glucósidos de la *Digitalis purpurea*. Debido a su estructura química, se dividen en

cardenólidos (*Digitalis purpurea*, *Adonis vernalis*, *Convallaria majalis*) y butadienoles (raíz del eléboro).

Medicinalmente, los cardioglucósidos son unas sustancias espectaculares en cuanto a su eficacia en variadas afecciones cardíacas, en muchos casos son incluso insustituibles. Poseen acción tónica y fortalecedora del corazón, es decir, aumentan su fuerza contráctil y regulan su ritmo. Deben administrarse siempre bajo estricto control médico, ya que es necesario dosificarlos adecuadamente (Valladolid, 2014).

2.2.1.9. Cumarinas

Las Cumarinas son lactonas insaturadas, cuyo heteroátomo es el oxígeno, son otra clase de compuestos orgánicos del tipo C_6C_3 , cuyo heteronúcleo se denomina benzo 2-pirona o benzo α -pirona y su formación es clave en la síntesis de ciclación de toda cumarina. Las cumarinas pertenecen al grupo de los metabolitos secundarios sintetizados por la acción del ácido shikímico mediante el metabolito intermedio de la función metabólica del ácido (Herrera et al.,2017).

Presentan un espectro UV característico, influido fuertemente por la naturaleza y posición de los sustituyentes, que se modifica profundamente en medio alcalino. A la luz ultravioleta, las cumarinas presentan fluorescencia variable, de azul a amarillo y a púrpura, exaltada en presencia de amoníaco, en general son sustancias fluorescentes, comunmente fotosensibles. La mayoría de las cumarinas conocidas, se encuentran libres en las plantas y con frecuencia en cualquiera de los órganos vegetales, desde raíces hasta flores y frutos (Herrera et al.,2017).

Debido a la gran variedad estructural de estas moléculas son muchas las propiedades farmacológicas asociadas a dicho anillo, entre ellas la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antiespasmódica, antiviral, antihelmíntica, antioxidante, o inhibidoras enzimáticas. Hay que destacar también las aplicaciones de las cumarinas que actúan como saborizantes, aromatizante, aditivos alimentarios y en perfumería (Herrera et al,2017).

2.2.1.10. Antroquinonas

Las quinonas están formadas por dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en fenoles. De todos los compuestos que presentan una estructura quinónica destacan las benzoquinonas (estructura derivada del benceno con un poco de interés en farmacia), naftoquinonas (estructura derivada del naftaleno, con poder antiséptico de ahí su interés en farmacia tanto en antibacteriano y antifúngico), antraquinonas (su estructura deriva de del antraceno y las 1,8-dihidroxi-antraquinonas tienen sus propiedades laxantes) y fenantraquinonas (su estructura deriva del fenantreno). La estructura química de las antraquinonas se caracteriza por el sistema tricíclico del antraceno, pero con el anillo central más o menos oxidado, lo cual permite diferenciar los distintos tipos de derivados antracénicos. (Santa, 2009)

Generalmente están en forma de heterósido. Hay O-heterósidos, C-heterósidos e incluso O y C heterósidos a la vez. Si están libres (genina libre), las antronas y antranos se oxidan fácilmente a antraquinonas, por lo tanto las geninas antraquinónicas son sólidos coloreados (amarillo, anaranjados, rojizos) poco solubles en agua fría y más solubles en agua caliente y mezclas hidroalcohólicas. Son solubles en disolventes orgánicos y en alcoholes y les dan color amarillo, así como en soluciones alcalinas, tomando entonces un color rojo. Las que tienen un grupo carboxilo se solubilizan en soluciones acuosas de bicarbonato de sodio (Santa, 2009).

Son los componentes más frecuentes entre el grupo de las quinonas vegetales. Las antraquinonas son compuestos aromáticos con dos grupos cetona, frecuentemente en para y en muy poco caso en orto (Fig. 8)

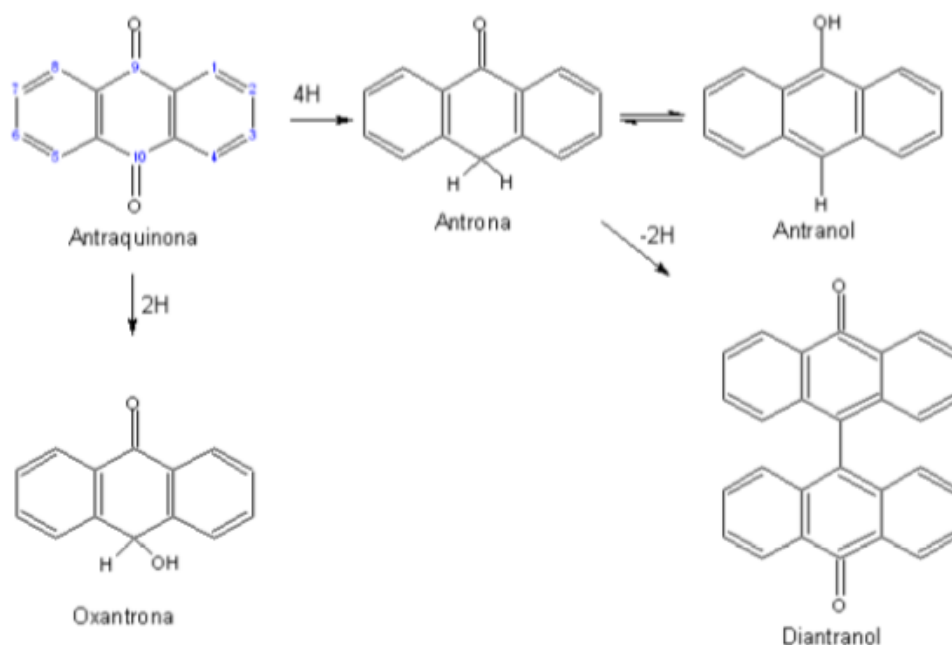


Figura 8. Estructura general de una antraquinona, antrona, oxantrona, antrano y diantranol (Prado, 2015)

La detección de antraquinonas se lleva a cabo por medio de la reacción de Bornträger. Esta reacción solo se da en las antraquinonas libres, que son solubles en un disolvente orgánico (color amarillo) y si se le añade una solución acuosa de hidróxido de potasio, se forma una capa de color rojo debido a las sales, desapareciendo el color amarillo (Santa, 2009).

2.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Valencia (1995) menciona que las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde varios puntos de vista, muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de medicamentos, sin embargo

todavía hay un vacío en el conocimiento de la composición química de algunas plantas, lo que ha estimulado a la investigación el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios, y en la actualidad se realiza con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas en química analítica.

2.3.1 Aislamiento de metabolitos secundarios

El aislamiento de los metabolitos secundarios difiere del aislamiento de las macromoléculas biológicas más abundantes como las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, debido a que los metabolitos secundarios son moléculas más pequeñas y químicamente más diversas, además de encontrarse en cantidades muy pequeñas e inespecíficas dependiendo de la planta medicinal, por lo que los métodos de aislamiento son variados, ya que las estructuras moleculares son distintas dependiendo del metabolito secundario (Cannel, 1998).

2.3.1.1 Extracción con solventes

La extracción con disolventes, es la técnica de separación de compuestos más utilizada no solo en los laboratorios de química sino también en las diversas industrias. La técnica consiste en que a partir de una matriz sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla, separarlos con un disolvente adecuado (Cannel, 1998).

El primer paso de la extracción es liberar y solubilizar los metabolitos secundarios a través de la extracción acuosa o con solventes. Este procedimiento puede ser hecho por una serie de extracciones, usando solventes de polaridad variable y creciente, los cuales actúan como el primer paso del fraccionamiento de las moléculas presentes o bien usando un solo solvente “universal” como el etanol, el cual disuelve la mayoría de los productos naturales al mismo tiempo que los libera de la matriz celular (Cannel, 1998).

2.3.1.2 Ultrasonido

Dentro de las llamadas técnicas no convencionales se encuentran las tecnologías de fluidos supercríticos (gas carbónico, agua entre otros), extracción asistida con microondas y extracción asistida con ultrasonidos, los cuales buscan mejorar el rendimiento en la extracción de los compuestos de interés. En la actualidad las diferentes industrias han incorporado con éxito la tecnología de extracción asistida por ultrasonido que combinada con tecnologías convencionales o bien en aplicaciones específicas las relacionan con el procesamiento, conservación y extracción de componentes de plantas (Azuola & Vargas, 2007).

El ultrasonido por definición es un tipo especial de vibración de onda de sonido con frecuencia más allá de la audición humana (20000 Hz), es decir, a más de 20 KHz, de

acuerdo al centro soniquímica de la Universidad de Coventry en el Reino Unido el ultrasonido puede ser dividido en dos tipos:

1. **Ultrasonido de señal:** conocido como ultrasonido de baja frecuencia; esta señal es afectada por los elementos que entran en contacto con ella, permitiendo de esta manera obtener información acerca del producto, principalmente en el estudio de sus propiedades reológicas.
2. **Ultrasonido de potencia:** conocido como ultrasonido de alta frecuencia; al haber una frecuencia más baja y una potencia más alta logran producir cambios fisicoquímicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación (fenómeno donde las ondas de sonido pasan a través de un medio (solvente) generan procesos de compresión y expansión), significa que la producción, el crecimiento y el colapso de burbujas es debido a una gran cantidad de energía que se puede producir a partir de la conversión de energía cinética de movimiento que ocurre asimétricamente en la interfaces y golpes sobre la superficie sólida. Para lograr el efecto antes mencionado se requiere de un medio líquido, un generador de energía y transductor (Azuola & Vargas, 2007).

Ahora bien normalmente los compuestos de interés en las plantas medicinales se encuentran dentro de la célula, en la pared celular, citoplasma u orgánulos, para lograr su extracción de manera convencional con solventes no es fácil y la eficiencia es baja, sin embargo con la utilización del ultrasonido se superan estas dificultades debido a la acción del ultrasonido que abre los poros en la pared celular y porque disminuye el tamaño de los solutos, este mecanismo de extracción asistida implica diferentes tipos de fenómenos físicos, a saber: a) facilita los procesos de hinchamiento e hidratación entre el material vegetal y el solvente, b) difusión a través de la pared celular y c) lavado del contenido de la célula después de romper las paredes (González et al., 2014).

El aspecto más importante para una extracción exitosa asistida por ultrasonido es establecer valores apropiados para los parámetros de extracción relacionados con las propiedades biológicas del material vegetal que se extraerá. Considerando las principales variables que se encuentran reportadas en otras investigaciones como son: temperatura, frecuencia, potencia, tipo de solvente y tiempo de aplicación de esta tecnología para obtener el máximo rendimiento de extracción (Tobón, 2015).

2.3.2 Caracterización de metabolitos secundarios

2.3.2.1. Screening fitoquímico

El screening fitoquímico o también llamado tamizaje fitoquímico, es uno de los primeros pasos que se realizan en una investigación acerca de los principios activos de la planta medicinal en estudio; el cual es un análisis cualitativo de los principales componentes químicos, este método nos permite una evaluación rápida, reproducible y con un costo muy bajo (Sharapin, 2000).

Para el screening fitoquímico se pueden utilizar muestras que pueden ser de diferentes partes de la planta o bien de la parte específica a estudiar, esta muestra puede estar en varios tipos de solventes y mediante la adición de los reactivos de reacción provoquen cambios en las coloraciones, que dan una indicación visual de la presencia de varios grupos funcionales, debido a que el reactivo reacciona con un metabolito y se produce un compuesto colorido (Cannel, 1998).

Existen técnicas para la detección de diversos grupos funcionales, los tipos de metabolitos detectados de forma usual son: glúcidos, las gomas, mucilagos, lípidos, ceras, cumarinas, flavonoides, antocianinas, leucoantocianos, antraquinonas, taninos, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides.

2.3.2.2. Espectrofotometría

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en el área de investigación. Es la medida de la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra en función de las longitudes de onda específicas, basándose en la Ley de Beer-Lambert. Esta medición también puede usarse para medir la cantidad de un producto químico conocido en una sustancia. El principio básico es que cada compuesto absorbe o transmite luz sobre un cierto rango de longitud de onda (Harvey, 1999).

2.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.4.1 Radicales libres

Un radical libre es una molécula química con un electrón sin aparear; lo cual le convierte en una molécula altamente inestable y reactiva; debido a esto puede provocar daño a nivel celular y ruptura homeostática (Rubio et al., 2016).

Los radicales libres son producto del metabolismo normal; proceden de la respiración, también se originan por contaminantes ambientales y la radiación; durante la reacción en cadena puede afectar a un millón de moléculas (Coronado, *et al.*, 2015). A su vez en la mitocondria se genera la mayor parte de radicales libres, debido a que estos son los responsables del consumo de oxígeno por parte de la célula, causando el daño oxidativo (Hicks et al., 2006).

La vida de un radical es de microsegundos, pero en tan poco tiempo puede provocar un enorme daño a la molécula, membranas y tejidos celulares. Los radicales libres del oxígeno presentan una función fisiológica en el organismo, ya que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, pero que participan en reacciones que conducen a la

elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS) (Avello y Suwalsky, 2006).

Las principales especies reactivas del oxígeno son el: radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, anión superóxido, oxígeno nítrico, peróxido; los principales radicales libres del oxígeno pueden clasificarse en: radicales libres inorgánicos o primarios, radicales libres orgánicos o secundarios y los intermediarios estables (Venereo, 2002).

2.4.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un daño potencial al organismo causado por las especies reactivas del oxígeno (EROS) debido a la inestabilidad entre los sistemas oxidantes y antioxidantes (Rubio et al., 2016). Existen tres niveles de afectación al organismo los cuales son: crónico, agudo e intenso; dependiendo del daño estructural y la especie reactiva (Hicks et al., 2006).

El estrés oxidativo está relacionado con el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, diabetes tipo II, hiperlipidemia, envejecimiento prematuro, cataratas, enfermedades cardíacas y cáncer (Avello y Suwalsky, 2006).

2.4.3 Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula química presente en bajas concentraciones cuya función es evitar o disminuir la acción de los radicales libres; debido a que es una molécula donadora de electrones que impide una reacción de óxido-reducción (Llacuna y Mach, 2012).

Los antioxidantes se pueden clasificar por su estructura química y función biológica, siendo antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos; así mismo, existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos y los exógenos; los primeros que son propios del cuerpo y los segundos que se los obtiene de alimentos, o bien han sido agrupados de acuerdo a su mecanismo de acción en: primarios referidos como tipo I o cortadores de cadena (Chain breaking) y secundarios o antioxidantes preventivos (Hicks et al., 2006).

Los antioxidantes primarios, debido a su naturaleza química, pueden actuar como aceptores/eliminadores de radicales libres y retrasar el paso de iniciación o interrumpir el paso de la auto-oxidación, ya que la mayoría de estos actúan como cortadores de cadena o interceptores de radicales son mono- o polihidroxi fenoles con diversas sustituciones en los anillos aromáticos (Wanasundara y Shahidi, 2005).

Los antioxidantes secundarios son también clasificados como preventivos o tipo II. Estos ofrecen actividad antioxidante mediante varios mecanismos para disminuir la velocidad de las reacciones de oxidación. La principal diferencia con los primarios es que éstos no convierten los radicales libres en moléculas estables, sino más bien actúan como agentes quelantes, proveen oxígeno a los antioxidantes primarios, descomponen el hidropéroxido en especies no radicales, desactivan el oxígeno singulete, absorben la radiación UV o actúan como secuestrantes de oxígeno. Es importante mencionar que los antioxidantes

secundarios aumentan la actividad antioxidante de los antioxidantes primarios. Los ácidos ascórbico, cítrico y málico son ejemplos de algunos de antioxidantes secundarios (Wanasundara y Shahidi, 2005).

2.4.4 Importancia de los antioxidantes de las plantas para la salud

El organismo posee sistemas de defensa contra la acción de los radicales libres denominados antioxidantes, ellos pueden actuar: previniendo la formación e interceptando el ataque de especies reactivas al oxígeno, ayudan a la reparación del daño causado por los radicales libres y transformando moléculas reactivas en menos reactivas (Llacuna y Mach, 2012). También están implicados en la prevención de la formación de la reacción en cadena secuestrando los radicales libres de iniciación, en la unión a los iones metálicos catalizadores y en la descomposición de los productos primarios de oxidación, además previenen la unión de proteínas, la mutación de ADN y daño a tejidos (Shahidi, 2000; Han et al., 2007)

Sin embargo la deficiencia de antioxidantes con lleva a un estrés oxidativo y como consecuencia de ello, hay una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de radicales libres, o bien al menos estarían implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas. Son muchos los procesos patológicos implicados, entre ellos el: Alzheimer, Parkinson, lesión cerebral hipertensiva, distrofia muscular, esclerosis múltiple cáncer, degeneración de la retina, infarto, envejecimiento y diabetes, esta última en la actualidad es una de las enfermedades con mayor número de pacientes en México.

En la diabetes mellitus los altos niveles de glucosa inducen la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación altera la estructura y la función de las proteínas. Es sabido que la autooxidación de azúcares genera EROS. A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de EROS se incrementa en presencia de metales de transición. Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos, no está únicamente relacionado con la aceleración en la producción de EROS, sino también por la disminución de antioxidantes. La vía del poliol es un posible mecanismo por el que la hiperglucemia puede alterar la función y la estructura de las células afectadas ya que a cierta cantidad de superóxido se produce, deliberadamente, por células como fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) dando lugar a grandes cantidades de superóxido, como parte de los mecanismos de defensa, del organismo, frente a agresiones de diversa índole, tales como en las inflamaciones crónicas; pudiendo afectar los mecanismos normales de protección dando lugar a una de las complicaciones más preocupantes como la del pie diabético (Elejalde, 2001)

Por ello hoy en día se recomienda el uso de antioxidantes en enfermedades, mediante terapias antioxidantes, diversos estudios han reportado que los antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo (García et al., 2009). Así mismo se ha incentivado a la búsqueda de nuevas sustancias naturales sin efecto tóxico que reemplacen a los antioxidantes comerciales y de amplia utilidad en las diferentes industrias desde alimentaria, cosmética y farmacéutica. Se

han utilizado plantas medicinales como una fuente de obtención de metabolitos antioxidantes, debido a que, sintetizan y acumulan en sus órganos gran variedad de estos metabolitos como respuesta a estímulos o condiciones ambientales (Pareja et al., 2010), con la capacidad de captar radicales libres, entre ellos los compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y compuestos nitrogenados.

Por tanto, es de vital importancia encontrar sustancias que contengan antioxidantes naturales y de esta manera se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso que esté a favor de los antioxidantes.

2.4.5 Determinación de la actividad antioxidante

2.4.5.1 Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. De acuerdo a Tovar, (2013), la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés (Tabla 2); sin embargo, es necesario considerar que los modelos presentan diferentes variaciones que puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro.

Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías:

- (1) Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
- (2) Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (Huang *et al.*, 2005).

Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT

ENSAYO	CATEGORÍA
Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS ^{•+})	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
1,1-difeneil-2-picril-hidrazilo (DPPH)	
N,N- dimetilp -fenilendiamina (DMPD)	

Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)	

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang et al., 2005).

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH• es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS^{•+} se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam et al., 2012). Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.

2.4.5.2 Ensayo DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno (Fig. 9), el color violeta se desvanece (Tovar, 2013). El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH• ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de

reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Ojha et al., 2012).

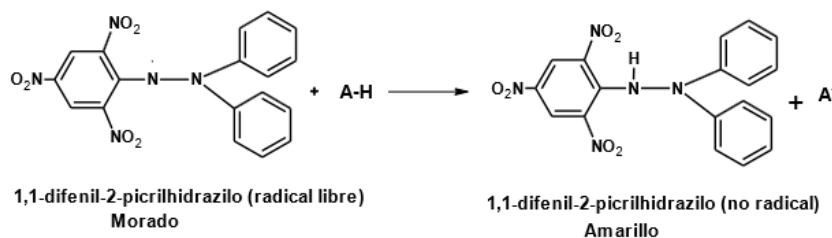


Figura 9. Reacción del DPPH con el antioxidante (Martínez, 2007)

Los resultados del ensayo DPPH[•] se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC₅₀ cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH[•] usado (Deng et al., 2011).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH[•] es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH[•]. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el IC₅₀ que van en un rango de 1.15 min (ácido ascórbico) a 103 min (rutina).
- La reacción cinética entre el DPPH[•] y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH[•], por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC₅₀.
- La reacción de DPPH[•] con eugenol fue reversible (Vondet et al., 1997), lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

2.4.5.3. Ensayo ABTS^{•+} (ácido 2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)

La generación del radical ABTS^{•+} constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS^{•+} estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de

ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al., 1999).

La técnica mejorada para la generación del radical catión $ABTS^{\bullet+}$, implica la producción directa del cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS (Fig.10). De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{\bullet+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

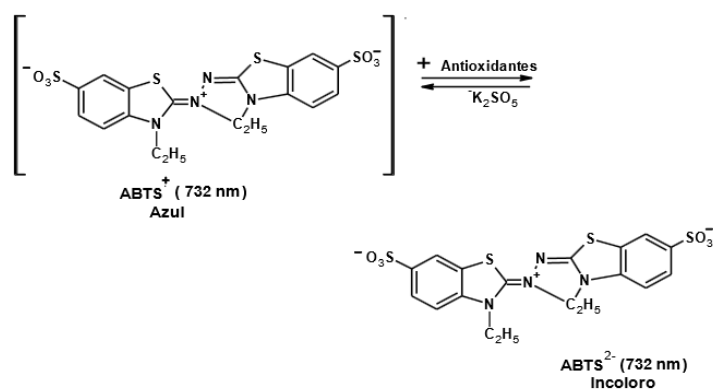


Figura 10. Estructura del $ABTS^{\bullet+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante (Zuleta et al., 2009)

CAPITULO III

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial entre ellas las patologías más importantes son la: obesidad, diabetes tipo II, hiperlipidemia, envejecimiento prematuro, cataratas, carcinogénesis y aterosclerosis, las cuales en los últimos 40 años, han sido relacionadas con el estrés oxidativo (Hybertson et al., 2011; Ramírez et al., 2011). Sin embargo, el acceso de los pacientes al sector salud en países como México, no está totalmente garantizado y a esto se suma el costo de los medicamentos para el tratamiento de las enfermedades. Por lo que el uso de la medicina tradicional ha registrado un aumento en su consumo a partir de 1990 en países desarrollados y subdesarrollados, lo que la posiciona como una importante alternativa para la eliminación de microorganismos potencialmente patógenos y para el tratamiento de enfermedades crónicas no trasmisibles (OMS, 2013).

Esto se debe a que las plantas medicinales son una fuente importante de metabolitos secundarios a los que se les atribuye su actividad farmacológica, siendo la actividad antioxidante una de la más estudiadas en la actualidad, debido a que el cuerpo expuesto a diversos factores estresantes, entre ellos enfermedades, no es totalmente efectivo para combatir los radicales libres y sus efectos devastadores en las células. Por lo que, es de vital importancia consumir antioxidantes naturales para reducir el efecto de los radicales libres.

Una de las plantas que puede ayudar a reducir los radicales libres y efectos en las células es la raíz *I. heterophylla*, ya que con base en su uso y conocimiento etnobotánico, se puede afirmar que esta planta posee una gran variedad de antioxidantes, sin embargo la información científica disponible acerca de la raíz de *I. heterophylla* es escasa, por lo que el realizar un estudio fitoquímico parcial de los extractos de la raíz enriquecerá el conocimiento fitoquímico que se tiene sobre dicha planta y validar que la raíz posee una extensa gama de metabolitos secundarios con actividad antioxidante que propician su actividad farmacológica.

CAPITULO IV

HIPOTESIS

En diferentes especies vegetales, se ha identificado la presencia de compuestos con actividad antioxidante como responsables del uso como coadyuvante en el tratamiento de pacientes con pie diabético. *Iostephane heterophylla* se emplea con este propósito, por lo que potencialmente contendrá altos niveles de compuestos antioxidantes que fundamenten su uso en la medicina tradicional.

CAPITULO V

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Extraer y caracterizar parcialmente los compuestos con actividad antioxidante presentes en las raíces de *Iostephane heterophylla*.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Evaluar el efecto de diferentes solventes sobre la extracción de metabolitos con actividad antioxidante presentes en las raíces de *Iostephane heterophylla*.
- ✓ Realizar un tamiz o huella fitoquímica de los extractos obtenidos.
- ✓ Determinar la concentración de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos obtenidos.
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante en los extractos obtenidos.

CAPITULO VI
MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en las siguientes fases:



6.2 MATERIAL VEGETAL

6.2.1 Colecta

La raíz de *I. heterophylla* se recolectó en el municipio de Timilpan, Estado de México en los meses de febrero- marzo de 2018, a su vez se trabajó con raíces colectadas en el municipio de Chignahuapan, Puebla en el año de 2017.

6.2.2 Siembra

Las raíces colectadas de *I. heterophylla* fueron sembradas en diversos tipos de sustrato, tales como:

- ✓ Tierra de monte
- ✓ Tierra común
- ✓ Arena
- ✓ Tierra del sitio de colecta

La siembra de las raíces colectadas fue con la finalidad de generar un espécimen vegetal completo y adulto, del cual obtener flores, para realizar su determinación taxonómica. Se evaluaron los sustratos con el objetivo de favorecer de manera más efectiva el desarrollo de la planta.

6.2.3 Desinfección de la raíz

Para evitar la contaminación del material vegetal se llevó a cabo un proceso de desinfección que constó en sumergir las raíces en un vaso de precipitado con suficiente cantidad de agua para cubrirlas, posteriormente fueron lavadas con una solución acuosa de detergente comercial (1% p/v) (una vez) para eliminar los residuos de suelo adherido, se lavaron con agua potable (tres veces), y finalmente se realizaron dos enjuagues con agua destilada.

6.2.4 Preparación de la muestra

La raíz se fragmentó en trozos pequeños, se pesaron en una balanza analítica (peso fresco, PF), posteriormente se realizó el secado de las muestras en estufa de convección a 58°C durante 3 días, al término del proceso se determinó el peso de la raíz (peso seco, PS). Los datos registrados fueron empleados, para calcular el contenido de agua en la muestra.

Las raíces secas se pulverizaron con ayuda de un mortero, posteriormente la muestra se hizo pasar por un tamiz (Screens for CD-1, 40 mesh, Sigma Aldrich), con la finalidad de obtener un tamaño de partícula uniforme. Las muestras tamizadas se almacenaron en frascos ámbar a temperatura ambiente hasta su posterior utilización.

6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

6.3.1 Extracción secuencial

Las extracciones se realizaron de forma secuencial a partir de 20g de raíz seca y pulverizada de *I. heterophylla* usando solventes con polaridad creciente, iniciando con hexano, diclorometano, metanol y finalmente agua.

A 20g de muestra, se le agregaron 200 mL de solvente, la mezcla se mantuvo en agitación durante una hora (175 rpm), bajo una temperatura de 40°C. Al término del proceso, la mezcla se sometió a baño ultrasónico (Shanghai Kudos Ultrasonic instrument co.) a 40 °C por 40 minutos a una potencia de 53 Hz y frecuencia de 100%, al finalizar la extracción ultrasónica, la mezcla se filtró al vacío. El extracto se almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente, la biomasa residual se sometió al mismo procedimiento con cada uno de los solventes restantes (diclorometano, metanol y agua), generándose un total de 4 extractos: hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso (Fig.11).

Los extractos obtenidos con hexano, diclorometano y metanol fueron sometidos a presión reducida con ayuda de un rotavapor, con la finalidad de reducir el volumen de los respectivos solventes. Finalmente, los extractos fueron liofilizados, haciéndose lo mismo con el extracto acuoso. Los extractos fueron recuperados, pesados, pulverizados y almacenados en frascos ámbar hasta su posterior uso y análisis.

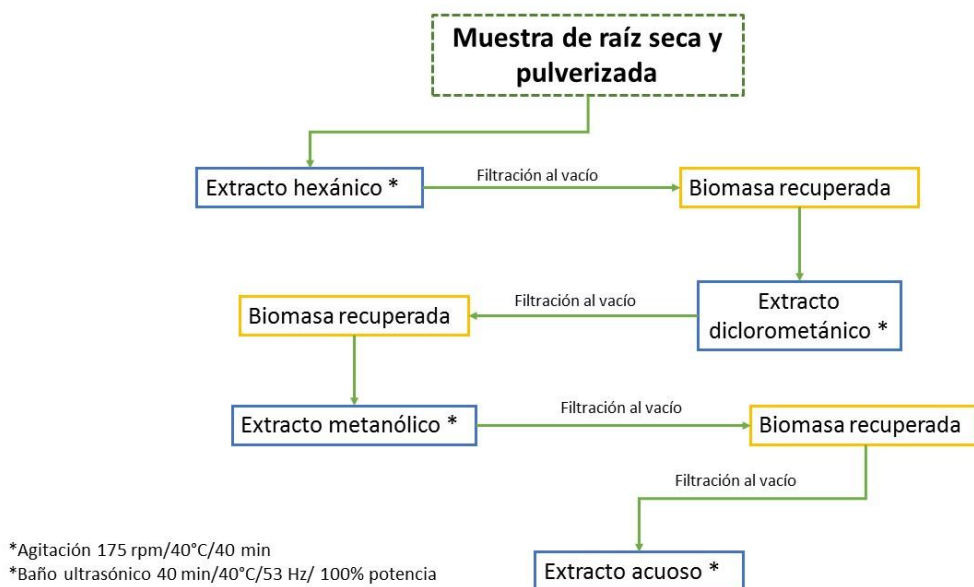


Figura 11. Proceso de extracción de los compuestos de la raíz de *I. heterophylla*

6.4 SCREENING FITOQUÍMICO

6.4.1 Pruebas colorimétricas

Con la finalidad de establecer el perfil fitoquímico de los principales compuestos constituyentes de la raíz de *I. heterophylla*, se procedió a analizar los extractos obtenidos. Cada uno de los extractos fueron sometidos a diferentes pruebas colorimétricas para determinar la presencia de los siguientes compuestos y biomoléculas: compuestos triterpénicos y esteroidales, saponinas, flavonoides, cumarinas, alcaloides, taninos, glucósidos cardiotónicos, derivados antracénicos libres (Tabla 3).

Para la realización de las pruebas se tomaron 25mg de cada uno de los extractos liofilizados y se analizaron de acuerdo con las técnicas y procedimientos reportados en la bibliografía dependiendo el compuesto a buscar (Anexo 1).

- *Alcaloides*: reactivo de Dragendorff, reactivo de Wagner, reactivo de Mayer (Dominguez,1973).
- *Saponinas*: prueba de espuma, reactivo de Rosenthaler, reactivo de Liebermann-Burchard, Efecto hemolítico. (Enriquez,2015).
- *Flavonoides*: reactivo de Shinoda concentrado, Pew's y NaOH. (Piantzi, 2017; Enriquez, 2015).
- *Glucósidos cianogénicos*: reactivo de Grinard (Piantzi, 2017).
- *Glucósidos cardiotónicos*: reactivo de Baljet, reacción de Keller Kiliani, reactivo de Liebermann-Burchard, reactivo de salkowski (Piantzi, 2017).
- *Derivados antracénicos libres*: reacción de Borntraeger (Piantzi, 2017).
- *Fenoles*: solución de cloruro férrico. (Galindo, 1989).
- *Taninos*: solución de cloruro férrico, solución de gelatina 1%, solución de albumina, solución de acetato de plomo. (Enriquez,2015; García et al., 2009).
- *Cumarinas volátiles*: prueba del papel filtro con NaOH al 5% (Dominguez,1973; García et al., 2009).

Tabla 3. Pruebas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios en la raíz de *I. heterophylla*.

COMPUESTO	REACTIVO	RESULTADO POSITIVO
ALCALOIDES	DRAGENDORF	Precipitado color rojo anaranjado y en general amorfos
	WAGNER	Precipitado floculento color marrón.
	MAYER	Precipitado amarillento amorfo o cristalino
SAPONINAS	ESPUMA	La prueba se considera positiva si la altura de la espuma es mayor a 5 mm después de 15 minutos.
	ROSENTHALER	Saponinas triterpénicas (color violeta)
	LIEBERMANN-BURCHARD	Diferencia entre saponinas triterpénicas y esteroidicas Las triterpénicas dan coloración rosada, naranja, rojo, púrpura; las esteroidicas dan coloración azul o verde

	HEMOLISIS	Reportar si hay o no hemólisis, la cual puede ser total o parcial.
COLESTEROL	SALKOWSKI	Coloración amarilla- rojo sangre
FLAVONOIDES	SHINODA CONCENTRADO	La aparición de colores amarillo, naranja, rosado, rojo o violeta es prueba positiva
	PEW'S	Betaninas- Amarillo a un color ámbar o verdoso Antocianos- Azul a verde Dihidrochalconas, flavononas- rojo o café Dihidroflavonoles- rojo purpura al rojo cereza
	NAOH	Color amarillo o naranja
CUMARINAS	PAPEL FILTRO	Fluorescencia amarilla bajo luz UV
TRITERPENOS	LB	La aparición de colores rojo, rosa, verde purpura y azul en la interfase
GLUCOSIDOS CARDIOTONICOS	BALJET	Coloración roja, naranja-roja o violeta
	KELLER KILIANI	Coloración verde
	LB	La aparición de color verde, azul-verdoso o el vire de color rojo azul se considera positivo
	SALKOWSKI	Coloración amarillo-rojo sangre
DERIVADOS ANTRACÉNICOS LIBRES	BORNTRAEGER	La coloración rojiza en fase acuosa indica la presencia de antraquinonas
FENOLES	FeCl₃	Rojo-vino=compuestos fenólicos en general Verde intensa= taninos tipo pirocatecólicos Azul= taninos tipo pirogálotánicos
TANINOS	FeCl₃	Aparición de precipitado
	CA(OH)₂	
	ALBUMINA	
	PB(C₂H₃O₂)₂	
	GRENETINA	
	HEMOAGLUTINACIÓN	Parcial o total

6.4.2 Cromatografía en capa fina

Con base en la información obtenida en las pruebas colorimétricas se realizó la cromatografía en capa fina para confirmar la presencia de los metabolitos, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel sílice 60F₂₅₄ Merck, empleando diferentes sistemas de elución:

- ✓ Hexano-Acetato de etilo (80:20) usado para los compuestos de baja a intermedia polaridad presentes en el extracto hexánico y diclorometánico
- ✓ Diclorometano-MeOH (80:20) con 100µL de ácido acético glacial y Diclorometano-MeOH (60:40) con 100µL de ácido acético glacial: utilizado para los compuestos de intermedia a mayor polaridad presentes en el extracto metanólico
- ✓ Acetato de etilo-MeOH-AcOH-H₂O (2.5:1:0.3:0.250): utilizado para los compuestos de mayor polaridad presentes en el extracto acuoso

Las placas se revelaron con reveladores específicos previamente establecidos en las referencias bibliográficas (Tabla 4). La preparación de los reveladores utilizados se escribe con detalle en el anexo 2.

Tabla 4. Reveladores para cromatografía en capa fina en la identificación de metabolitos secundarios en la raíz de *I. heterophylla*

METABOLITO	REVELADOR	TRATAMIENTO	MANCHAS CARACTERÍSTICAS
FLAVONOIDES	AlCl ₃	Irradiar con luz UV a 366 nm	Fluorescencia amarilla y azul a luz UV a 366nm
	Citrobórico		
SAPONINAS, TERPENOIDES E ISOPRONOIDES	Vainillina/H ₂ SO ₄	Primero asperjar con vainillina la cromatoplaca y después con H ₂ SO ₄ Calentar a 100°C por 5-10 minutos	<p>Terpenoides</p> <p>Manchas rosadas, purpuras</p> <p>Esteroídicas</p> <p>Manchas azul-verdosas</p> <p>Algunas pueden dar coloración amarilla</p>
	Liebermann-Burchard	Asperjar la cromatoplaca y calentar a 100°C	
	p-anisaldehido	Por 5-10 minutos	
ALCALOIDES	Dragendorff	Asperjar la cromatoplaca y observar inmediatamente el resultado	Manchas color marrón o anaranjado intenso
	Wagner		
FENOLES Y TANINOS	Cloruro férrico 1%	Aspejar la cromatoplaca y observar el resultado, generalmente no requiere calentamiento o calentar suavemente	Color azul negruzco en caso de que se trate de taninos pirogalotaninos o color verde en caso se trate de taninos condensados
CUMARINAS Y ANTROQUINONAS	Bornträeger	Calentar suavemente hasta	Rojo en el visible para antroquinonas

		que el color aparezca	
GLUCÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	Baljet	Asperjar la cromatoplaca y observar el resultado	Coloración roja, naranja rojiza o violeta
ALCOHOLES, ALDEHÍDOS, COMPUESTOS INSATURDOS, AMINAS Y SULFOXIDOS	KMnO ₄ 10%	Asperjar la cromatoplaca y esperar unos segundos a que aparezcan las manchas	Manchas de color amarillo
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	DPPH	Asperjar la cromatoplaca y esperar unos segundos a que aparezcan las manchas	puntos amarillos en un fondo violeta
COMPUESTOS ORGÁNICOS	H ₂ SO ₄ 5%	Asperjar la cromatoplaca y calentar a 100°C	Manchas color café o verdes

Fuente: Harbome et. al (1973); Wagner et. al (1984) y Hellmut et. al 1990

6.4.3 Cuantificación de metabolitos secundarios

6.4.3.1 Flavonoides totales

La determinación de Flavonoides se realizó mediante el método establecido por Pekal y colaboradores (2014) con algunas modificaciones, se utilizó como patrón una solución de quercetina (0.2 mg/mL). Para la curva de calibración se utilizaron concentraciones de 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 mg/mL.

El procedimiento para llevar a cabo la reacción es el siguiente: en tubos de ensaye se agregó un volumen conocido de cada una de las diluciones de la curva patrón y de la muestra problema (extractos), 375 µL de AlCl₃ al 2% y 375 µL de agua destilada, se agito vigorosamente en el vórtex, se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente en obscuridad. Leer absorbancia a 425 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific-Genesis 10S UV-VIS). Para la preparación de la muestra se realiza una solución 5 mg /mL de extracto liofilizado disuelto en EtOH al 98%

Con las mediciones realizadas para las diluciones de quercetina, se realizó una curva de calibración, cuya ecuación ayudó a determinar la concentración de flavonoides totales, la cual fue expresada en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg EQ/g extracto) (Anexo 3).

6.4.3.2 Fenoles totales

La determinación de Fenoles Totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu descrita por Trejo (2010) con algunas modificaciones, utilizando como patrón una solución de ácido gálico (0.1mg/mL).

Para la curva patrón se utilizaron soluciones de ácido gálico a diferentes concentraciones: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/mL. Como blanco se utilizó agua destilada.

Para la determinación en las muestras, se tomó una alícuota de 200 μ L del extracto obtenido disuelto en MeOH (5 mg/mL). Se colocaron en tubos de ensaye las soluciones de ácido gálico, se agregó 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, 200 μ L de carbonato de sodio anhidro 14% p/v y 1500 μ L de agua destilada, se homogenizaron y se dejaron reposar una hora a temperatura ambiente y en obscuridad. Leer absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS).

Con las mediciones realizadas para las diluciones de ácido gálico, se realizó una curva de calibración, cuya ecuación ayudó a determinar la concentración de fenoles totales la cual fue expresada como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g extracto) (Anexo 3).

6.4.3.3 Taninos condensados

El método utilizado para la cuantificación de taninos fue el descrito por Piantzi (2017), para lo cual se prepararon las siguientes soluciones: solución estándar de catequina 2 mg/mL, HCl al 8%, vainillina al 1% y reactivo de vainillina 1%/HCl 8%.

A partir de la solución de catequina (2mg/mL), se realizaron las siguientes diluciones: 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 mg/mL.

Cada dilución se calentó en baño María por 20 min a 30°C, se tomaron 400 μ L de cada una dilución y se adicionaron 2 mL del reactivo de vainillina, la mezcla se coloca nuevamente en baño María por 20 minutos a 30°C, se mezcla para leer en el espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS) a una absorbancia a 550 nm.

Para la preparación de la muestra y blanco se disuelven en HCl 1% se colocan a baño maría 20 min a 30°C y se trata de igual forma que las diluciones.

Con las mediciones realizadas para las diluciones de catequina, se realizó una curva de calibración, cuya ecuación ayudó a determinar la concentración de taninos condensados, fue expresada en miligramos equivalentes de catequina por gramo de extracto (mg ECat/g extracto) (Anexo 3).

6.4.3.4 Saponinas totales

Se adaptó la técnica de Baccou y colaboradores (1977), así como la propuesta por Piantzi (2017) para llevar a cabo la cuantificación espectrofotométrica de saponinas totales. Utilizando una solución estándar de 0.5 mg/mL de diosgenina (98%) en MeOH (80%).

A partir de la solución de diosgenina se realizaron 5 diluciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL.

Para efectuar la reacción se agregaron 0.25 mL de solución de vainillina al 8% y 2.5 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada una de las diluciones del estándar (0.25 mL), cada mezcla de reacción se realizó por triplicado. Las mezclas fueron incubadas durante 15 min a 60 °C. Al finalizar el periodo, se colocaron en baño de hielo durante 4 min para detener la reacción. Luego se procedió a leer en el espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS) cada una de las diluciones y las muestras problema (extractos) a 544 nm.

Para la determinación en las muestras problema, se tomaron 250 µL del extracto y se realizó el mismo procedimiento descrito para las diluciones.

Se obtuvo una curva de calibración, cuya ecuación ayudó a determinar la concentración de saponinas totales en el extracto, la cual fue expresada en miligramos equivalentes de diosgenina por gramo de extracto (mg EDiosg/g extracto) (Anexo 3).

6.4.3.5 Azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se basó en la técnica de Rojas y colaboradores (2015), el principio de la técnica radica en que los azúcares reductores poseen un grupo carbonilo libre, un hemiacetal que le confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos.

Se utilizó una solución estándar de glucosa (0.05 mg/mL). A partir de esta solución se prepararon por dilución las siguientes concentraciones: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL.

Para las soluciones patrón, blanco y muestras, se mezclan 0,5 mL de la solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se calientan hasta ebullición por 5 min en baño de María e inmediatamente se detiene la reacción con baño de hielo y agua. A cada solución se le agrega agua destilada, se agita, dejando en reposo por 15 min, y finalmente se lee la absorbancia de la mezcla, a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS).

Para calcular concentración de azúcares reductores en las muestras se utilizó la ecuación de la curva de calibración. La concentración de azúcares reductores, fue expresada en miligramos equivalentes de glucosa por gramo de extracto (mg EGlu/g extracto) (Anexo 3).

6.4.3.6 Alcaloides

El procedimiento analítico utilizado fue el reportado por Shamsa y colaboradores (2008), que da lugar a la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol, susceptible de una determinación espectrofotométrica a 470 nm. En el procedimiento se utiliza una solución estándar de gramina 0.1 mg/mL. A partir de la solución estándar se tomaron volúmenes: 0.4, 0.6, 1,1.2, 1.5, 2 mL, a los cuales se les añadió Na_2HPO_4 a pH 4.7, BCG (1×10^{-4}) y CHCl_3 realizando una extracción clorofórmica. Se sigue agregando consecutivamente a la muestras CHCl_3 por triplicado, hasta obtener un volumen 10 mL. Para la preparación de los extractos se tomaron 0.5 mg del extracto y se adicionaron gotas de HCl 2N y posteriormente fue filtrado. Se tomó 1 mL de esta solución y se trató de la misma forma que las soluciones.

La absorbancia del complejo formado y disuelto en cloroformo se mide a 470 nm, con los valores de las absorbancias y las concentraciones de gramina en se hace la curva de calibración. La concentración alcaloides fue expresada en miligramos equivalentes de gramina por gramo de extracto (mg EGra/g extracto) (Anexo 3).

6.5 Determinación de la actividad antioxidante

6.5.1 Método DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por el método de DPPH descrito por Williams y colaboradores (1995) con algunas modificaciones. Para la curva patrón se utilizó una solución stock del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX; 0.0008 mol/L) y se realizaron diluciones para llegar a concentraciones de 0.0001 a 0.0008 mol/L.

Se tomaron 100 μ L de cada muestra y se les añadió 3.9 mL de solución del radical DPPH (0.039 mg/ml). Todas las reacciones se homogenizaron y se dejaron en reposo por 30 min en obscuridad. Se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro. Como blanco se utilizó MeOH.

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad del radical DPPH neutralizado por el extracto (Anexo 4).

6.5.2 Método ABTS

Se utilizó la metodología descrita por López y colaboradores (2010) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución stock de ABTS (7 mM) y una solución de persulfato de potasio (140 mM), de estas soluciones se tomaron 5 mL y 88 μ L de solución, respectivamente. La nueva mezcla, se almacenó en un frasco ámbar y se dejó reposar en refrigeración durante 12 horas.

Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia, haciendo diluciones en metanol hasta obtener una absorbancia de 0.74 a 734 nm. Para la cuantificación de las muestras se tomaron 100 μ L y se les adicionó 3 mL de la solución ABTS.

Para la curva patrón se prepararon soluciones de TROLOX en concentraciones de 0.01 mM hasta 0.8 mM y se realizó el mismo procedimiento que para las muestras. Todas las reacciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro (Anexo 4). Como blanco se utilizó la solución de ABTS con absorbancia de 0.74

6.6 Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD

La preparación de la muestra se llevó a cabo utilizando 0.5 mg de cada uno de los extractos, los cuales fueron resuspendidos en 2 mL de acetonitrilo (ACN) grado HPLC. Las muestras fueron agitadas en el vórtex por 3 minutos, posteriormente se filtraron y almacenaron en viales debidamente etiquetados.

Este análisis se llevó a cabo en un sistema de HPLC (HP 1100 HPLC-DAD (Agilent Technologies Inc.)) el cual se encontraba equipado con un automuestreador, un sistema de bomba binaria y un detector de fluorescencia (Agilent Technologies Inc.), empleando un software Agilent ChemStation. La separación cromatográfica se realizó con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6x 150 mm, 3.5 μ m, con una temperatura de columna de 60°C.

La separación cromatográfica se llevó a cabo inyectando 10 μ L de extracto utilizando (A) Ácido fórmico 0.2%, con un flujo de 1mL/min en un tiempo total de corrida de 30 minutos. Las condiciones del gradiente fueron como se describe a continuación: 3 min (A) -90% y (D)-10%; 6 min (A)-85% y (D)-15%; 9 min (A)-80% y (D)-20%; 12 min (A)-70% y (D)-30%; 25 min (A)-50% y (D)-50%; 30 min (A)-100% y (D)-0%; Las detecciones se realizaron a 290 nm, 253 nm, 349 nm, tanto para fenólicos como para flavonoides. Los compuestos fenólicos fueron identificados usando estándares comerciales de ácidos fenólicos como ácido siríngico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido trans-cinámico, ácido trans-ferúlico; y para flavonoides: apigenina, catequina, epicatequina, rutina, naringenina, hesperidina, kaempferol. Todas las muestras fueron preparadas y analizadas por duplicado

CAPITULO VII

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación taxonómica

La especie vegetal utilizada para este trabajo fue identificada como *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth por el Dr. Luis Isaac Aguilera Gómez, responsable del Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México (Anexo 5).

7.2 Obtención de extractos

El procedimiento y estrategia a utilizar en la extracción de los metabolitos de interés es importante porque esto condiciona los compuestos blanco para ser extraídos de la planta en estudio (Tiwari y col, 2011). El uso de un sistema de solventes permite la extracción adecuada de los metabolitos, por ello los solventes utilizados en este trabajo fueron hexano, diclorometano, metanol y agua en orden creciente de polaridad, permitiendo así la extracción secuencial de metabolitos secundarios presentes en la raíz de *I. heterophylla* de acuerdo a su polaridad. Se trabajó con especímenes de la especie colectadas en dos diferentes estados de la República, en Timilpan, Estado de México y Chignahuapan, Puebla.

La extracción realizada fue asistida por ultrasonido, la cual se ha reportado que es una estrategia que ha demostrado ser efectiva, ya que los rendimientos obtenidos son mayores con respecto a las técnicas “convencionales” (Mijangos, 2010). Cuando se realizan extracciones asistidas por ultrasonido sobre materiales líquidos y sólidos, las cuales vibran por la acción de la onda ultrasónica, como resultado se logra que el compuesto de interés, pase de la fase sólida al solvente, de esta manera se favorece la difusión del soluto hacia el solvente al existir una mayor área de contacto y por lo tanto se favorecen los gradientes de transferencia (Tobón, 2015).

Una vez concluido el proceso de extracción, los extractos obtenidos fueron concentrados y liofilizados, lo que permitió calcular los rendimientos de extracción (Tabla 5). Los rendimientos más altos fueron obtenidos utilizando agua destilada como solvente, independientemente del sitio de procedencia del material vegetal, registrándose 15.27% y 15.17% para Puebla y Timilpan, respectivamente. Mientras que los rendimientos obtenidos al utilizar diclorometano como solvente fueron los más bajos, 1.06% para Puebla y 1.26 % para Timilpan. De acuerdo a los rendimientos de extracción se puede suponer que las muestras de raíz de *I. heterophylla*, tienen una composición alta de compuestos polares y en menor proporción compuestos no polares. En términos generales, Puebla es el sitio de colecta que tiene mayor influencia en el rendimiento de extracción.

Tabla 5. Rendimientos de extracción, empleando diferentes solventes, en las raíces de *I. heterophylla* de dos sitios de colecta.

TIPO DE EXTRACTO	SITIO DE COLECTA	RENDIMIENTO (%)
H	T	7.79±0.042 ^g
	P	8.91±0.078 ^f
D	T	1.26±0.057 ^e
	P	1.06±0.049 ^d
M	T	11.74±0.064 ^c
	P	12.95±0.049 ^b
A	T	15.17±0.042 ^a
	P	15.27±0.035 ^a

A: Extracto acuoso, D: Extracto diclorometánico, H: Extracto hexánico, M: Extracto metanólico, P: Puebla y T: Timilpan. Los datos mostrados son el promedio de dos repeticiones \pm DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

Con base en lo anteriormente discutido, se puede establecer que los principales componentes presentes en la raíz de *I. heterophylla* son de elevada polaridad, demostrando que la polaridad del solvente puede afectar el rendimiento del extracto (Assis, 2017).

7.3 Screening Fitoquímico

7.3.1 Pruebas colorimétricas

Los extractos obtenidos fueron sometidos a una serie de análisis cualitativos con la finalidad de determinar la presencia de los posibles metabolitos (grupos funcionales) presentes en la raíz de *I. heterophylla*. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Análisis cualitativo de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso de raíz *I. heterophylla* de dos sitios de colecta

METABOLITO	REACTIVO	EXTRACTO HEXÁNICO		EXTRACTO DICLOROMETÁNICO		EXTRACTO METANOLICO		EXTRACTO ACUOSO	
		TIMILPAN	PUEBLA	TIMILPAN	PUEBLA	TIMILPAN	PUEBLA	TIMILPAN	PUEBLA
ALCALOIDES	Dragendorf	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	+	+	-	+	-	+	-
	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-
SAPONINAS	Espuma	-	-	-	-	-	-	+++	+++
	Rosenthaler	+++	+++	++	++	++	++	+	+
	LB	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
ESTERÓLES Y METILESTEROS	Salkowski	++	++	+	++	+	+	+	+
FLAVONOIDES	Shinoda concentrado	-	-	+	+	++	++	++	++
	Pews	+	+	+	+	++	++	++	++
	NaOH	-	-	-	-	+	+	+	+
CUMARINAS	Papel filtro	-	-	-	-	-	-	-	-
TRITERPENOS	LB	+++	+++	++	++	+	+	+	+
GLUCOSIDOS CARDIOTONICOS	Baljet	+	+	+	+	+	+	+	+
	Keller Kiliani	-	-	-	-	-	-	-	-
	LB	+	+	+	+	+	+	+	+
	Salkowski	+	+	+	+	-	-	-	-
DERIVADOS ANTRACÉNICOS LIBRES	Bornträger	-	-	-	-	-	-	-	-
FENOLES	Cloruro férrico	-	-	-	-	++	++	+++	+++
TANINOS	Cloruro férrico	-	-	-	-	++	++	+++	+++
	Ca(OH) ₂	-	-	-	-	++	++	+++	+++
	Albumina	-	-	-	-	++	++	+++	+++
	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	-	-	-	-	++	++	+++	+++
	Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hemoaglutinación	-	-	-	-	+	+	-	-

Prueba negativa (-); Prueba positiva (+/ ++/ +++)

Con base en los resultados obtenidos se puede establecer que el extracto metanólico y acuoso presentan una mayor diversidad de metabolitos secundarios con la presencia de fenoles, flavonoides, esteroides y metil esteroides, saponinas esteroideas y triterpénicas, taninos condensados, triterpenos, alcaloides y glucósidos cardiotónicos, en específico sesquiterpenlactonas. Éstas últimas, de acuerdo a lo reportado por Seaman (1982), se encuentran generalmente en las plantas de la familia *Asteraceae*, familia a la que pertenece *I. heterophylla*.

Por otra parte, los metabolitos que fueron extraídos con hexano son en su mayoría ácidos grasos y aceites esenciales, esto debido a la polaridad de dichos compuestos, no obstante, también se pudo determinar la presencia de triterpenos, alcaloides de baja polaridad y agliconas. El hecho de observar reacciones positivas para flavonoides, esteroides, alcaloides y saponinas triterpénicas y esteroidales en los extractos hexánicos, puede deberse a dos situaciones, la primera es que realmente se hayan extraído pequeñas cantidades de dichos compuestos o bien que se obtuvieron falsos positivos generados por la presencia de grupos funcionales con los que los reactivos utilizados reaccionen dando una coloración positiva. Por ejemplo, es probable que dentro de los compuestos extraídos con el hexano, haya compuestos con hidrógenos ácidos, que reaccionen con el complejo de triyoduro del reactivo de Wagner dando la coloración característica al precipitado como si se tratase de la presencia de alcaloides. Por otra parte, el reactivo de Pew que se utiliza para flavonoides actúa interaccionando con el grupo carbonilo de los flavonoides al coordinarse con el zinc, sin embargo, los ácidos grasos también poseen grupos carbonilo que pueda coordinarse con el zinc presente en el reactivo dando así un resultado falso positivo (Matamoros, 2013).

Los metabolitos que se pudieron determinar en el extracto diclorometánico fueron: alcaloides, terpenoides, saponinas esteroideas y triterpénicas. El diclorometano es utilizado de manera particular para la extracción selectiva de terpenoides (Tiwari y col., 2011), por lo que no es extraño que este tipo de compuestos resulte ser el más abundante en el extracto.

Los reportes en la literatura sobre análisis fitoquímicos aplicados a raíces de *I. heterophylla*, han evidenciado la presencia de triterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, cumarinas, glucósidos y cromenos (Aguilar *et. al*, 1993), estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo. Por otro lado, los resultados reportados por Ríos (2000), afirman la ausencia de taninos condensados, en contraste, en el presente estudio se demostró la presencia de dichos compuestos por la prueba de cloruro férrico al 10% (Enríquez, 2016).

Las pruebas desarrolladas son de carácter cualitativo y presuntivo, no cuantitativo. Los resultados aquí presentados, dependen de la proporción en la que se encuentren presentes para poder ser determinados. Por ello aunque se obtuvieron resultados negativos en algunos casos, no es posible asegurar que estos metabolitos no se encuentren presentes, sino que es probable que su concentración sea tan baja que no fue posible determinarlos.

7.3.2 Análisis cromatográfico de los extractos

Con la finalidad de corroborar la presencia de algunos de los metabolitos encontrados en los extractos obtenidos, estos fueron analizados por cromatografía en capa fina.

En el caso de los terpenos, las placas cromatográficas obtenidas permiten observar cómo fueron arrastrados diferentes compuestos, cuyas coloraciones resaltan al ser reveladas las placas con el reactivo de Lieberman-Burchard (Fig. 12). Las diferentes coloraciones se deben a los diferentes grupos funcionales presentes en los muchos tipos de terpenos existentes, esto se debe a que la presencia de dobles enlaces conjugados o adyacentes a un grupo hidroxilo, así como la fusión y número de ciclos presentes en la estructura de los terpenos, estos influyen sobre la eficiencia de la reacción del reactivo. Este resultado sugiere la presencia de varios tipos de terpenos en los extractos puesto que la coloración va de un rosa, violeta y morado e incluso verdes o azules. Por lo anterior, podemos afirmar que el análisis cromatográfico efectuado para la identificación de terpenoides, arrojó resultados positivos, corroborando lo observado en las pruebas colorimétricas descritas en la subsección 7.3.1.

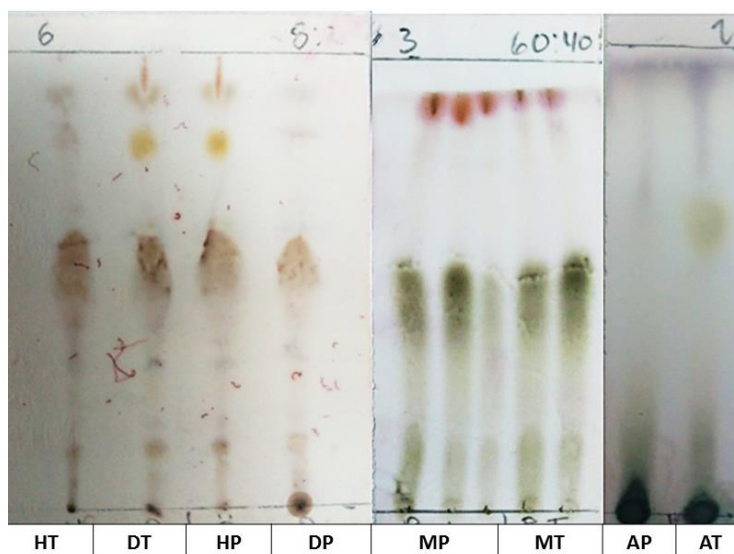


Figura 12. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: Lieberman-Burchard. A: Extracto acuoso, D: Extracto diclorometánico, H: Extracto hexánico, M: Extracto metanólico, P: Puebla y T: Timilpan.

Con respecto al análisis cromatográfico de saponinas, los cuatro diferentes extractos dieron positivo a la presencia de éstas (Fig. 13), lo cual corrobora los resultados obtenidos en las pruebas colorimétricas realizadas (Tabla 6).

La principal diferencia entre las saponinas y los terpenos es que estas últimas se encuentran unidas a uno o más carbohidratos. Sin embargo, existen dos tipos de saponinas las cuales se identifican dependiendo la coloración. En las saponinas triterpénicas la estructura es un triterpeno pentacíclico y como resultado de la reacción con la vainillina/ H_2SO_4 da coloraciones rosa, morada y violeta. Mientras que las saponinas esteroidales son generalmente triterpenos tetracíclicos presentando además un núcleo estirostano y estas dan coloraciones azules y verdes. Los colores obtenidos en las cromatoplasas son resultado de la reacción entre la vainillina y los productos de degradación de la aglicona, se detectaron las saponinas de tipo triterpénico y esteroidal, siendo las más predominantes las de tipo triterpénico en los extractos de hexano y diclorometano; en el caso de los extractos metanólicos se pueden observar ambos tipos de saponinas aunque en menor intensidad. En el extracto acuoso solo fueron detectadas saponinas esteroidales debido a las coloraciones verdosas/azules (Fig. 13-A).

Para identificar este mismo grupo de compuestos, fue utilizado como revelador el reactivo p -anisaldehído/ H_2SO_4 dando coloraciones similares a las obtenidas con vainillina/ H_2SO_4 al obtenerse coloraciones amarillas-rosadas para los extractos de hexano y diclorometano lo cual corresponde a saponinas de tipo triterpénico y esteroidal. Sin embargo, en los extractos metanólicos las saponinas de tipo esteroidal son más predominantes debido a la coloración verde, y por último los extractos acuosos presentan coloraciones verdes y moradas teniendo la presencia de saponinas triterpénicas y esteroidales (Fig. 13-B).

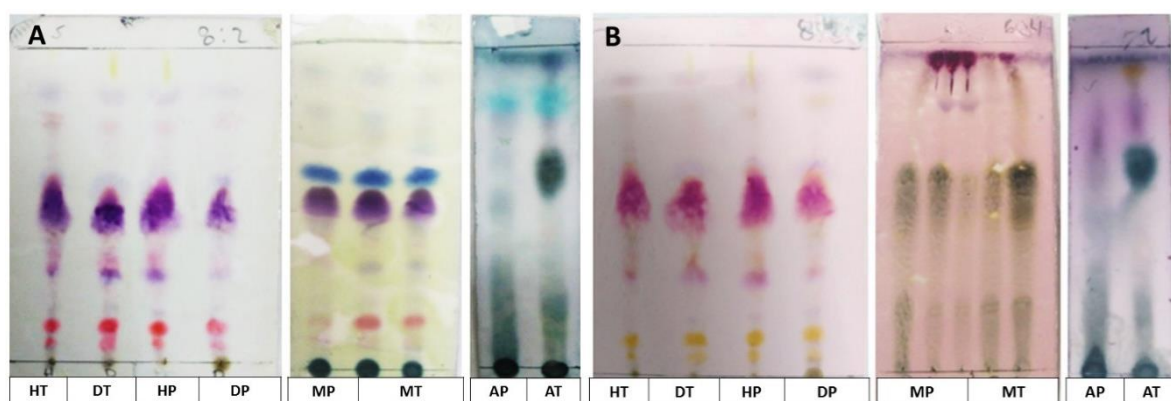


Figura 13. Placas cromatográficas de los extractos; reveladores: A) Vainillina/ H_2SO_4 y B) p -anisaldehído. A: Extracto acuoso, D: Extracto diclorometánico, H: Extracto hexánico, M: Extracto metanólico, P: Puebla y T: Timilpan.

Respecto a los flavonoides, los extractos con hexano y diclorometano no presentaron fluorescencia al aplicar los reveladores de $AlCl_3$ y el reactivo citrobórico, en cambio los extractos metanólico y acuoso presentaron fluorescencia color amarilla-verdosa, lo cual indica la presencia de flavonoides como: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles e isoflavonas por poseer el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo en la posición 5, los cuales forman complejos con aluminio (Fig. 14-A) y el ácido bórico (Fig. 14-B), dando fluorescencia a 365 nm.

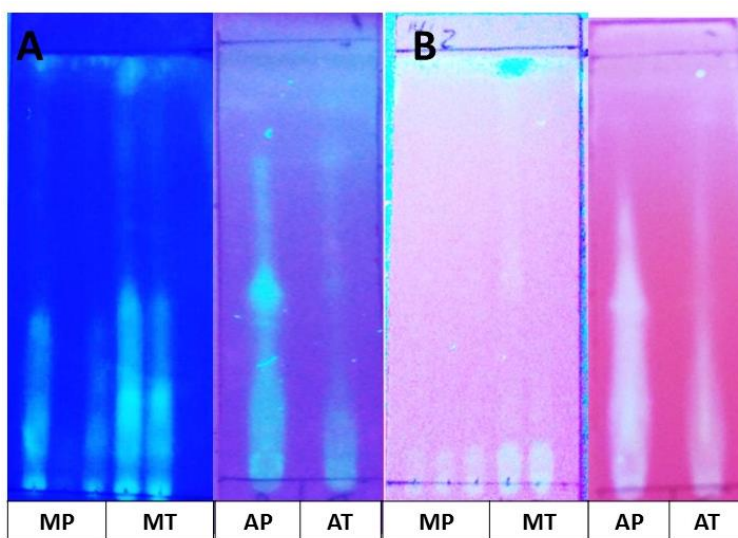


Figura 14. Placas cromatográficas de los extractos; reveladores: A. $AlCl_3$ y B. Reactivo citrobórico. A: Extracto acuoso y M: Extracto metanólico, P: Puebla y T: Timilpan.

Por otra parte se utilizó el revelador de Cloruro férrico dando resultado positivo para taninos condensados en los extractos metanólico y acuoso, con una coloración verde (Fig. 15). Esta respuesta se debe al ataque producido por el ión cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo).



Figura 15. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: Cloruro férrico. A: Extracto acuoso y M: Extracto metanólico, P: Puebla y T: Timilpan.

También se corrieron placas cromatográficas para determinar la presencia de alcoholes, aldehídos, compuestos insaturados, aminas y sulfóxidos, utilizando como revelador KMnO_4 al 10% (p/v). Los resultados observados (Fig. 16) son positivos, debido a la presencia de la coloración amarilla. Existe una mayor cantidad de este tipo de compuestos en los extractos de hexano y diclorometano (Fig. 16-A), seguido del extracto metanólico (Fig.16-B) y acuoso (Fig. 16-C).

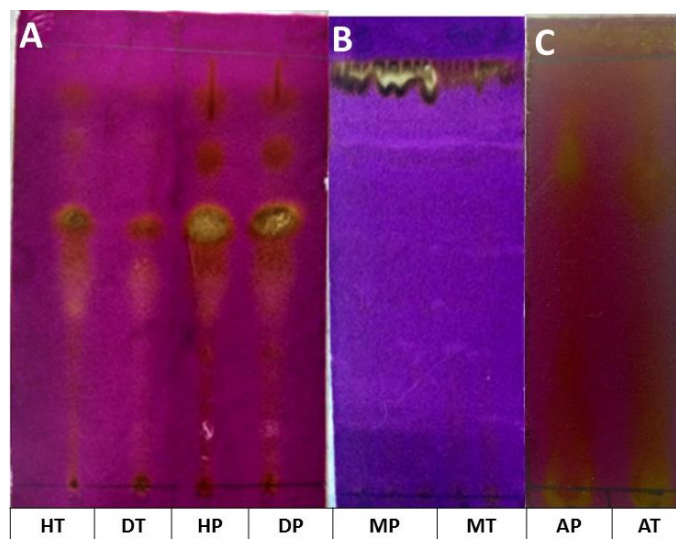


Figura 16. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: KMnO_4 10%. A: Extracto acuoso, D: Extracto diclorometánico, H: Extracto hexánico, M: Extracto metanólico, P: Puebla y T: Timilpan.

Así mismo, se corrieron placas para identificar glucósidos cardiotónicos utilizando el revelador de Baljet y el revelador de Bornträeger para la identificación de cumarinas y antraquinonas. En ambos casos los resultados fueron negativos, en correspondencia con lo registrado en las pruebas colorimétricas (Tabla 6). Respecto a los glucósidos cardiotónicos, las pruebas colorimétricas indican la presencia de estos compuestos, mientras que en las placas cromatográficas no se revela, por lo que es de suponerse que en las pruebas colorimétricas se obtuvo un falso positivo.

Para el caso de los alcaloides se utilizaron reveladores como Wagner y Dragendorff, dando un resultado negativo para todos los extractos, sin embargo, al hacer el revelado de la placa aparecieron manchas blanquecinas, lo cual puede deberse a que los reveladores además de reaccionar con alcaloides, también reaccionan con compuestos insaturados (Sigma Aldrich, 2016).

Finalmente y como parte de uno de los principales objetivos del presente trabajo, se corrieron placas, las cuales fueron reveladas con el reactivo de DPPH. Esto se hizo con la finalidad de monitorear la presencia de compuestos con actividad antioxidante en los extractos obtenidos. Todos los extractos dieron prueba positiva, tomándose como resultado positivo aquellas placas que después de esperar 30 min revelaron coloración amarilla sobre un fondo violeta al utilizar DPPH (Fig. 17)

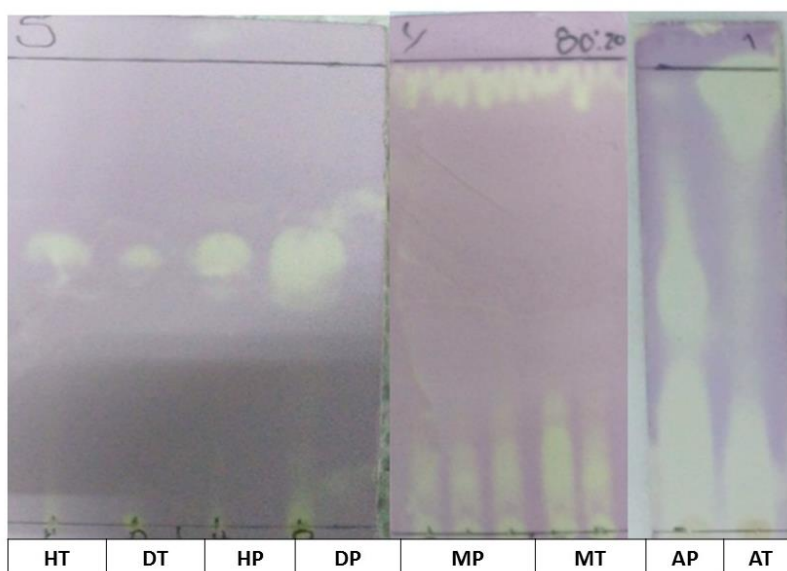


Figura 17. Placas cromatográficas de los extractos; revelador: DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). A: Extracto acuoso, D: Extracto diclorometánico, H: Extracto hexánico, M: Extracto metanólico, P: Puebla y T: Timilpan.

7.3.3 Cuantificación de metabolitos secundarios

Los contenidos de fenoles y flavonoides totales, taninos condensados, alcaloides, saponinas y azúcares reductores determinados en los diferentes extractos se reportan a continuación.

7.3.3.1 Flavonoides

De nuestro conocimiento, no existen reportes sobre la presencia de flavonoides en raíces de *I. heterophylla*. En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de flavonoides, siendo su concentración de 154-188 mg EQ/g extracto, en los extractos acuosos y metanólicos en los dos sitios de colecta Timilpan y Puebla de las raíces de la especie.

Sin embargo, en los extractos de diclorometano y hexano no se pudo determinar la cantidad de flavonoides totales debido a que al efectuar la reacción con el extracto, está presente un aspecto lechoso que impidió la lectura en el espectrofotómetro. Por otra parte, si consideramos la polaridad de los flavonoides y de los solventes hexano y diclorometano, las polaridades son opuestas, por lo que probablemente, en estos solventes no hayan extraído ningún tipo de flavonoide, ocurriendo lo contrario al utilizar solventes polares como el metanol y el agua.

La Fig. 18 permite apreciar que el extracto con la significativamente mayor cantidad de flavonoides es el metanólico con 188.81 ± 0.13 y 180.93 ± 0.04 mg EQ/ g de extracto para Puebla y Timilpan respectivamente. Por otra parte, los contenidos de flavonoides encontrados en la raíces de ambas poblaciones estudiadas son similares, por lo que podemos afirmar que las variaciones entre ambas regiones geográficas no son relevantes. Pienso que estadísticamente el extracto metanólico presenta el mayor contenido de flavonoides, independientemente del sitio de colecta

Al comparar nuestros resultados con los reportados en la literatura para otras raíces, podemos observar que la cantidad de flavonoides reportados en el presente trabajo (extractos metanólico y acuoso) son significativamente mayores a los reportados para *Ibervillea sonorae*, 3 y 5 mg EQ/g de extracto para el extracto metanólico y acuoso respectivamente (Ramírez et. al., 2016). Tanto *I. heterophylla* como *I. sonorae* son especies cuyas raíces son utilizadas en la medicina tradicional como coadyuvantes en el tratamiento de la diabetes, siendo *I. sonorae* una especie altamente comercializada para este propósito, mientras que *I. heterophylla* solo se utiliza de forma local.

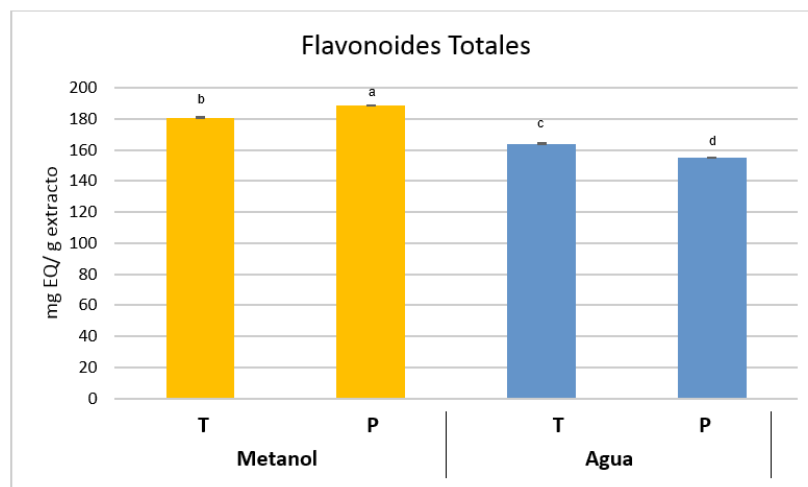


Figura 18. Contenido de flavonoides totales en los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras denotan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$).

7.3.3.2 Fenoles totales

Los resultados obtenidos para el contenido de fenoles totales se presentan en la Figura 19. De los diferentes tipos de extractos, los acuosos presentaron el significativamente mayor contenido de fenoles totales con 443.24 ± 6.76 y 409.17 ± 29.51 mg EAG/g de extracto, para Timilpan y Puebla, respectivamente. Los extractos metanólicos también presentaron una concentración de fenoles importante con 328.24 ± 1.92 (T) y 327.87 ± 5.01 (P) mg EAG/g extracto. Destacando que el sitio de colecta no influye en el contenido de este tipo de compuestos. Ríos (2000) realizó un estudio en raíces de la misma especie aquí analizada, reportando un contenido de fenoles totales de 13.8 mg EAG/g en extractos metanólico de raíz, siendo este resultado inferior al encontrado en el presente trabajo ($328.24 \text{ mg EAG/g de extracto} = 17.7 \text{ mg EAG/g de raíz}$).

Son diversos los reportes etnobotánicos donde se indica la utilización de raíces u hojas de varias especies vegetales para el tratamiento de la diabetes o bien para las diversas complicaciones causadas por dicha enfermedad. Dentro de estas especies destacan las raíces de wereque (*I. sonorae*) y del nopal (*Opuntia ficus-indica*) o bien las hojas de tronadora (*Tecoma stans*), entre otras (Ramírez et al., 2016). Los contenidos de fenoles totales reportados para las especies mencionadas varían entre 204.82 mg EAG/g de extracto para la hoja de tronadora, 40 mg EAG/g de extracto para las raíces de nopal y 14.42 mg EAG/g de extracto para las raíces de wereque (Ramírez et al., 2016). El contenido de fenoles totales encontrado en el presente trabajo para las raíces de *I. heterophylla*, es significativamente mayor a dichas especies.

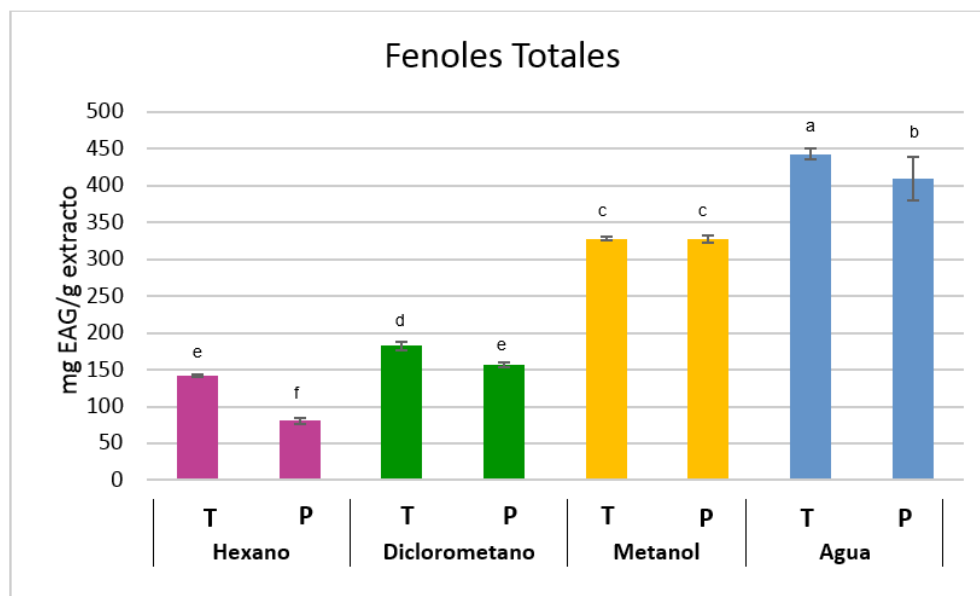


Figura 19. Contenido de fenoles totales en los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras denotan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

7.3.3.3 Taninos condensados

La cuantificación de taninos condensados en la raíz de *I. heterophylla* es fundamental para los propósitos del presente trabajo, ya que estos compuestos han sido muy estudiados respecto a su actividad antioxidante, dado que estos metabolitos han demostrado ser secuestradores efectivos de radicales libres, los cuales inhiben la oxidación de tejidos, exhibiendo mejores resultados que la vitamina C, la vitamina E y el β -caroteno (Fine, 2000). También, se ha demostrado que estos compuestos tienen una preferencia por neutralizar el radical libre hidroxilo (OH^{\cdot}). Aunado a esto se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacteriana o bacteriostática, anticarcinogénica, inhibidora de la peroxidación lipídica (Okuda, 2005), y de la agregación plaquetaria relacionada a la formación de trombos en sistema circulatorio (Fine, 2000). Por todo lo anterior la detección, extracción y cuantificación de estos metabolitos estaría fundamentando, unas de las propiedades terapéuticas que la etnobotánica de *I. heterophylla* ha reportado.

El contenido de taninos condensados encontrado en los diferentes extractos obtenidos se reporta en la Figura 20. Los extractos metanólicos de ambas poblaciones (P y T) registraron el significativamente mayor contenido de taninos condensados con 209.29 ± 10.86 y 224.36 ± 5.36 mg EC/g de extracto, respectivamente. Mientras que el extracto hexánico arrojó el menor registro. Por otro lado, el sitio de colecta no muestra influencia en el contenido de este tipo de compuestos para el extracto acuoso y diclorometánico. Estos resultados denotan el alto contenido de taninos condensados en las raíces de la especie bajo estudio, que junto con los altos contenidos registrados de fenoles y flavonoides, pueden incidir importantemente en el poder antioxidante de la planta estudiada, y éstos metabolitos potencialmente estén asociados a la actividad biológica reportada para la especie.

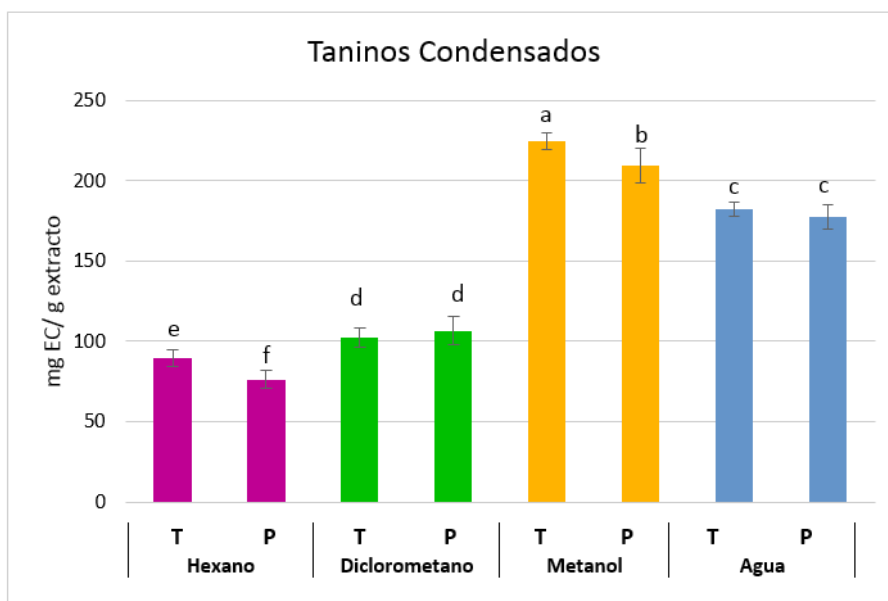


Figura 20. Contenido de taninos condensados en los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras denotan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

7.3.3.4 Saponinas

El significativamente mayor contenido de saponinas totales se registró en el extracto hexánico, obteniéndose 480.61 ± 8.12 y 360.15 ± 21.81 mg EDiosg/g de extracto para las poblaciones de Timilpan y Puebla respectivamente. Observando que existe diferencia por el sitio de colecta, las plantas colectadas en Timilpan muestran mayor contenido de saponinas que las de Puebla. Por otro lado, se observa que la polaridad del solvente es crucial en la extracción de saponinas, debido a que la extracción fue inversamente proporcional a la polaridad del solvente (Fig. 22).

Aguilar y colaboradores (1993) reportan la presencia de diterpenos en raíces de *I. heterophylla*, dichos resultados coinciden con lo reportado en el presente trabajo. Las saponinas totales reportadas aquí, engloban los diterpenos, saponinas triterpénicas o esteroideas, las cuales se identificaron en las pruebas cualitativas descritas en la subsección 7.3.2.

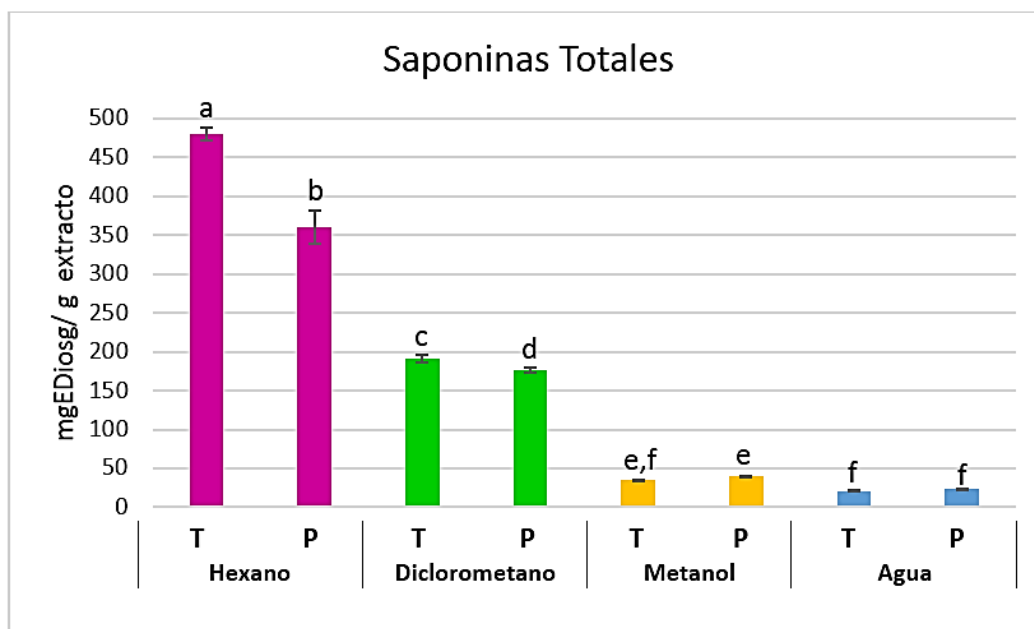


Figura 21. Contenido de saponinas totales en los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras denotan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

7.3.3.4 Azúcares reductores

El método utilizado para determinar azúcares reductores lo que hace es hidrolizar la muestra. Estos azúcares simples no pueden ser hidrolizados a moléculas más pequeñas y pueden reaccionar como reductores con otras moléculas (Rojas *et al.*, 2015).

El extracto metanólico de raíces colectadas en Timilpan, mostró el significativamente mayor contenido de azúcares reductores (130.67 mg Eglu/g de extracto), mientras que los extractos hexánico y diclorometánico registraron los resultados más bajos (Fig. 23).

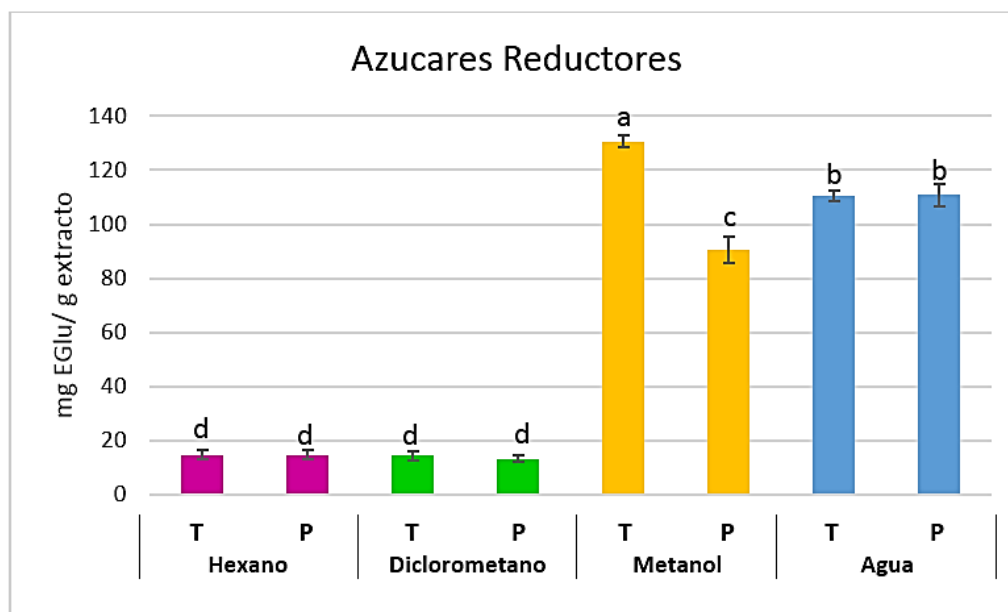


Figura 22. Contenido de azúcares reductores en los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras denotan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

7.3.3.5 Alcaloides totales

Se realizaron pruebas cualitativas para determinar la presencia de alcaloides, sin embargo, los resultados presentaron un grado de incertidumbre importante. Principalmente en las evaluaciones cromatográficas, ya que las bandas que aparecieron en las placas, no ofrecen certeza de la correspondencia para alcaloides, por lo que se procedió a la cuantificación de estos metabolitos por el método de Shamsa y colaboradores (2008). Se eligió este método debido a que el complejo obtenido es muy estable y es nula o muy escasa la interferencia por otros compuestos.

La implementación de dicho método evidenció la presencia de alcaloides, sin embargo, el contenido encontrado es muy pobre, oscilando entre los 2.55 a los 10.12 mg EGra/g de extracto (Fig. 21). Se ha reportado el contenido de alcaloides en extractos metanólico de raíz de *Sechium edule* (chayote) mostrando 44 ± 0.1 mg EGra/g extracto (Piantzi, 2017).

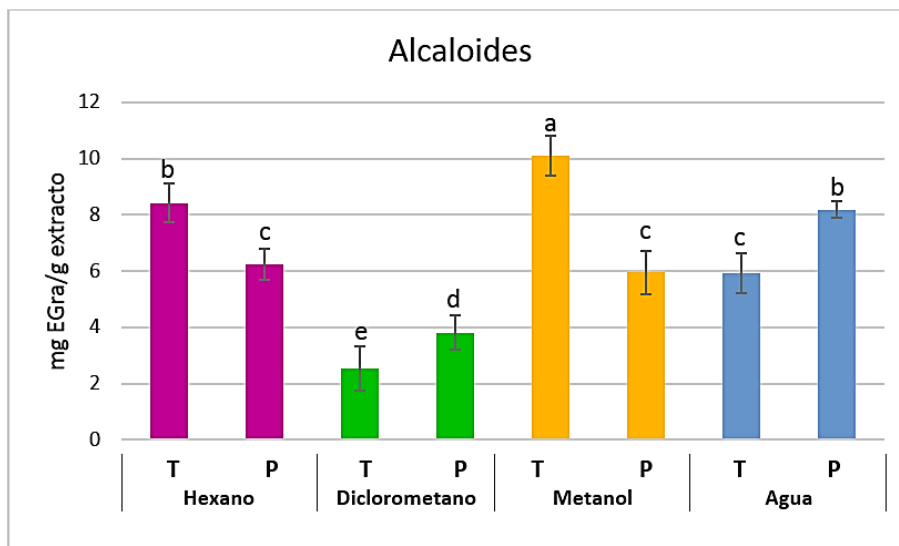


Figura 23. Contenido de alcaloides totales en los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras denotan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

Con base a los resultados, se puede afirmar que la composición de metabolitos secundarios que se encuentra en las raíces de *I. heterophylla* está comprendida principalmente por fenoles, flavonoides, saponinas y taninos condensados. A estos compuestos se les han atribuido diferentes propiedades, entre ellas la antioxidante (Rice et al., 1996), antiinflamatorios (Middleton et al., 2000; Ganesan et al., 2010), antimicrobianos (Reddy et al., 2007), antifúngicos (Aguilar et al., 2001), analgésica, adrenocorticotrópica, antiulcerante, hemolítica, espermicida, hipoglucemiante, insecticida, contraceptiva, cardiovascular, cicatrizante, citotoxicidad, espasmolítica y expectorante (Man et al., 2010). Con estos atributos, las aplicaciones potenciales de los extractos obtenidos y de las raíces de la planta misma podrían ser diversas, sobre todo en la industria farmacéutica y cosmética.

7.4 Determinación de la capacidad antioxidante

7.4.1 Método DPPH

Los resultados obtenidos para la determinación de la actividad antioxidante a través del método de DPPH se muestran en la Figura 24.

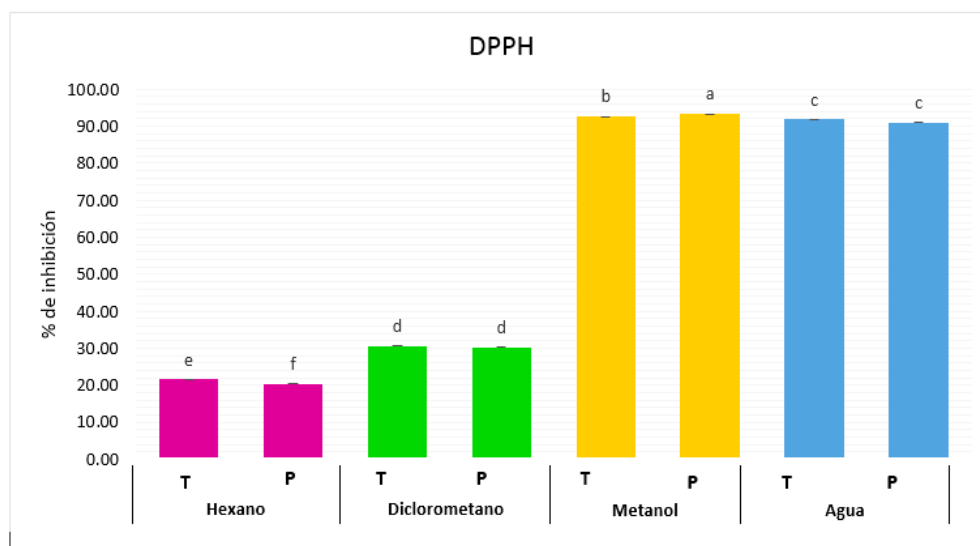


Figura 24. Resultados de la capacidad antioxidante por el método DPPH de los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras representan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

Los extractos que registraron la mayor actividad antioxidante fueron los extractos obtenidos con metanol y agua (figura 24), con un porcentaje de inhibición superior al 90%. Estos resultados coinciden con el alto contenido de fenoles, flavonoides y taninos condensados encontrados en ambos extractos, lo que indica que potencialmente existe una relación directa entre el contenido de fenoles, flavonoides y taninos condensados con respecto a la actividad antioxidante registrada, en otras palabras, los compuestos fenólicos contenidos en las raíces de *I. heterophylla* poseen una inmejorable actividad antioxidante. Cabe señalar que no necesariamente un alto contenido de compuestos fenólicos implica una alta actividad antioxidante. En este sentido, podemos afirmar que los extractos acuosos y metanólicos de la raíz de *I. heterophylla* son una fuente natural de antioxidantes, los cuales pudiesen intervenir en la conservación de la función de las células β previniendo la diabetes inducida por la formación de ROS (Durgeshnandani et al., 2014).

Dentro de este mismo contexto, encontramos en la literatura numerosos trabajos sobre la determinación de la actividad antioxidante de diversas especies vegetales. Por citar algunos ejemplos, Muñoz y Gutiérrez (2016) reportan que el extracto metanólico de la raíz de *Nicotiana glauca* exhibió un porcentaje de inhibición del 63.64%; Tovar (2013) reporta el porcentaje de inhibición de 30 plantas medicinales, destacando entre estas *Topobea cf discolor* y *Alchornea grandis* con porcentajes de inhibición de 46,58 y 39,27%

respectivamente. Estos resultados colocan a la raíz de *I. heterophylla* como una especie con un potencial enorme para ser explotada y estudiada en este sentido.

7.4.2 Método ABTS

Los resultados obtenidos para la determinación de la actividad antioxidante a través del método de ABTS se muestran en la Figura 25.

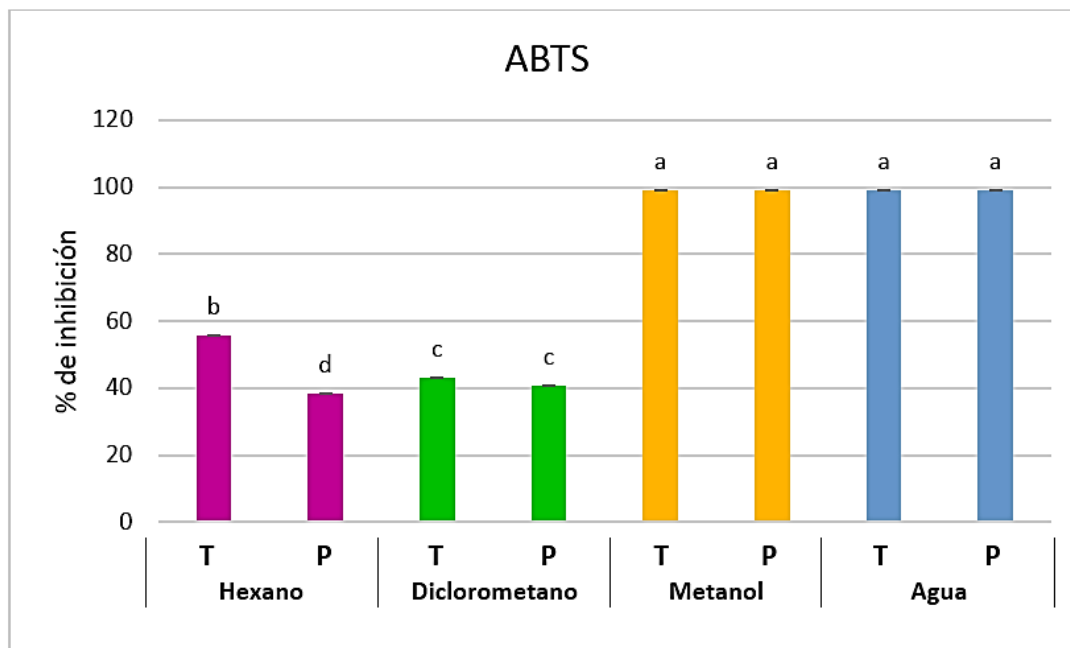


Figura 25. Resultados de la Capacidad Antioxidante por el método ABTS de los extractos de la raíz de *I. heterophylla*. P: Puebla y T: Timilpan. Los datos representan el promedio de dos repeticiones. Las barras representan la DS. Valores con letras distintas en superíndice denotan diferencias significativas con la prueba LSD ($p \leq 0.05$)

Al igual que en el caso del método de DPPH, los extractos que registraron la mayor actividad antioxidante al utilizar el método por ABTS fueron los extractos obtenidos con metanol y agua, con un porcentaje de inhibición del 99% (Fig. 25). Por otro lado, es importante resaltar que el porcentaje de inhibición registrado en los extractos obtenidos con hexano y diclorometano por ABTS, es significativamente mayor a los registrados con el método de DPPH (Fig. 24-25)

Tovar (2013) reporta que extractos metanólicos de las especies *Topobea cf discolor*, *Blepharodon grandifolium* y *Mandevilla veraguensis* registraron porcentajes de inhibición de 92.70, 38.16 y 36.98, respectivamente. Estos resultados son inferiores a los registrados en el presente trabajo, por lo que se puede afirmar que las raíces de *I. heterophylla* poseen metabolitos que exhiben una actividad antioxidante superior a otras especies vegetales.

Se puede observar que se obtienen mayores porcentajes de inhibición con el método ABTS que con el de DPPH, esto se debe a que los 2 métodos manejan longitudes de onda diferente (ABTS^{•+} (732 nm) y DPPH (517 nm)). En este sentido, la región visible del espectro

presenta interferencias en la medición de compuestos coloridos, afectando de una manera más importante al método de DPPH (Beserra et al., 2011). Otra razón podría ser el mecanismo de reacción del DPPH[•] con los antioxidantes, lo cual está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos. Es decir, un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejor actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH[•] está impedido estéricamente (Beserra et al., 2011). Por otro lado, esta diferencia podría estar basada en la reacción reversible del radical DPPH[•] con fenoles como eugenol y sus derivados, lo cual llevaría a bajas lecturas de actividad antioxidante. Además, el DPPH[•] es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH[•] (Brand et al., 1997).

7.5 Análisis de los extractos por HPLC-DAD.

Los extractos obtenidos (hexano, diclorometano, MeOH y Agua) fueron analizados por HPLC-DAD con la finalidad de identificar la composición e identidad química de algunos de los compuestos fenólicos presentes en estos. Los perfiles cromatográficos (cromatogramas) se obtuvieron a 290, 253 y 349 nm tanto para los estándares como para los extractos (Anexo 6).

Una vez obtenidos los cromatogramas, se realizó un análisis comparativo con base con los tiempos de retención registrados por los diferentes estándares utilizados y los tiempos de retención registrados por los extractos (Tabla 7).

Tabla 7. Tiempos de retención obtenidos a través del perfil cromatográfico de los extractos de raíz de *I. heterophylla* y los estándares

NÚMERO DE PICO	TIPO DE EXTRACTO	TIEMPO DE RETENCIÓN OBTENIDO (min)	TIEMPO DE RETENCIÓN DEL ESTÁNDAR (min)	COMPUESTO
1	HP	15.139	14.934	QUERCETINA
2	HT	15.101		
3	DT	15.048		
4	MP	6.916	7.009/7.048	ÁCIDO CLOROGÉNICO
5	MT	6.906		
10	AP	6.925		

11	AT	6.956		
6	MP	7.450/7.623	7.363/7.445	ÁCIDO CAFEICO
7	MT	7.443/7.606		
12	AP	7.621	7.739/7.858	EPICATEQUINA
13	AT	7.659		
8	MP	12.773	12.942/12.993	HESPERIDINA
9	MT	12.771		
14	AP	12.781		
15	AT	12.815		

El análisis de los tiempos de retención obtenidos permitió identificar cinco diferentes compuestos, estos son: quercetina, ácido clorogénico, ácido caféico, epicatequina y hesperidina.

Existen diferentes reportes sobre la actividad biológica de los compuestos encontrados e identificados. La quercetina muestra efectos sinérgicos con el ácido ascórbico de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo. Por otra parte, se ha demostrado que el flavonoide inhibe la fotooxidación de la vitamina E en la membrana celular de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador (Pace *et al.*, 1995). Asimismo, se ha puesto de manifiesto que inhibe la peroxidación lipídica producida por el hierro y aumenta la concentración de glutatión en la mucosa intestinal (Merck, 2000).

Se ha reportado que la epicatequina es un flavonoide que disminuye los niveles de glucosa promoviendo el metabolismo de captación de glucosa mediante la inhibición de gluconeogénesis hepática o por la absorción de la glucosa en los tejidos musculares y adiposos ya sea a través de la estimulación de un proceso de regeneración y la revitalización de las células β restantes para liberar insulina (García, 2013).

En el caso del ácido caféico, estudios *in vitro* de células han revelado que incubados en presencia de LDL, incrementan la protección de estas lipoproteínas contra la oxidación. Además, se reporta que reduce la aparición de tumores, brinda protección a la corteza cerebral, es inmunoregulador, aumentando las células T y el nivel de defensas corporales (Van *et al.* 2008).

El ácido clorogénico posee efectos sobre el metabolismo de la glucosa ya que inhibe a la α -glucosidasa y la glucosa-6-fosfatasa, lo que podría producir un retraso en la absorción intestinal de la glucosa. Este efecto podría explicar igualmente la reducción de la glucemia postprandial al producir un aumento de la secreción del péptido análogo al glucagón, con

la correspondiente disminución de la secreción de insulina. Adicionalmente, la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa puede reducir la producción hepática de la glucosa, contribuyendo a la reducción de las concentraciones en ayunas de insulina después de la administración del ácido clorogénico (Van *et al.* 2008). Posee también propiedades antioxidantes y anti-inflamatoria (Martos, 2013).

Mientras que la hesperidina se utiliza principalmente como protectora de los capilares, es eficiente para el tratamiento de varices o hemorroides, también evita las úlceras, reduce los niveles de colesterol y tiene propiedades sedantes, posee actividad similar a la de las vitaminas (propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antialérgicas). Tamilselvam (2013) confirmó los efectos protectores de la hesperidina en la neurotoxicidad inducida mediante la normalización del estrés oxidativo y la inflamación.

Es importante mencionar que dentro de los perfiles cromatográficos se encontraron algunos picos con absorbancias importantes, sin embargo, estos no coinciden con ningún tiempo de retención de los estándares analizados, lo cual deja en incógnita la identidad de estos compuestos cuya concentración es considerable.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

El uso de la extracción secuencial por polaridad creciente de los solventes empleados, es una herramienta adecuada para la obtención de compuestos con actividad antioxidante contenidos en la raíz de *I. heterophylla*.

Se obtuvo el tamizaje fitoquímico de la raíz de *I. heterophylla*, donde los principales compuestos encontrados fueron: fenoles, flavonoides, taninos condensados, saponinas esteroideas y triterpénicas, compuestos insaturados y terpenos.

El mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, así como de taninos condensados se obtuvo en los extractos metanólicos y acuosos.

El análisis por HPLA-DAD permitió identificar cinco diferentes compuestos: quercetina, ácido clorogénico, ácido cafeico, hesperidina y epicatequina.

La actividad antioxidante exhibida por los diferentes extractos obtenidos fue alta, siendo los extractos metanólico y acuoso los que presentaron una mayor capacidad de captación de radicales libres con un porcentaje del 91 y 99% para el método de DPPH y ABTS respectivamente.

La actividad antioxidante de la raíz de *I. heterophylla* probablemente relacionada con la prevención y tratamiento del pie diabético, así como en la disminución de algunos efectos secundarios de la DMII.

Las raíces de *I. heterophylla* son una fuente importante de antioxidantes, con potencial actividad farmacológica contra desordenes del metabolismo de la glucosa y sus complicaciones.

CAPITULO IX

PERSPECTIVAS

Realizar un análisis por HPLC-masas de los diferentes extractos obtenidos, con el fin de determinar la totalidad de compuestos contenidos en los mismos.

CAPITULO X

REFERENCIAS

1. Aguilar M.I., Delgado G. 1995 Novel bisabolene glycoside and other constituents from the medicinal plant *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *J Natural Products*. **7**, 155-162
2. Aguilar M.I., Delgado G., Bye R. and Linares E. 1993. Bisabolene, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Iostephane heterophylla*. *Phytochemistry* 33:1161-1163.
3. Aguilar M.I., Delgado G., Hernández M.L. and Villarreal M.L. 2001. Bioactive compounds from *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *Natural Product Letters* 15:134-136.
4. Alam Md. N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. 2012. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*; 21: 143-152.
5. Assis, R.; Dos santos, L.; Flores, V. 2007. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics sonochemistry*, 14, 6-12.
6. Avalos, J. 2014. Actividad citotóxica y estudio fitoquímico de los extractos de semilla y hoja de Neem (*Azadirachta indica A.Juss*) de origen regional (Ébano, San Luis Potosi) comparada con la comercializada en India. Facultad de Ciencias Biologicas: Universidad Autónoma de Nuevo León.
7. Avello, M., & Suwalsky, M. 2006. Radicales Libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea*, (494), 161–172. <https://doi.org/10.4067>
8. Azuola, R. y Vargas, P. 2007. Extracción asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*. 20(4),30-40. <http://doi.org/ISSN:0379-3962>
9. Baccou, J. C., Lambert, F., and Sauvaire, Y. 1977. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. *Analyst* 102 (1215):45865
10. Guerra J, Nogueiras C, Delgado R, Hernández, O. 2001. Determinación cuantitativa de saponinas y azúcares reductores del *Agave brittoniana* T. *Revista Cubana de Química*, 13(3): 37-4
11. Bohlmann y Le Van Ngo. 1977. Neue Kaurensäure-derivative aus *Wedelia*-arten. *Phytochemistry* **16**, 579-581
12. Brad-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology*. 25-30.
13. Brand-Williams B., Berset W. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *LWT - Food Science and Technology*; 30: 609-615.
14. Bruneton J, 1991. *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. Editorial Acirbia, S.A. Royo, 23 – 50006 Zaragoza, España. Pp. 32
15. Cannel, Richard J. P., 1998. *Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation*. Glaxo Wellcome & Development, Stevenage, UK. Humana Press Inc. Totowa, N.J. Vol. 4. 1-285.
16. Carretero Accame, M. E. 2000. Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual del Medicamento*. 24(235): 633-636.
17. Coronado, M., Vega-León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>

17. Cressey, P; Saunders, D y Goodman, J. 2013. Cyanogenic glycosides in plant-based foods available in New Zealand. (online). Food Additives & Contaminants. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment. 30 (11):1946-1953
18. Deng J., Cheng W., Yang G. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. Food Chemistry; 125: 1430–1435.
19. Dominguez X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica, Limusa, pp39-44.
20. Elejalde, J. 2001. “Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes”, AN. Med. INTERNA (Madrid). 18 (6):326-335,
21. Enríquez, C. 2015. Fitoquímica Manual de Practicas. Facultad de Química: Universidad Autónoma del Estado de México. Pp 12-13, 18-21, 29-31
22. FINE, A. 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical applications. Alternative Medicine Reviews 55:144-15
23. Ganesan S., Faris A. N., Comstock, A. T., Chatteraj S. S., Chatteraj A., Burgess J. R., Curtis J. L., Martínez F. J., Zick S., Hershenson M. B., Sajjan U. S. 2010. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. Respiratory Research. 11: 131.
24. García, A. 2013. efecto de la (-)-epicatequina sobre el metabolismo de ácidos grasos y proteína CD36 en el modelo de rata Wistar inducida a la diabetes. Facultad de Ciencias Químicas: Universidad Veracruzana.
25. García, CM. Kim, P. Bich, NB. Tillan, NT. Romero, J. C. Dario, JA. y Fuste, V.M. 2009. Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora Incarnata* L, *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 14(2): 1-5.
26. García, J. 2016. Diferencias observadas en la morfología descriptiva externa y análisis de la composición química realizada sobre patrones del género *Diospyros*. *Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural: Universitat Politècnica de València*.
27. González Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. 2014. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach. Ultrasonics Sonochemistry, 21(6), 2176–2184. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.021>
28. González, E. y Sotomayor, C. 2005. Efecto Alelopático de Glucosidos Cianogénicos Sobre Plántulas de Duraznero Nemaguard. Cien. Inv. Agr. 32 (1): 13-18
29. Henrick, C y Jefferies, P. 1964. The diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. Australian Journal of Chemistry 17, 915-933
30. Herrera, I., Quimis, K., Sorroza, N., García, F., Mariscal, W. y Mariscal, R. 2017. Determinación de taninos y cumarinas presentes en la planta de tres filos. Polo del Conocimiento. 2(7): 500-522
31. Hicks, J., Torres, Y., & Sierra-Vargas, M. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. Revista de Endocrinología Y Nutrición, 14(4), 2–5.
32. Hostettmann, K., & Marston, A. 1995. Chemistry and pharmacology of natural products— Saponins. Cambridge: Cambridge University Press.
33. Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 53: 1841–1856.

34. Hybertson, B.M., Gao, B., Bose, S.K. y McCord, J.M. 2011. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*. 32(4–6): 234-246.
35. Ilza, F. y Pinotti, M. 2000. Cyanogenic Glycosides in Plants. (online). *Braz arch Biol technol.*, 43 (5): 487-492
36. Khanbabaee, K & van Ree, Teuns. 2002. Tannins: Classification and Definition. *Natural product reports*. 18. 641-9.
37. Linares M., E. & Bye R., 1987. "A study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States". *Journal of Ethnopharmacology*, 19: 153-187.
38. Llacuna, L., & Mach, N. 2012. Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Española de Nutrición Humana Y Dietética*, 16(1): 16–24. [https://doi.org/10.1016/S2173-1292\(12\)70067-4](https://doi.org/10.1016/S2173-1292(12)70067-4)
39. Llenera A. 2011. "Metabolitos Secundarios", Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.
40. Lock, O., Cabello, I. y Doroteo, V. 2006. Práctica VI.6 Análisis de flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú; Departamento de Ciencias – Sección Química, Apartado 1761. Lima – Perú
41. López-Martínez L.X., García-Galindo H.S. 2010. Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia Revista de Investigación de la Universidad De La Salle Bajío*. Vol. 2. No. 3. Versión On-line
42. Man S, Gao W, Zhang Y, Huang L, Liu Ch. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81:703-714.
43. Martínez M. 1989. *Las Plantas Medicinales de México*. Botas. México, D.F.
44. Martínez, J. 2007. "Evaluación de la Actividad Antioxidante de Extractos Orgánicos de Semillas de *Helicarpus Terebinthinaceus*", Universidad Tecnológica de la Mixtec.
45. Matamoros, M. 2013. "Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en extractos de *Ibervillea sonora*."
46. Merck, S.A. Industrias Químicas. 2000. *Bioflavonoides: Quercetina y Rutina*. Informe a Profesionales
47. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34.
48. Middleton E. Jr., Kandaswami C., y Theoharides T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cáncer. *Pharmacological Reviews*. 52(4): 673–751.
49. Mijangos, O. 2010. Optimización de métodos de extracción acelerados mediante energías auxiliares y caracterización de la fracción fenólica de *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa*. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional: IPN Oaxaca
50. Muñoz, A. y Gutiérrez, D. 2006. Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
51. Oberti, J. C., Pomilio, B. y Gros, E. 1980. Diterpene and sterols from *Wedelia Glauca*. *Phytochemistry* 19, 1051-1052

52. Ohno, N., Gershenzon, J., Neuman, P. y Mabry, T. 1981. Diterpene carboxylic acids and a heliangolide. *Phytochemistry*. 20, 2393-2395
53. Ojha H., Mishra K., Chaudhury N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*; 130: 1036–1043.
54. OKUDA, T. 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66:2012-2031.
55. OMS. 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. Hong Kong SAR, China.
56. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, , 235:207-219.
57. Pareja S.E., Carrascal M., Díaz F. 2010. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos etanólicos totales de frutos y semillas de 36 plantas de la región caribe colombiana. Artículo de revisión. Quinto encuentro institucional de semilleros de investigación. Universidad de Cartagena. Colombia.
58. Pengelly, A. 1996. *The constituents of Medicinal Plants*. 2nd Ed. Cabi Publishing, U. K.
59. Prado, R. 2015. Productos naturales con efectos anticorrosivos y generadores de copolímeros. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 23-27
60. Piantzi, V. 2017. Perfil fitoquímico y evaluación del efecto citotóxico de extractos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada: IPN-Tlaxcala.
61. Pyreck, J. 1970. New pentacyclic diterpene acid Trachyloban-19-oic from sunflower. *Tetrahedron* 26, 5029-503
62. Quiroga, P. y Olmos, V. 2009. Revisión de la Toxicocinética y la Toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros. *Acta Toxicol Argent*. 17 (1): 20-32
63. Rajendraprasad, N., Basavaiah, K., Vinay, K. B. 2010. Sensitive spectrophotometric determination of lamotrigine in bulk drug and pharmaceutical formulations using bromocresol green. *Eclética química*. 35 (1), 55-66
64. Ramírez-Ortiz, M.E., Rodríguez-Carmona, O.Y., HernándezRodríguez, O.S., Chel-Guerrero, L. y Aguilar-Méndez, M.A. 2016. Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de la tronadora, wereque y raíz de nopal. En: *Alimentos Funcionales de hoy*. M.E. Ramírez Ortiz (ed), pp 143-180. OmniaScience. Barcelona, España.
65. Re R., Pellegrini Ni., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*; 26: 1231–1237.
66. Reddy M. K., Gupta S.K., Jacob M. R., Khan S. I. Ferreira d. 2007. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin- Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Med*. 73(5): 461.
67. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933-956.

68. Ringuélet, J. y Viña, S. 2013. *Productos Naturales Vegetales*. Argentina: Editorial Universidad de la Plata., 258 pp. ISBN: 978-950-34-0971-8
69. Rivera-Ramírez, F., Escalona-Cardoso, G.N., Garduño-Siciliano, L., Galaviz-Hernández, C. y Paniagua-Castro, N. 2011. Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011: 1-6.
70. Robles-García, M., Aguilar, A., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., MoralesDel-Río, J., Guerrero-Medina, P., Del-Toro-Sánchez, C. 2016. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri pittier*). *Biotecnia*, XVIII(3), 3–8.
71. Rubio, J., López, J., Vázquez, M., & Alcaraz, Y. 2016. Evaluación de la actividad antioxidante de análogos del BHT. *Verano de La Investigación Científica*, 2(1): 351–354.
72. Samprieto D.A., Catalan C., valtuone M. 2009. Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. Science publishers.
73. Samprieto D.A., Catalan C., valtuone M. 2009. Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. Science publishers
74. Santa, J. 2009. Estudio de antraquinonas presentes en extractos de mucilago y hojas de aloe vera de planta cultivadas en la región cafetera. Facultad de tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira.
75. Sanchez, V., Villalobos, V., Arguedas, P. y Monge, A. 2018. Estudio de las propiedades antioxidantes del ácido cafeico como agente reductor del riesgo de aterosclerosis a partir de la β -oxidación de las LDLc. Universidad de Iberoamérica (UNIBE), Facultad de Farmacia.
76. Seaman, F. C. 1982. "Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae." *Bot. Rev.* 48: 121-595.
77. SERRATOS, J. et al. 2008. Composición químico-nutricional y de factores anti nutricional en semillas de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *INCI*. 33 (11):1-6
78. Sestili P, Diamantini G, Bedini y cols. 2002. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem J*, 364:121-128.
79. Shahidi, F.; Janitha, P. K.; Wanasundara, P. D.1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32 (1), 67103.
80. Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*.32:17-20.
81. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-rizi, M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 17-20.
82. Sharapin, N. 2000. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Primera)*. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello.
83. Tamilselvam, K.; Braidy, N.; Manivasagam, T.; Essa, M. M.; Prasad, N. R.; Karthikeyan, S.; Thenmozhi, A. J.; Selvaraju, S.; Guillemin, G. J. 2013. Neuroprotective effects of

- hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 102741.
84. Tiwari. Prashant; Kumar, Bimlesh; Kaur, Mandeep; Kaur, Gurpreety Kaur, Harleen. 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, vol. 1, pp.98-106
 85. Tobón, N. 2015. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica L.*) variedad Castillo. Corporación Universitaria Lasallista: Facultad de Ingenierías. Caldas Antioquia.
 86. Tovar, J. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Escuela de Tecnología Química, Facultad de Tecnología, Universidad tecnológica de Pereira.
 87. Trejo Márquez Ma. A., Pascual Bustamante S. 2010. Taller Multidisciplinario de Procesos Tecnológicos de Frutos y Hortalizas. Práctica 4 Evaluación de capacidad antioxidante y determinación de fenoles totales para frutos. 10-11
 88. Valdés J. and Flores H. 1985. Historia de las plantas de Nueva España. In: Comentarios a la Obra de Francisco Hernández. Obras Completas, Tomo VII, pp. 7-222, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
 89. Valencia C. O. 1995. Fundamentos de fitoquímica. Editorial Trillas. México. D. F. 11- 31.
 90. Valladolid, M. 2014. Determinación cuantitativa de glucósidos cianogénicos presentes en doce especies vegetales medicinales cultivadas en el Ecuador. Universidad Técnica de Machala: Ecuador. Pp. 26-30
 91. Valladolid, M. 2014. Determinación cuantitativa de glucósidos cianogénicos presentes en doce especies vegetales medicinales cultivadas en el Ecuador. Universidad Técnica de Machala: Ecuador. Pp. 26-30
 92. Van Dijk, A. E., Olthof, M. R., Meeuse, J. C., Seebus, E., Heine, R. J., & van Dam, R. M. 2009. *Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance.* *Diabetes Care*, 32(6), 1023–1025. doi:10.2337/dc09-0207
 93. Venereo, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12384730-0.00046-X>
 94. Villavicencio M.A. 1995. Plantas Útiles del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma de Hidalgo, Pachuca.
 95. Zagrobelny, M; Bark, S. y Moller, B. 2008. Cyanogenesis in plants and arthropods. Elsevier. 69 (7): 1457-1468
 96. Zamora-Natera, F., García-López, P., Rodríguez-Macías, M. R., Salcedo-Pérez, E. 2009. Composición y concentración de alcaloides en *Lupinus exaltatus* Zucc. durante su crecimiento y desarrollo. *INCI*. 34 (9), 672-676.
 97. Zuleta A., Esteve M., Frigola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*; 114: 310-31

ANEXOS

Anexo 1. PRUEBAS COLORIMÉTRICAS CUALITATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

1.1 Cumarinas

A partir del extracto se tomaron 2 mL en un tubo de ensaye con tapa, colocando una tira de papel filtro dentro del tubo previamente empapada de una solución alcalina de NaOH (0.06 g/mL). Sin tocar el extracto dentro del tubo, se tapó y se llevó a baño por 5 minutos a 100°C. Las cumarinas presentes en los extractos se acumulan en el papel filtro. Posteriormente el papel filtro se llevó bajo lámpara UV, la presencia de puntos fluorescentes indica que la muestra es positiva. (Robles et al., 2016)

1.2 Taninos

Disolver 25 mg de extracto en agua y vaciarlos en 5 tubos, rotular 5 series de tubos de ensayo del 1 al 5. La serie 5 será para el blanco negativo colocar 1 ml de cada uno de los extractos en cada serie de tubos y realizar las siguientes pruebas:

a) Tubo 1: Adicionar gota a gota FeCl_3 al 10%

Positivo: taninos hidrolizables precipitado azul; taninos condensados precipitado verde

b) Tubo 2: Adicionar solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Positivo: precipitado

c) Tubo 3: Adicionar solución de albúmina. Positivo: precipitado

d) Tubo 4: Adicionar solución de acetato de plomo. Positivo: precipitado

e) Tubo 5: Adicionar solución de grenetina. Positivo: precipitado

5. Hemoaglutinación: Colocar una gota de sangre y dos gotas del extracto en una placa excavada y mezclar. Realizar esta determinación para cada uno de los extractos. Reportar la positividad comparando el grado de hemoaglutinación (Enríquez, 2016).

1.3 Alcaloides

Disolver 25 mg de extracto en ácido clorhídrico al 10%, dejar en baño María durante 10 min a 50°C y posteriormente dejar enfriar y filtrar. Tomar 1 mL y adicionar 10 gotas de reactivo de Wagner, realizar el mismo procedimiento con reactivo de Dragendorff. La aparición de precipitados floculentos color café que varían a tonalidades naranja-rojo indica positividad (Enríquez, 2016).

1.4 Saponinas, compuestos triterpenicos y esteroides

A) Índice de espuma

Colocar 2 mL del filtrado en un tubo de ensaye, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos. Observar si aparece o no espuma

La prueba se considera positiva si la altura de la espuma es mayor a 5 mm después de 15 minutos posteriores a su aparición.

B) Prueba de Rosenthaler

Disolver 25 mg de extracto en etanol, colocar 2 mL de cada filtrado en un tubo de ensaye y agregar 2 gotas de vainillina, agitar, enseguida adicionar a cada tubo 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico.

Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta.

C) *Prueba de Liebermann-Burchard*

Mezclar 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo. Enfriar a 0°C y adicionar una gota de ácido sulfúrico. Agregar 1 mL de este reactivo a 2 mL de cada uno de los extractos disueltos previamente en cloroformo.

Las triterpénicas dan coloración rosada, naranja, rojo, púrpura; las esteroídicas dan coloración azul o verde.

D) *Observación de hemólisis al microscopio*

Checar el pH de cada extracto y neutralizar en caso de ser necesario, colocar una pequeña gota de sangre en un portaobjetos y adicionarle una gota del filtrado, mezclar cuidadosamente y observar al microscopio.

Reportar si hay o no hemólisis, la cual puede ser total o parcial (Enríquez, 2016).

1.5 Flavonoides

Disolver 35 mg de extracto en etanol y realizar las siguientes pruebas (Fragoso, 2001):

- A) *Shinoda concentrado*: se adiciona un trozo de viruta de magnesio amalgamado y 5 gotas de ácido clorhídrico. La aparición de colores que van del rojo profundo a magenta indica la presencia de flavanona o dihidroflavonol, azul o verde antocianos y amarillo betaninas.
- B) *Pew's*: se agrega polvo de zinc y 5 gotas de ácido clorhídrico 5N. Los dihidroflavonoles reaccionan para dar coloración que van del rojo purpura al rojo cereza, las flavononas y dihidrochalconas dan coloración roja o verde.
- C) *NaOH*: Agregar 5 gotas de hidróxido de sodio diluido. Se considera positiva la aparición de color amarillo o naranja

1.6 Glucósidos cianogénicos

Se disuelven 25 mg de extracto en etanol, se colocan en tubos de ensaye y se realiza la reacción

Reacción de Grignard: se agregan al tubo de ensayo 5 gotas de cloroformo y una tira de papel impregnando con un reactivo en la boca del tubo y calentar a 35°C por 10 minutos. Positivo la aparición de color rosa (Piantzi, 2017).

1.7 Glucósidos cardiotónicos

A 10 mL de extracto disuelto en cloroformo se le adicionan 5 mL de acetato de plomo al 10% y 4 mL de agua destilada. Calentar la mezcla a baño María durante 10 minutos y filtrar. Extraer con 20 mL de cloroformo, separar la capa clorofórmica en 5 tubos de ensayo, llevar a sequedad.

- Reactivo de Baljet*: adicionar 1 mL de reactivo en el tubo de ensayo con extracto. La aparición de colores rosa o azul-violeta es positiva.
- Reactivo de Kedde*: adicionar 1 mL del reactivo en el tubo de ensayo con extracto. La aparición de colores rosa o azul-violeta al visible indica cardenólicos, el color se atenúa en pocos minutos.
- Reacción de Kelller Kiliani*: se adiciona ácido acético, 1 gota de cloruro férrico al 5% en metanol y ácido sulfúrico concentrado. Positivo para coloraciones intensas.
- Reacción de Liebermann- Burchard*: se agrega 10 gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1). La aparición de color verde, azul-verdoso o el vire de rojo a azul se considera positivo.
- Reacción de Salkowski*: Adicionar 10 gotas de ácido sulfúrico por las paredes. Se considera positivo para la coloración amarillo-rojo sangre (Piantzi, 2017).

1.8 Derivados antracénicos libres

Extracto disuelto en cloroformo

Reacción de Borntraeger: En 2 mL de extracto disuelto agregar 1 mL de NaOH 5%. La coloración rojiza en fase acuosa indica presencia de antraquinonas (Piantzi, 2017).

1.9 Fenoles

Se tomaron unas gotas del extracto disuelto en agua destilada y se repartieron en un platillo de pruebas de cerámica con cinco compartimientos. Se dejó un testigo y se fue adicionando una gota de cloruro férrico en el segundo, dos en la tercera y así sucesivamente hasta llegar al quinto compartimiento. La caracterización de fenoles se hace de acuerdo a la coloración así:

Ninguna reacción (no cambia de color)= no hay presencia de fenoles o taninos.

Cambio en el color azul oscuro= fenoles o taninos pirogálicos (hidrosolubles).

Cambio de color a verde oscuro= fenoles o taninos de tipo catecol (flavonoides o taninos concentrados) (Galindo, 1989).

Anexo 2. REVELADORES PARA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

METABOLITO	REVELADOR	PREPARACIÓN	MANCHAS CARACTERÍSTICAS
FLAVONOIDES	AlCl ₃	Disolver 2.5 g de AlCl ₃ en 10 mL de etanol y aforar a 25 mL (reacción exotérmica)	Fluorescencia amarilla y azules a luz UV a 366nm
	Citrobórico	5 g de ácido bórico, 5 g de ácido cítrico en 100 mL	
SAPONINAS, TERPENOIDES E ISOPRONOIDES	Vainillina/H ₂ SO ₄	<i>Solución A</i> : ácido sulfúrico al 5% en metanol	Terpenoides Manchas rosadas, purpuras
	Liebermann-Burchard	5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado se agregan	

		cuidadosamente a 50 mL de etanol en baño de hielo	Esteroidicas Manchas azul-verdosas Algunas pueden dar coloración amarilla
	p-anisaldehido	0.5 mL de p-anisaldehido se mezclan con 10 mL de ácido acético seguido de 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Calentar las placas por 5-10 minutos a 100°C	
ALCALOIDES	Dragendorff	Se prepara mezclando 1.7 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se mezclan las dos soluciones, se dejan en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml.	Manchas color marrón o anaranjado intenso
	Wagner	Se prepara disolviendo 1.27 g de yodo sublimado en 60 ml de H ₂ O y 2 g de yoduro de potasio en 10 mL de H ₂ O Mezclar A y B se afora a 100 ml.	
FENOLES Y TANINOS	Cloruro férrico 1%	FeCl ₃ al 10% (etanol-agua)	Color azul negruzco en caso de que se trate de taninos, pirogalotáninos o color verde en caso se trate de taninos condensados
CUMARINAS Y ANTROQUINONAS	Bronträeger	Solución de hidróxido de sodio al 5% en agua	Rojo en el visible para antroquinonas
GLUCÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	Baljet	1 g de ácido pícrico 100 mL de EtOH y 10 g de NaOH disueltos en 100 mL de agua destilada Mezclar ambas soluciones por partes iguales	Coloración roja, naranja rojiza o violeta

ALCOHOLES, ALDEHÍDOS, COMPUESTOS INSATURDOS, AMINAS Y SULFOXIDOS	KMnO ₄ 10%	0.5 g de permanganato de potasio disueltos en agua destilada	Manchas de color amarillo
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	DPPH	3.9 mg del radical DPPH en un matraz aforado, previamente tarado y protegido contra la luz. Se disolvió en 100 mL de metanol al 80%.	Puntos amarillos en un fondo violeta
COMPUESTOS ORGÁNICOS	H ₂ SO ₄ 5%	1.5 mL de H ₂ SO ₄ se le agregan 98.2 mL de etanol	Manchas color café o verdes

Anexo 3. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

3.1 Cuantificación de flavonoides totales

La determinación de Flavonoides se realizó mediante el método establecido por Pekal *et. al* (2014) con algunas modificaciones, este método se basa se la cuantificación de flavonoides totales.

Para la cuantificación de flavonoides es necesario preparar las siguientes soluciones:

1. Solución de quercetina 0.2 g/mL: se pesan 0.002g de quercetina y disolver en etanol al 98 %, el cual se debe aforar a 10 mL, almacenar en un frasco ámbar y en refrigeración.
2. Solución de AlCl₃ al 2%: pesar 0.2 g de AlCl₃ y disolverlos en agua destilada.

Tabla 1. Diluciones de Quercetina para la cuantificación de Flavonoides

No. De tubo	[Quercetina] (mg/mL)	Quercetina (µL)	EtOH 98%(µL)
1	0	0	1000
2	0.04	200	800
3	0.08	400	600
4	0.12	600	400
5	0.16	800	200
6	0.2	1000	0

El procedimiento para llevar a cabo la reacción es:

Se agrega 750 μL cada una de las diluciones, adicionar 375 μL solución de AlCl_3 al 2% y 375 μL agua destilada, se agito vigorosamente en el vórtex, dejar reposar durante 10 minutos a T.A en obscuridad. Leer absorbancia a 425 nm en un espectrofotómetro.

Preparación del extracto: Pesar 5 mg/mL de EtOH 98% y fue tratado de la misma forma que las diluciones a partir de Quercetina.

Con las mediciones realizadas para las diluciones de Quercetina, se realizó una curva de calibración (Fig. 1), cuya ecuación ayudó a determinar la concentración en equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg EQ/g de extracto)

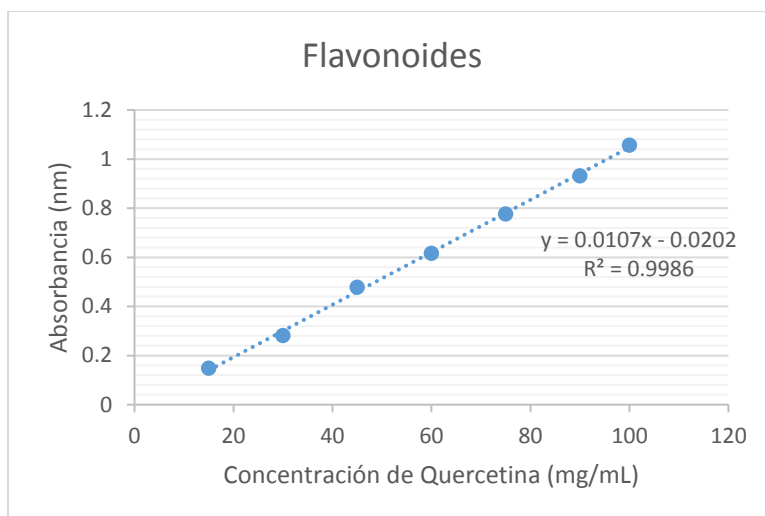


Figura 1. Curva de calibración para cuantificación de flavonoides

3.2 Cuantificación de fenoles totales

El método se fundamenta en el empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu, que es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, que se reduce al oxidar los fenoles, a pH básico, formando un mezcla de óxido de tungsteno y molibdeno, crómenos de color azu.la coloración que se produce presenta una absorción máxima alrededor de los 750 nm y es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto. (Peterson, 1979)

para la cuantificación de fenoles totales se deben prepara las siguientes soluciones:

1. *Solucion stock de ácido gálico 0.1 mg/mL:* Pesar 0.010g y se disuelve en 1 ml de EtOH y se afora con agua destilada a 100 mL
2. *Solucion de carbonato de sodio anhidro al 14 %:* Pesar 14 g de Na_2CO_3 anhidro y disolverlo en 80 mL agua destilada hirviendo, enfriar a temperatura ambiente y almacenar durante 24 horas, filtrar la solución y aforar a volumen de 100 mL con agua destilada, almacenar en frasco ámbar.
3. *Reactivo Folin-Ciocalteu 2 N*

Tabla 2. Diluciones de ácido gálico para la cuantificación de Fenoles totales

Numero de tubo	Concentración (mg/ml)	Ácido gálico (μL)	Agua destilada (μL)
0	BCO	0	200
1	0.02	40	160

2	0.04	80	120
3	0.06	120	80
4	0.08	160	40
5	0.1	200	20

Procedimiento:

En tubo de ensaye se colocan 200 μL de las diluciones, se agregan 100 μL reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogeniza la mezcla y se deja reposar 8 minutos en obscuridad, pasado este tiempo se colocan 200 μL de Na_2CO_3 anhidro al 14% además se agregan 1500 μL de agua destilada, se homogeniza en un vórtex y se deja reposar una hora a temperatura ambiente y en obscuridad. Leer la absorbancia a 765 nm.

Ajustar el blanco con agua destilada.

Preparación del extracto: 5 mg de extracto/mL de metanol y fue tratado de igual manera que las diluciones a partir de ácido gálico.

Con las mediciones realizadas para las diluciones de ácido gálico, se realizó una curva de calibración (Fig. 2), cuya ecuación ayudó a determinar la concentración en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g de extracto)

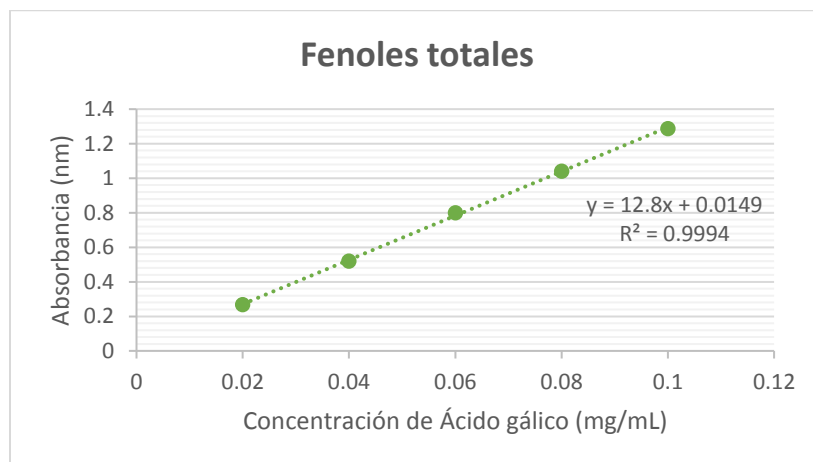


Figura 2. Curva de calibración para cuantificación de Fenoles totales

3.3 Cuantificación de taninos condensados

Estos compuestos son polímeros de flavonoides, el método específico para determinar flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocinidinas. El tratamiento con HCl permite separar en unidades los flavonoides que constituyen a los polímeros debido a la hidrólisis generada

Para la cuantificación se elaboraron las siguientes soluciones:

1. Solución estándar de catequina 2 mg/mL en MeOH (Nota: debe evitarse la luz)
2. 50 mL de HCl al 8% en MeOH: se añaden 4 mL de HCl y se aforan con 50 mL de MeOH
3. 50 mL de vainillina al 1% en MeOH:
4. se disuelven 0.5g de vainillina en metanol y aforar a 50 mL. Almacenar a 0°C y en la obscuridad

5. Reactivo de Vainillina 1%/HCl 8%: Mezclar partes iguales de ambos reactivos (Nota: debe preparar el mismo día del análisis)

Tabla 3. Diluciones de catequina para cuantificación de taninos condensados

[Catequina] mg/ml	Solución estándar (mL)	MeOH (mL)
0	0	1
0.4	0.2	0.8
0.8	0.4	0.6
1.2	0.6	0.4
1.6	0.8	0.2
2	1	0

Cada dilución se calienta en baño María por 20 min a 30°C, se toman 400 µL de cada una de las diluciones y se adiciona 2 mL del reactivo de vainillina en tubos de precipitado, se colocan nuevamente a baño María por 20 minutos a 30°C, se mezcla para leer la absorbancia a 550 nm.

Preparación del extracto: se pesaron 50 mg de cada extracto y se disuelven en 1 mL de HCl 1% en MeOH, se tapan y agitan por 20 minutos, posteriormente se centrifugan a 10 rpm durante 20 minutos, se toman 400 µL de cada uno y fueron tratados de igual manera que las diluciones a partir de catequina.

Preparación del blanco: se tomaron 400 µL del extracto se calienta en baño María por 20 min a 30°C, y se adiciona 2 mL de HCl 1%, se colocan a baño María por 20 min a 30°C, y se leen a la misma longitud de onda que las muestras, la absorbancia obtenida se restó a cada uno de los extractos para eliminar el error.

Con las mediciones realizadas para las diluciones de catequina, se realizó una curva de calibración (Fig. 3), cuya ecuación ayudó a determinar la concentración en equivalentes de catequina por gramo de extracto (ECat/g de extracto)

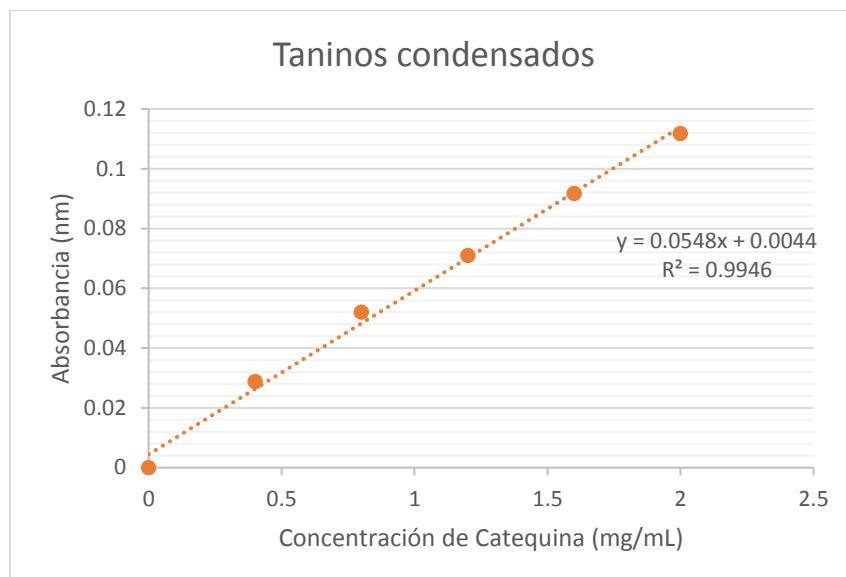


Figura 3. Curva de calibración para cuantificación de Taninos condensados

3.4 Cuantificación de saponinas totales

La prueba se realiza en un medio ácido fuerte, el cual es constituido por ácido sulfúrico. En la reacción se genera un hidrólisis a partir del enlace glucósido de la porción esteroidal o triterpénica con los residuos de carbohidratos, formando un cromóforo con un máximo de absorbancia a 544nm.

Por lo cual se realizaron las siguientes soluciones:

Estándar: solución de diosgenina 0.5 mg/mL de diosgenina (98%) en MeOH (80%) (Utilizar inmediatamente ya que se degrada con facilidad)

Reactivo A: Vainillina al 8%, disolver 800 mg de vainillina en 10 mL de etanol al 99.5%

Reactivo B: H₂SO₄ al 72%, en 28 ml de agua destilada añadir 72 mL de ácido sulfúrico

Tabla 4. Diluciones para cuantificación de saponinas totales

Concentración de diosgenina (mg)	Solución estándar (mL)	MeOH 80% (mL)
0	0	1
0.1	0.2	0.8
0.2	0.4	0.6
0.3	0.6	0.4
0.4	0.8	0.2
0.5	1	0

En la mezcla de reacción se agregó 0.25 mL de solución de vainillina al 8% y 2.5 mL de solución de ácido sulfúrico al 72%. Se colocaron en tubos de ensaye con la mezcla de reacción por triplicado. Se agitaron los tubos y fueron incubados durante 15 min a 60 °C. Al terminar, se pasaron a un baño de hielo durante 4 min para detener la reacción. Luego se procedió a leer cada una de las diluciones y la muestra (extractos) a 544 nm de absorbancia.

Preparación del extracto: Se pesó 5 mg de extracto disuelto en 1 mL de metanol al 80%, de esta solución se tomó una alícuota de 0.25 mL y se trató de la misma manera que las soluciones estándar.

Con las mediciones realizadas para las diluciones de diosgenina, se realizó una curva de calibración (Fig. 4), cuya ecuación ayudó a determinar la concentración de saponinas esteroidales en el extracto como equivalentes de diosgenina por gramo de extracto (mgEdiosg/g de extracto) para cada uno de los extractos por medio de la interpolación

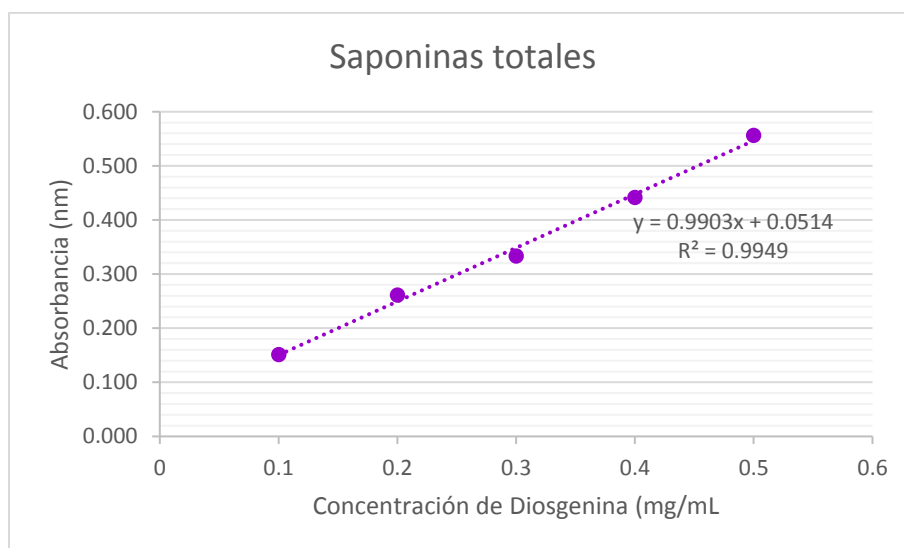


Figura 4. Curva de calibración para cuantificación de saponinas totales

3.6 Cuantificación de azúcares reductores

La técnica se basa en que los azúcares reductores poseen un grupo carbonilo libre un hemiacetal que le confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos.

El reactivo DNS tiene la capacidad de oxidar a los carbohidratos dando una coloración característica que presenta una característica un máximo de absorbancias a 540 nm, el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como producto de la reacción se forma un complejo amarillo (3-amino-5-nitrosalicílico).

1) Preparación de reactivos

a) Reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS): Se prepara disolviendo 0,8 g de hidróxido de sodio en agua destilada, luego se adicionan 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0,5 g de DNS, con agitación constante y calentamiento a 70°C, por aproximadamente 8 horas. Esta mezcla se afora a 50 mL con agua destilada y se almacena en un frasco ámbar a 4°C.

b) Hidróxido de sodio al 10%: 10 g de hidróxido de sodio se disuelven en 100 mL de agua destilada

2) Preparación de la curva de calibración

Se pesan 50 mg de glucosa y se trasvasan a un matraz volumétrico de 100 mL, completándose con agua destilada. Se toma exactamente 1 mL de la solución antes preparada, medidos con una pipeta volumétrica y se afora a 10 mL con agua destilada, en un matraz volumétrico (solución de trabajo).

A partir de esta solución se preparan por diluciones las soluciones patrones con las siguientes concentraciones: 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1 mg/mL respectivamente.

Tabla 6. Diluciones de glucosa para cuantificación de azúcares reductores

Concentración de glucosa (mg/mL)	Solución estándar (mL)	H₂O (mL)
0.2	1	4
0.4	2	3
0.6	3	2
0.8	4	1
1	5	0

3) Determinación cuantitativa de azúcares reductores

Para las soluciones patrones, blanco y muestras, se mezclan 0,5 mL de cada uno con 0,5 mL del reactivo DNS, se colocan a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detiene la reacción con baño de hielo y agua. A cada una de las soluciones se le agregan 5 mL de agua destilada, se agitan, se dejan en reposo por 15 min, y se lee la absorbancia a cada solución, a la longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS

4) Preparación del extracto

Se pesaron 10 mg/ml de agua destilada y fue tratado con el reactivo DNS de igual manera que las diluciones a partir de glucosa.

5) Cálculos

Para calcular las cantidades de azúcares reductores en las muestras se utiliza la ecuación de la curva de calibración (Fig. 6). Se determinó la concentración de equivalentes de glucosa por gramo de muestra (mg EGlu/g de extracto) en cada uno de los extractos por medio de la interpolación

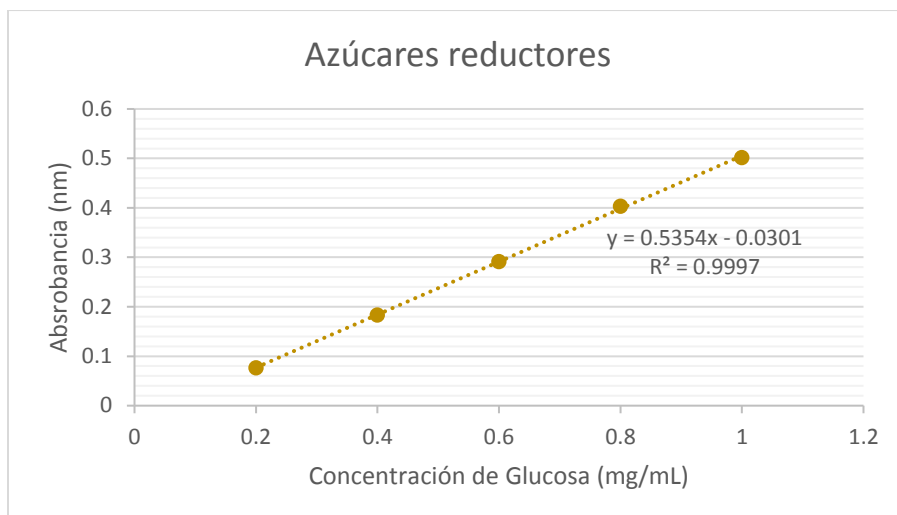


Figura 6. . Curva de calibración para cuantificación de azúcares reductores

3.7 Cuantificación de alcaloides

El procedimiento analítico está basado en el método de Shamsa et al. (2008), consiste en la reacción de alcaloides (solamente aquellos que tienen nitrógeno en el interior de su estructura con verde de bromocresol (BCG), dando lugar a la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol, a un pH 4,7, de color amarillo, susceptible de una determinación espectrofotométrica a 470 nm

PROCEDIMIENTO

1. Preparación de soluciones

a.- *Solución de verde bromocresol (BCG):* Se pesan 69,8 mg de verde de bromocresol y se agregan en un vaso de precipitado de 50 mL, se mezclan con 3 mL de NaOH de concentración 2 mol/L y 5 mL de agua destilada, hasta que esté completamente disuelto y la solución se diluye hasta 1000 mL con agua destilada en un matraz de 1000 mL.

b.- *Solución de ácido cítrico de 0,2 mol/L:* Se pesan 42,02 g de ácido cítrico monohidratado y se disuelven en un litro de agua destilada en un balón volumétrico.

c.- *Solución tampón de fosfato ácido de sodio a pH 4,7.:* Se pesan 71,6 g de Na_2HPO_4 y se disuelven en agua destilada, usando un matraz aforado de 1 litro y se ajusta el pH con la solución de 0,2 mol/L de ácido cítrico hasta llegar a un pH de 4,7.

d.- *Solución estándar de gramina:* Se pesa 1 mg de gramina y se disuelve con agua destilada aforado en un matraz volumétrico de 10 mL.

2. Preparación para la curva de calibración

Medir alícuotas de la solución estándar de atropina con una pipeta automática y transferir cada una para diferentes embudos de separación.

Tabla 5. Diluciones de gramina para cuantificación de alcaloides

[Gramina] mg/mL	Vol. Solución estándar (mL)
0.04	0.4
0.06	0.6
0.08	0.8
0.1	1
0.12	1.2

Preparación de la reacción

	Vol. Solución estándar (mL)	H₂O (mL)	Na₂HPO₄ a pH 4.7 (mL)	BCG (mL)
Bco	0	2	5	5
1	0.4	2	5	5
2	0.6	2	5	5
3	0.8	2	5	5
4	1	2	5	5
5	1.2	2	5	5

A continuación, añadir 2 mL de cloroformo a cada embudo de separación. La fase clorofórmica se separa y se recoge en un matraz volumétrico de 10 mL, previamente rotulado. Se sigue agregando consecutivamente al embudo de separación 2 mL de cloroformo y luego dos veces más de 3 mL de cloroformo, después se afora con cloroformo los matraces de 10 mL (volumen final para todas las soluciones es de 10 mL).

La absorbancia del complejo formado y disuelto en cloroformo se mide a 470 nm frente al blanco preparado, como anteriormente se describió.

Con los valores de las absorbancias y las cantidades de atropina en cada estándar se hace la gráfica de la curva de calibración que debe ser lineal, con un valor de r^2 aceptable de entre 0,997 y 1,000

3.- **Procedimiento para determinar cuantitativamente alcaloides en el extracto**

Se pesó 0.5 mg del extracto y se adiciono de 100 a 150 gotas de HCl 2N y fue filtrado. Fue tomado 1 mL de esta solución y fue transferido a un embudo de separación con 4 mL de CHCl₃ por triplicado. La solución se ajustó a un pH neutro con una solución 0.1N de NaOH. Se transfieren 5 mL del extracto a un embudo de separación con 5 mL de solución de BCG y 5 mL de solución fosfato medidos con pipetas volumétricas de 5mL. La mezcla se agita y se retira el tapón del embudo para expulsar el gas en el embudo. El complejo formado es extraído con 2, 2, 3 y 3 mL de cloroformo, agregados cada uno consecutivamente, de la misma forma como se extrajeron los estándares, separando la capa de cloroformo. Los extractos de cloroformo se recogen en un matraz volumétrico de 10 mL y se completa el volumen con cloroformo (volumen final es de 10 mL). Este análisis se hace por triplicado.

La absorbancia del complejo formado y disuelto en cloroformo es medida en un espectrofotómetro de absorción a una longitud de onda de 470 nm.

4.- Cálculos

Para calcular las cantidades de alcaloides en las muestras se utiliza la ecuación de la curva de calibración (Fig. 5). Se determinó la concentración de equivalentes de atropina por gramo de muestra (mgEGra/g de extracto) en cada uno de los extractos por medio de la interpolación

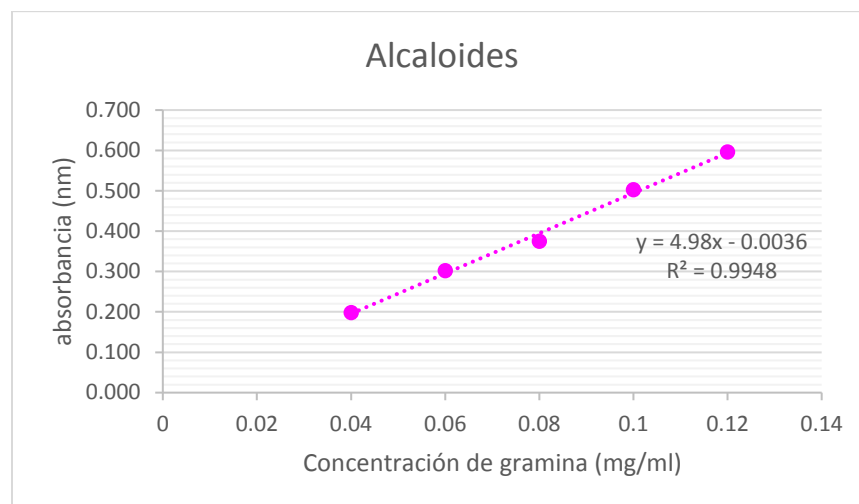


Figura 5. Curva de calibración para cuantificación de alcaloides

Anexo 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

Preparación de la curva de calibración: Se preparó una solución patrón, disolviendo 2 mg de TROLOX en 10 mL de metanol al 80%. Se realizaron las siguientes diluciones:

Concentración (µmol)	Stock (mL)	Metanol 80% (mL)
100	0.375	2.625
200	0.750	2.250
300	1.125	1.875
400	1.5	1.5
500	1.875	1.125
600	2.25	0.75
700	2.625	0.375

Preparación del radical DPPH: Se pesó 3.9 mg del radical DPPH en un matraz aforado, previamente tarado y protegido contra la luz. Se disolvió en 100 mL de metanol al 80%. La solución se colocó en un sonicador durante 20 min con la finalidad de lograr una adecuada disolución.

Actividad antioxidante. A 0.1 mL de cada uno de los extractos, se les adicionó 3.9 mL de la solución de DPPH, se agitó vigorosamente y se mantuvo en obscuridad por 1 h. Se registró la absorbancia a 517 nm después de 30 min.

Por último se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula mostrada a continuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde:

Ab= absorbancia del blanco a 517 nm

Am=absorbancia de la muestra a 517 nm

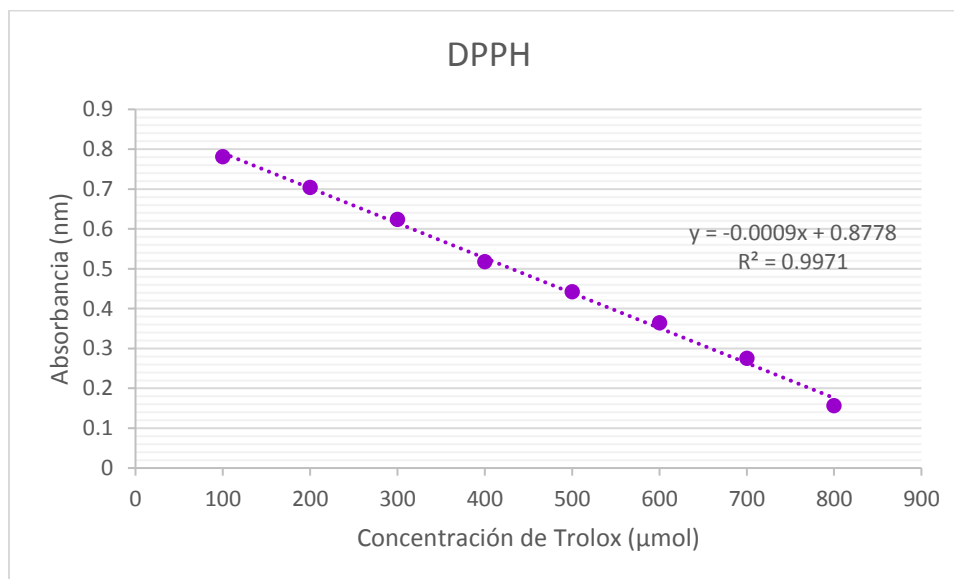


Figura 7.. Curva de calibración para determinación de actividad antioxidante por DPPH

4.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

Preparación de las soluciones:

Se preparó una solución stock de ABTS 7 mM donde se pesó 0.0192g y se disolvió en metanol, se aforo a un volumen de 5 mL, la cual se mantuvo protegida de la luz

Solución de persulfato de potasio 140 mM: se pesó 0.1892g disueltos en agua destilada y aforados a 5 mL.

De estas soluciones se tomaron 5 mL y 88 µl respectivamente, para hacer una nueva mezcla, la cual se almacena en un frasco ámbar y se dejó reposar en refrigeración durante 14 horas como mínimo. Pasado ese tiempo se midió la absorbancia y se ajusta a 0.74, la dilución se realiza con metanol.

Preparación de la curva de calibración:

Para la curva patrón se prepararon una solución stock de TROLOX 2 mM : se peso 0.025g disueltos en metanol y aforado a 10 mL

Se realizaron las siguientes diluciones a partir de la solución de TROLOX

Concentración de TROLOX mM	Solución stock (µL)	MeOH (µL)
0.01	5	995
0.1	50	950
0.2	100	900
0.4	200	800
0.6	300	700
0.8	400	600

En tubos de ensaye protegidos de la luz se colocaron 100 µL de cada una de las diluciones de TROLOX y 3 mL de la solución ABTS (con absorbancia 0.74) se homogenizaron y se mantuvieron en obscuridad por 10 minutos, leer la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro, el equipo se calibra con metanol.

Como blanco se utilizó la solución de ABTS (con absorbancia de 0.74 en reposo por 10 minutos)

Para la determinación en las muestras, se tomó una alícuota de 100 µL del extracto obtenido y se realizó el mismo procedimiento que para los puntos de la curva.

Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

En donde: Ab es la absorbancia del testigo (ABTS), Am es la absorbancia obtenida de cada muestra (o punto de la curva patrón).

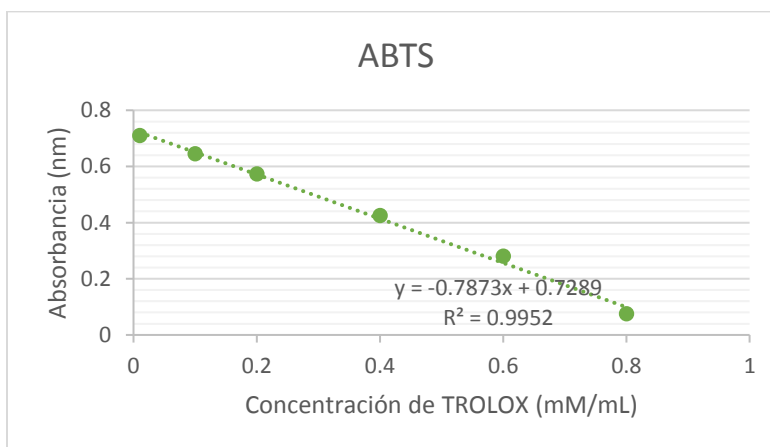


Figura 8. Curva de calibración para determinación de actividad antioxidante por ABTS

ANEXO 5. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LA RAÍZ DE *I. heterophylla*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
HERBARIO

DICTAMEN

DATOS DE USUARIO

QFB. Diana Victoria Navarrete Carriola
Dr. Juan Orozco Villafuerte

Facultad de Química, UAEmex.
Unidad El Cerrillo, Méx.

DATOS DE LA PLANTA

Fecha de recepción: 15 de Agosto de 2018
Fecha de entrega: 20 de Septiembre de 2018
Nombre común: Liga, raíz del manso
Lugar de recolecta: San Antonio Yondejé, Timilpan, Estado de México

TIPO DE ANÁLISIS

Identificación taxonómica

TÉCNICAS O MÉTODOS EMPLEADOS

Observación macroscópica y al microscopio estereoscópico simple de características diagnósticas de género y especie; empleo de clave dicotómica Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología AC. Y CONABIO. (Pátzcuaro Michoacán).

DIAGNOSIS

Familia: Asteraceae
Género: *Iostephane*
Especie: *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth.

ATENTAMENTE

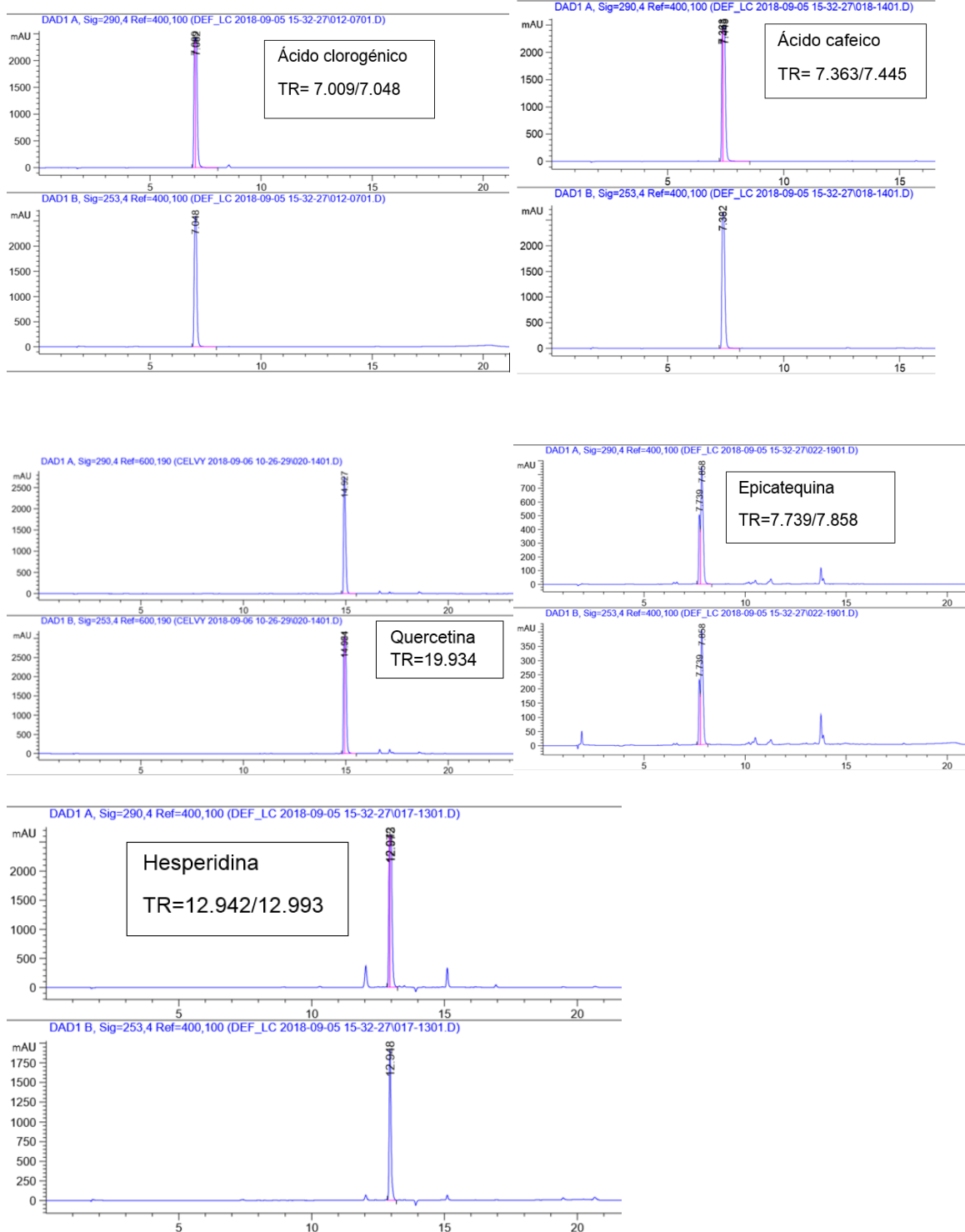

Dr. Luis Isaac Aguilera Gómez
Responsable del Herbario



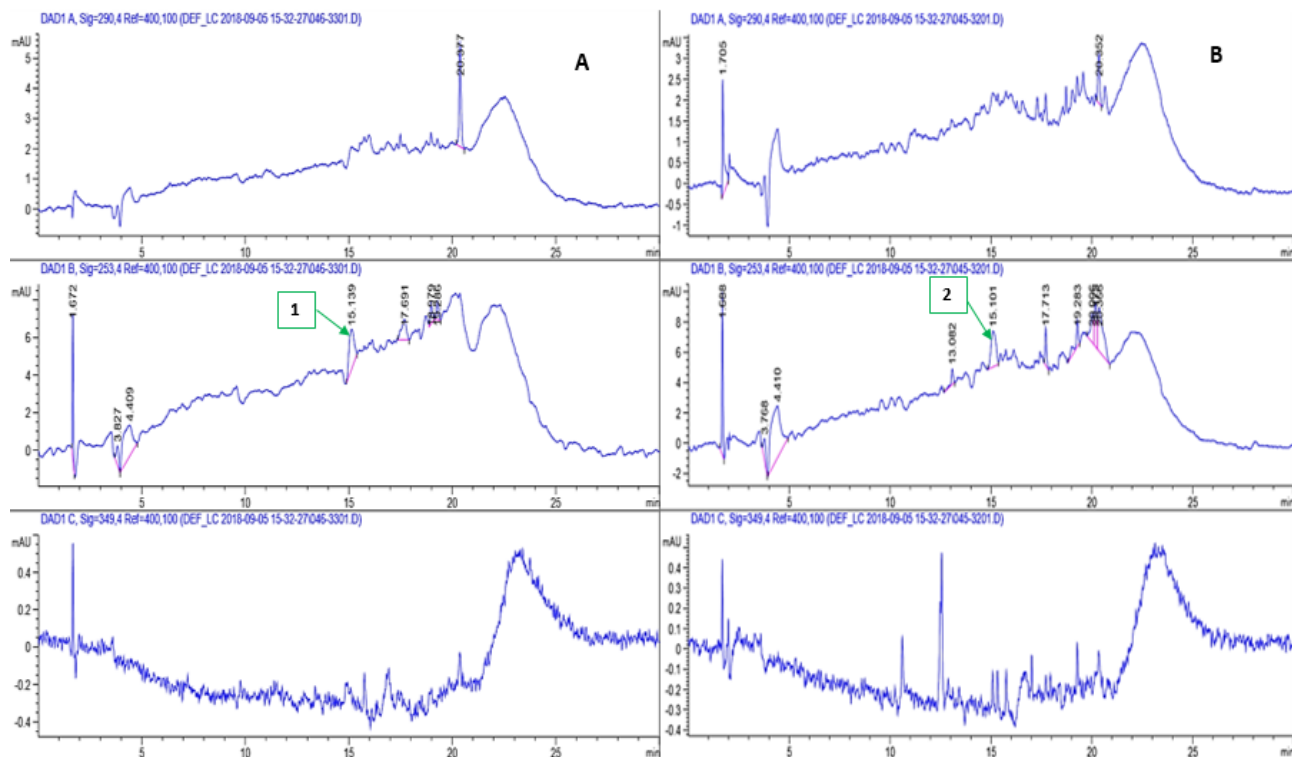
FACULTAD DE CIENCIAS

ANEXO 6.PERFILES CROMATOGRAFICOS

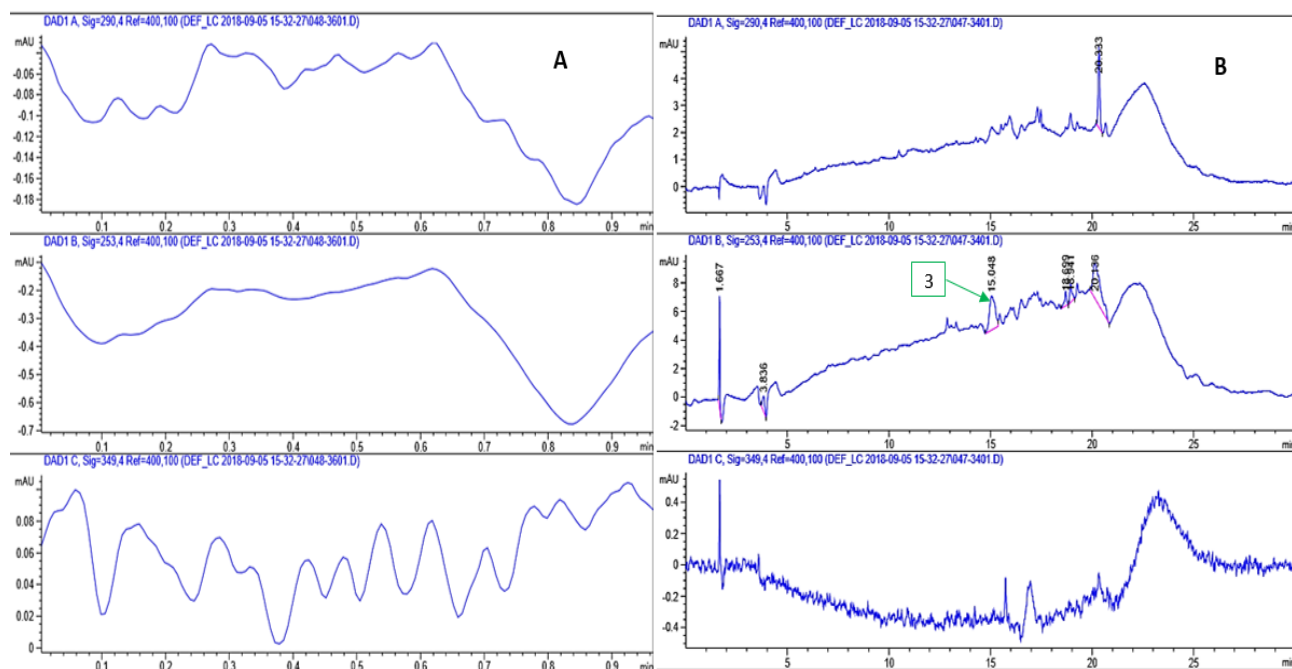
6.1 Perfiles cromatográficos de los estándares de referencia usados en el HPLC-DAD



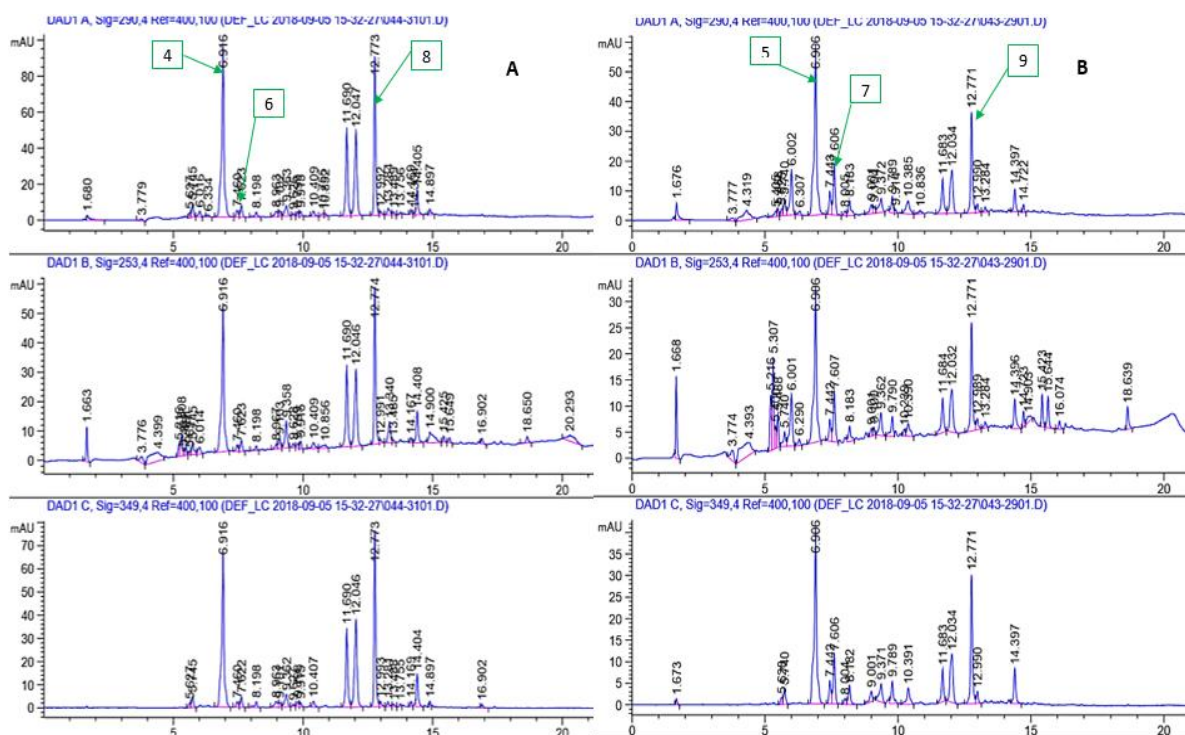
6.2 Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 290, 253 y 349 nm de los compuestos fenólicos del extracto hexánico (A) Puebla y (B) Timilpan



6.3 Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 290, 253 y 349 nm de los compuestos fenólicos del extracto diclorometánico (A) Puebla y (B) Timilpan



6.4 Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 290, 253 y 349 nm de los compuestos fenólicos del extracto metanólico (A) Puebla y (B) Timilpan



6.5 Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 290, 253 y 349 nm de los compuestos fenólicos del extracto acuoso (A) Puebla y (B) Timilpan

