

00524  
L70



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE**  
*Myrtillocactus geometrizans.*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**JUAN RODRIGO SALAZAR**



MEXICO D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>Profesor JAIME MEDINA OROPEZA</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Profesor HECTOR RIOS OLIVARES</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Profesor CARLOS LEONARDO A. CÉSPEDES ACUÑA</b>
<b>1er SUPLENTE</b>	<b>Profesor CARLOS DAMIÁN ZEA</b>
<b>2do SUPLENTE</b>	<b>Profesor FERNANDO ORTEGA JIMENEZ</b>

**Esta TESIS se desarrolló en los laboratorios 2 y 7 de la Unidad de Investigación de Plantas Medicinales del Instituto de Química, UNAM.**

**Asesor de Tesis:**



**Dr. Carlos Leonardo A. Céspedes Acuña**

**Sustentante:**



**Juan Rodrigo Salazar**

## **Dedicatorias**

### **A mi mamá:**

María de la Luz L. Salazar, con mucho cariño, por ser mi más grande ejemplo de fortaleza, entrega y constancia. Tu me diste la vida y tu vida, y siempre te agradeceré todo lo que he logrado gracias a ti.

### **A mi abuelita:**

Graciela I. Salazar Santillán, por estar al pendiente de mi en todo momento y dedicarme todos estos años.

### **A mi tía:**

Agustina R. Salazar Santillán, porque aunque ya no estás físicamente entre nosotros, continúas apoyándome con tus consejos y tus palabras de aliento.

### **A Lily:**

Porque se que siempre estás al pendiente de nosotros.

### **A mi esposa:**

Rosa María Barrón, por apoyarme en todo momento. Esta es una meta a la que llegué junto a ti, de muchas más que pretendo.

### **A mis amigos de toda la vida:**

Arturo, Miguel, Pablo y Victor, con ustedes crecí y ahora espero seguir haciéndolo.

### **A mis amigos de la Facultad de Química:**

Manuel, Arturo, Lilitiana, Gabita, Alejandro, Ivonne, el Mega, Cesar, Lalo, Lupita, Checo, Vic, Carlos (rompe hojas), Mario, Chavela, Angélica, Erika, Omar, Tania, Isaac, Robert, Arith, Jorge, Paty y todos aquellos que omita por mi mala memoria, pero que sé, tengo su amistad. Algún día las Donas se compondrán.

## **Agradecimientos**

**Al Prof. Carlos Leonardo A. Céspedes Acuña, Ph. D., por convertirse en un guía, y en mi amigo. Por darme la oportunidad de tener iniciativa y enseñarme que al empezar nada está hecho, hay que hacerlo.**

**A los miembros del H. Jurado, por sus consejos y aportaciones.**

**Al Dr. José S. Calderón Pardo, por facilitarnos su tiempo y su espacio mientras estuvimos juntos, y más ahora que lo sigue haciendo.**

**A los profesores que me formaron dentro de la Facultad de Química de la UNAM.**

**A todas las personas que de una u otra forma me ayudaron a concluir este paso.**



VI.	<b>Materiales y Equipos</b> .....	34
VII.	<b>Parte Experimental</b> .....	34
	7.1 Material Vegetal.....	34
	7.2 Obtención de los Extractos Primarios.....	35
	7.3 Determinación de la Actividad Antioxidante.....	36
	7.3.1 Ensayo Antioxidante Autobiográfico en Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	36
	7.3.2 Ensayo Espectrofotométrico UV.....	36
	7.4 Estadística.....	37
VIII.	<b>Resultados y Discusión</b> .....	37
	8.1 Determinación de la Actividad Antioxidante de EH1 y EE1.....	37
	8.2 Fraccionamiento Primario de EE1.....	40
	8.3 Determinación de la Actividad Antioxidante de las Fracciones de EE1.....	41
	8.4 Fraccionamiento Secundario del Extracto de EE1-2.....	43
	8.5 Determinación de la Actividad Antioxidante de las Fracciones de EE1-2.....	45
	8.6 Fraccionamiento de F2.....	47
	8.7 Purificación e Identificación de C1F2 <sub>3</sub> .....	49
	8.8 Actividad Antioxidante de C1F2 <sub>3</sub> .....	50
IX.	<b>Conclusiones</b> .....	52
X.	<b>Perspectivas</b> .....	53
XI.	<b>Bibliografía</b> .....	54
XII.	<b>Apéndice</b> .....	62

## Abreviaturas

AcOEt	acetato de etilo
CA <sub>50%</sub>	concentración antioxidante 50 %
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
CCF	cromatografía en capa delgada
DPPH <sup>•</sup>	radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EtOH	etanol
Et <sub>2</sub> O	éter etílico
g	gramos
mg	miligramos
<i>n</i> -hex	<i>n</i> -Hexano
μL	microlitros
mL	mililitros
MS	Metabolito Secundario
MeOH	metanol
nm	nanómetros
<i>M. geometrizans</i>	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>
NaOMe	metóxido de sodio
ppm	partes por millón (μg/mL)



# Estudio de la actividad antioxidante de *Myrtillocactus geometrizans*.

## Resumen

Se realizó la caracterización de la actividad antioxidante de los extractos de *n*-hexano y de etanol al 80 % de las partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans*, utilizando el método del DPPH', tanto en cromatografía en capa delgada como espectroscópica, con la finalidad de aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad. Esta especie pertenece a la Familia Cactaceae ampliamente distribuida en la zona central de la Republica Mexicana. Las partes aéreas se secaron, molieron y maceraron sucesivamente con *n*-hexano y etanol al 80 %, para obtener los extractos correspondientes y concentrarlos. Se determinó su capacidad para reducir el radical libre DPPH', a través de ensayos en cromatografía en capa fina, y en un espectrofotómetro a 517 nm. Se encontró mayor actividad en el extracto etanólico (EE1), que presentó una CA<sub>50%</sub> de 620.96 ppm. EE1 se extrajo sucesivamente con éter, acetato de etilo y *n*-butanol, en orden creciente de polaridad. Se concentraron los extractos y el que resultó más activo para reducir el DPPH' fue la fase orgánica de acetato de etilo (EE1-2) que presentó un CA<sub>50%</sub> de 162.16 ppm. EE1-2 se fraccionó utilizando cromatografía en columna abierta empacada con sílica gel de donde se colectaron 4 fracciones activas (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, y F<sub>4</sub>). La más activa fue F<sub>2</sub>, obtenida con una mezcla cloroformo-metanol (95:5 v/v), que presentó un CA<sub>50%</sub> de 98.88 ppm. Esta fracción se sometió a cromatografía en columna abierta empacada con Sephadex y se eluyó con una mezcla cloroformo-metanol (1:1 v/v), para obtener cuatro fracciones activas (F<sub>2,1,2,3,4</sub>). De F<sub>2,3</sub> precipitaron cristales amarillos amorfos (C1F<sub>2,3</sub>), que en la prueba antioxidante en cromatografía en capa fina, presentaron actividad antioxidante. C1F<sub>2,3</sub> se identificó como quercetina en base a su identidad cromatográfica con una muestra auténtica y por el espectro de barrido en UV (200-500 nm) y el desplazamiento de dicho espectro al adicionar metóxido de sodio. Este flavonoide presentó un CA<sub>50%</sub> de 8.6 ppm para la reducción de DPPH'. Se utilizó  $\alpha$ -tocoferol como control positivo con un CA<sub>50%</sub> de 11.8 ppm.

# I. Introducción

Las plantas y sus Metabolitos Secundarios (MS) se han estudiado desde hace tiempo con muchas finalidades. Su estudio generalmente comienza con el aislamiento de las sustancias químicas de la planta a partir de un extracto, para la posterior purificación e identificación de sus estructuras químicas por los métodos convencionales. Para su aislamiento, se emplean técnicas dirigidas que utilizan una o varias pruebas biológicas o reacciones químicas como criterio de selección específica de los compuestos que interesan y que están presentes en un extracto. De esta forma se han aislado miles de compuestos y se han empleado con diferentes enfoques, por ejemplo: quimiotaconómicos (Gibson y Horak, 1978); para encontrar fármacos o estructuras base con las cuales combatir diferentes enfermedades; en la búsqueda de agentes antimicrobianos (Kubo y Fujita, 2001), antifúngicos (Reyes-Chilpa *et al.*, 1997), nematocidas (Lacey *et al.*, 1995, Alen *et al.*, 2000), entre otras actividades biocidas; como aleloquímicos (Putnam y Tang, 1986), algunos de ellos con fines agroquímicos, para obtener principalmente, moléculas con potencial actividad herbicida (Macias *et al.*, 1999; Achnine *et al.*, 1999) e insecticida (Alkofahi *et al.*, 1989; Céspedes *et al.*, 2001). En la industria de alimentos, se han estudiado para obtener colorantes (Reynoso *et al.*, 1997), endulcorantes (Kohda *et al.*, 1976; Tanaka, 1982; Vaněk *et al.*, 2000) entre otros usos como aditivos y saborizantes.

Los productos naturales también han sido estudiados como nutraceuticos (Andlauer y Fürst, 2002), debido a que muchos de ellos, como los flavonoides, betalainas, glicósidos de naftaleno, y antocianidinas entre otros, son consumidos habitualmente en la dieta humana y se ha encontrado evidencia de los beneficios que proporcionan en la salud de quienes los consumen (Pietta, 2000; Kanner *et al.*, 2001; Cichewicz y Nair, 2002). Dentro de este rubro, los antioxidantes resultan ser importantes nutraceuticos, muchos de los cuales han sido aislados de varias especies de plantas. Estos antioxidantes, al estudiarlos *in vitro* y posteriormente en modelos biológicos experimentales, son capaces de reaccionar adecuadamente con los radicales libres generados a través de diversos procesos, previniendo la oxidación. Estos hechos han propiciado la creación de varias hipótesis en el sentido de que estos MS, son efectivos para prevenir enfermedades en las que están relacionadas los radicales libres, por ejemplo, en el proceso de inflamación, enfermedades

neurodegenerativas y de la piel, cáncer entre otras (Peterson y Dwyer, 1998), que su aparición se relaciona con el estrés oxidativo, y que analizaremos mas adelante.

## **1.1. Metabolitos Secundarios**

Dentro del vasto universo de la diversidad vegetal, todas las plantas comparten ciertas características en cuanto a los elementos básicos con los que sobreviven en su medio. Entre estos elementos, podemos mencionar a las sustancias químicas que participan directamente en los procesos que les permiten desempeñar sus funciones vitales. A estas sustancias les podemos denominar Metabolitos Primarios (MP), dentro de los cuales se incluyen monómeros de macromoléculas, como los aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y lípidos; neurotransmisores; proteínas que participan en la fotosíntesis o en la respiración, o en otros procesos metabólicos esenciales ya sea como estructuras de soporte, de transporte o como enzimas (Anaya y Cruz-Ortega, 2001) .

Por otro lado, los Metabolitos Secundarios (MS) son todos aquellos compuestos orgánicos de origen natural que son producto del metabolismo primario pero que no se conocen sus funciones celulares específicas. Generalmente son de peso molecular bajo (< 1000 Daltones [unidad de masa molecular, equivalente a la masa de hidrógeno]) y de estructura compleja. Tienen una gran heterogeneidad química y la presencia específica de algún metabolito o familia de MS es muy restringida por lo que son específicos para taxa particulares: familias, subfamilias, géneros o especies. Se forman por reacciones químicas que sufren sus precursores conducidas por enzimas específicas, como la oxidación, reducción, metilación, introducción de un grupo hidroxilo, ciclación de una cadena, remoción de un radical activo, etcétera (Anaya y Cruz-Ortega). Los tres principales precursores de los MS se muestran en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Principales precursores de los diferentes tipos de Metabolitos Secundarios.

1	acetil coenzima A
2	ácido mevalónico
3	ácido shiquímico

Por otro lado, los MS se pueden clasificar de acuerdo a los grupos funcionales que poseen (Rice, 1984) quedando de la forma que se muestra en la tabla 1.2.

**Tabla 1.2** Clasificación química de los Metabolitos Secundarios.

Clases químicas de metabolitos secundarios más comunes en las plantas.	
1. derivados del ácido cinámico	8. lactonas simples insaturadas
2. Cumarinas	9. ácidos grasos de cadena larga
3. fenoles simples	10. naftoquinonas, antraquinonas y quinonas complejas
4. Flavonoides	11. aminoácidos y polipéptidos no esenciales
5. taninos hidrolizables y condensados	12. alcaloides y cianohidrinás
6. terpenoides y esteroides	13. sulfuros y glucósidos de los aceites de la mostaza
7. ácidos orgánicos, alcoholes de cadena larga, aldehidos alifáticos y cetonas	14. purinas y nucleósidos

Cabe señalar que existen otras formas de clasificar a los metabolitos secundarios, que involucran el origen biosintético o la función ecológica que poseen (Anaya y Cruz-Ortega, 2001), pero no se muestran por no estar dentro de los objetivos que persigue este estudio.

### **1.1.1. Aislamiento de Metabolitos Secundarios**

Como hemos visto, los MS tienen una extraordinaria diversidad química, por lo que existen una gran cantidad de métodos y procedimientos para su aislamiento (Dominguez, 1973). El material vegetal se puede secar para después pulverizarlo, acto seguido, se macera con abundante solvente orgánico o agua, para obtener extractos orgánicos de diferentes polaridades o acuosos, respectivamente. En el caso de los antioxidantes de origen natural, la mayoría de ellos son de tipo polifenólicos como flavonoides, y generalmente se requiere un esquema dirigido para su aislamiento a partir del material vegetal.

### **1.1.2. Estudio Fitoquímico Dirigido**

La investigación de las sustancias químicas presentes en una planta puede realizarse de forma fitoquímica convencional o en forma biodirigida. La primera implica el aislamiento del mayor número de metabolitos secundarios. Sin embargo, los extractos, fracciones o compuestos obtenidos de este modo pueden o no presentar actividad biológica. Los métodos biodirigidos permiten el aislamiento de sustancias activas, ya que desde la obtención de los extractos se descartan aquellos que son inocuos en el sistema de prueba. Se realiza el mismo procedimiento con las fracciones del extracto activo y las activas se separan y purifican para lograr la obtención de principios activos (Ghisalberti, 1993; Hostettmann, 1997).

En este estudio se sustituyeron las pruebas biológicas, por reacciones químicas que nos dan indicio de la actividad antioxidante que estamos buscando y que al igual que los estudios biodirigidos nos indican que camino seguir para lograr el aislamiento de los MS de nuestro interés.

A continuación se describirá a un grupo muy importante de MS que por los antecedentes bibliográficos que se mencionaran más adelante, se sabe poseen potentes actividades antioxidantes, y que están presentes en *M. geometrizans*.

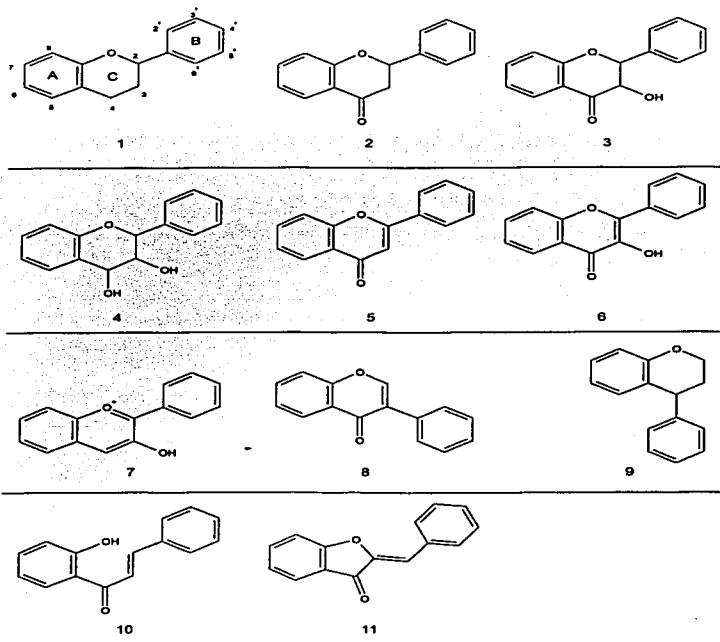
### 1.1.3. Los Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de tipo difenilpropanos, que generalmente se encuentran como *O*-glucósidos en sus fuentes naturales, aunque también se encuentran de forma natural como agliconas y *C*-glucósidos (Harborne y Baxter, 1999). Poseen como unidad básica un esqueleto de 15 carbonos provenientes del malonil coenzima A y del *p*-cumaril coenzima A, y en su biosíntesis, están involucradas numerosas enzimas hasta llegar a las chalconas que representan el último intermediario en su biosíntesis. La mayoría de los flavonoides se representan como moléculas de tipo  $C_6-C_3-C_6$ , con dos anillos aromáticos (A y B) y un heterociclo con oxígeno (C).

La nomenclatura de estos metabolitos tiene dos sistemas paralelos, el sistemático y el basado en los nombres triviales, este último es el más utilizado en la bibliografía de los flavonoides. Los flavonoides se pueden clasificar dependiendo de la estructura de su esqueleto base, el cual consta básicamente de un anillo aromático A, un heterociclo C y otro anillo aromático B (ver compuesto 1, figura 1.1.). Así, cuando la estructura base posee un carbonilo en la posición 4, el esqueleto se denomina flavanona (compuesto 2), cuando se hidroxila la posición 3 se denomina dihidroflavonol (compuesto 3), cuando se reduce el grupo carbonilo de la posición 4 se denomina flavan-3,4-diol (compuesto 4). La formación de un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 de las flavanonas y de los dihidroflavonoles conduce al esqueleto que se denomina flavonas (compuesto 5) y flavonoles (compuesto 6), respectivamente. Por otro lado, el esqueleto de las antocianinas (compuesto 7) posee un sistema conjugado de dobles ligaduras en todos los anillos, que les confieren características coloridas típicas moradas. Cuando el anillo C se une a través del carbono 3 o 4 del esqueleto general se forman los isómeros isoflavona (compuesto 8) y neoflavona (compuesto 9) respectivamente. Cuando el esqueleto de 15 átomos no forma el anillo C se conoce como chalcona (compuesto 10); y cuando el heterociclo formado es de 5 miembros se denomina aurona (compuesto 11) (Harborne y Baxter, 1999).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, encontrándose en muchas familias de inferiores, como líquenes y musgos; y en casi todas las familias de superiores. En otros organismos como hongos, se han aislado pocas moléculas de este tipo, mientras que en bacterias, hasta el día de hoy, no hay reportes de su

existencia. En animales, solo se tienen reportes del aislamiento de flavonoides en la glándula productora del olor característico del castor canadiense, y en las alas de algunas mariposa, pero su origen no es atribuible a biosíntesis animal, sino de los alimentos que estos seres consumen (Harborne y Williams, 2000).



**Figura 1.1** Estructuras de los esqueletos más comunes de los flavonoides.

Los flavonoides presentan espectros en UV característicos (entre los 200 y 400 nm) para cada tipo de estructura base y para los diferentes patrones de oxidación, debido a la conjugación que presentan los dobles enlaces y el carbonilo presentes en los tres anillos de la molécula. Además de esto, presentan movimientos característicos en los máximos de absorción de sus espectros UV, en presencia de reactivos como metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), ácido clorhídrico (HCl), ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) (Mabry et al., 1970), lo que ayudó a elucidar sus estructuras.

## **1.2. Radicales Libres en Sistemas Biológicos**

El término radical libre se utiliza para describir a una especie química, ya sea un átomo o un grupo de átomos con un electrón desapareado. Estas especies químicas se comportan como electrófilos, y atacan a especies nucleófilas. Los radicales libres son muy reactivos y se encuentran involucrados en muchos procesos, en algunos casos como materias primas o intermediarios de una reacción, y en otros como productos de desecho. Son utilizados en la industria de síntesis de polímeros, y se producen dentro de los sistemas biológicos en muchos procesos fisiológicos, en donde tienen una actividad muy importante.

Las reacciones de los radicales libres involucra tres pasos:

- 1.- iniciación,
- 2.- propagación, y
- 3.- terminación

La gran reactividad de estas especies químicas se debe a que tienen desapareado uno o más electrones en la última capa de valencia, lo que conduce a su inestabilidad y por lo tanto a su afinidad por un electrón para ocupar el espacio vacío en el orbital. Los radicales libres en general tienen un tiempo de vida media muy pequeña, pero existen radicales libres estables como el 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH').



En sistemas biológicos, los radicales libres más frecuentemente involucrados en los procesos fisiológicos se denominan especies reactivas y cuando el electrón desapareado se encuentra en el oxígeno se denominan ROS (por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) y cuando se encuentra en un átomo de Nitrógeno RNS (*Reactive Nitrogen Species*).

Las especies más importantes, hasta ahora caracterizadas, que están relacionadas con procesos fisiológicos se muestran en la tabla 1.3.

**Tabla 1.3** Principales tipos de Especies Reactivas presentes en sistemas biológicos (tomado de Hernández-Luis, 2001)

Radicales con Oxígeno (ROS)	
Nombre del radical	Fórmula
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$
Anión superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$
Radical peroxilo	$\cdot\text{OOR}$
Radical perhidroxilo	$\cdot\text{OOH}$
Radical alcóxido	$\cdot\text{OR}$

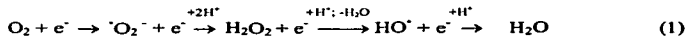
Radicales con Nitrógeno (RNS)	
Nombre del radical	Fórmula
Radical óxido nítrico	$\cdot\text{NO}$
Radical Dióxido de Nitrógeno	$\cdot\text{NO}_2$

Estas especies reactivas están relacionadas con el estrés oxidativo, del que hablaremos más adelante.

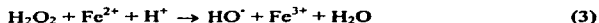
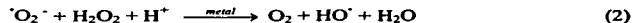
## 1.2.1. Formación *in vivo* de las Especies Reactivas más Importantes

### 1.2.1.1. Especies Reactivas con Oxígeno

El anión superóxido se forma como subproducto de la cadena de transporte de electrones de mitocondrias y retículo endoplásmico, y en la activación de las células fagocíticas. Gracias a la participación del complejo NADPH oxidasa, el cual en su estado activado produce el anión como intermediario en el proceso de reducción de una molécula de oxígeno a agua, ecuación (1) donde participan varias enzimas (McCord, 2000).



El radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) se forma a partir del anión superóxido ( $\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$ ) cuando hay trazas de metales de transición como Fe o Cu. Se produce principalmente por reacciones catalizadas por iones metálicos según la reacción de Haber-Weiss con metales de transición, ecuación (2) y la reacción de Fenton, ecuación (3) que se lleva a cabo con el anión superóxido (Kehrer, 2000).



donde el  $\text{Fe}^{2+}$  es generado según la ecuación (4):



Cuando el metal es cobre, la secuencia de reacciones se lleva a cabo de forma similar a la anterior, ecuación (5) (Gutteridge y Wilkins, 1982).



donde el  $\text{Cu}^+$  es generado según la ecuación (6):



Una segunda forma de producción del radical hidroxilo involucra al anión superóxido y al óxido nítrico, ecuación (7).



Debido a su alta reactividad y a su vida media tan corta de  $10^{-9}$ s, el radical hidroxilo es la especie más tóxica para el organismo, y su acción se limita a los sitios celulares vecinos al lugar donde es generado, por ejemplo membranas plasmáticas, moléculas de ADN y proteínas adyacentes.

### 1.2.1.2. Especies Reactivas con Nitrógeno

La especie reactiva de nitrógeno más importante, el óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), participa directamente en el control de muchos procesos incluyendo la regulación del tono vascular, en la modulación de la neurotransmisión, en la formación de la memoria y en actividad antimicrobiana, y actúa como segundo mensajero en el cerebro (Moncada *et al.*, 1991).

Se forma principalmente por la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS de *Nitric Oxide Synthase*), y a pesar de las funciones que desarrolla, este radical libre es capaz de causar la inhibición de la síntesis de ácido desoxiribonucleico (ADN) y cuando se encuentra en exceso es capaz de generar citotoxicidad (Rosen *et al.*, 1999).

### **1.2.2. El Estrés Oxidativo**

El estrés oxidativo se puede definir como una serie de daños fisiológicos provocados por la oxidación celular que causan los radicales libres. El estrés oxidativo se presenta cuando hay una sobreproducción de radicales libres (entre ellos el anión superóxido, el radical hidroxilo, etc.) y/o peróxido de hidrógeno en la célula, que provocan un desajuste en la relación prooxidante/antioxidante natural de la célula con tendencia favorable hacia el primero (Sies, 1991), que trae como principales consecuencias intracelulares los siguientes fenómenos (tabla 1.4):

**Tabla 1.4** Principales consecuencias a nivel celular del estrés oxidativo (Hernández-Luis, 2001).

1	sobreproducción de especies oxidantes;
2	descompartimentalización de los complejos iónicos presentes en algunas macromoléculas de importancia biológica y
3	modificación de las defensas contra los radicales libres.

Para que se den todas o alguna de las modificaciones expuestas, se requieren ciertos factores exógenos y/o endógenos a los que estamos expuestos los humanos, mostrados en la tabla 1.5.

Es importante señalar que todos los organismos están expuestos de una u otra forma al estrés oxidativo causado por las Especies Reactivas, y para cada tipo de organismo existen diferentes formas de actuar en contra de los daños ocasionados por los radicales libres. Así una planta tiene varios factores que propician estrés oxidativo como una elevada

tasa de radicación UVB, sequías prolongadas, depredadores, ozono entre otros (Grassmann et al., 2002).

**Tabla 1.5** Principales factores que desencadenan el estrés oxidativo en humanos (Hernández-Luis, 2001).

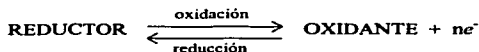
<b>Alimentos</b>	<b>Factores exógenos</b>	<b>Factores endógenos</b>	
	Dietas ricas en proteínas y lípidos		ejercicio físico exhaustivo
	Xenobióticos pro-oxidantes		inflamación crónica
	Dietas pobres en antioxidantes		cáncer
Dietas ricas en café y alcohol	isquemia/reperfusión		
Humo de cigarros	estrés psicológico		
<b>Contaminantes</b>	Exposición a O <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , hidrocarburos		
	Exposición a plaguicidas: DDT, paraquat, Diuron, Aldrin, etc.		
	Exposiciones ocupacionales		
<b>Fármacos</b>	Anticancerígenos		
	Psoralenos (furanocumarinas)		
<b>Radiaciones</b>			
Radiación ionizante, ultravioleta y microondas			
<b>Adsorbentes dérmicos</b>			
Derivados del psoraleno (pigmentadores)			

Gracias a los estudios en medicina que se han hecho con radicales libres, se ha encontrado que el estrés oxidativo está relacionado con la aparición de diversos males, como las enfermedades inflamatorias [artritis (McCord, 1974), vasculitis (Warren *et al.*, 1990), glomerulonefritis (Shah, 1995), lupus eritematoso (Mohan y Das, 1997)], enfermedades relacionadas con la isquemia [enfermedades del corazón (Omar y McCord,

1991), ataque fulminante del corazón (Baker *et al.*, 1998)], síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Flores *et al.*, 1993), enfisema pulmonar (Wallaert *et al.*, 1993), úlceras gástricas (Davies *et al.*, 1992), hipertensión (Kerr *et al.*, 1999), enfermedades neurológicas [esclerosis múltiple (Toshniwal y Zarling, 1992), enfermedad de Alzheimer (Lyras *et al.*, 1997), enfermedad de Parkinson (Cohen, 1984), distrofia muscular (Ragusa *et al.*, 1997)], alcoholismo (Dianzani, 1985), enfermedades relacionadas con el hábito de fumar (Asami *et al.*, 1997), y en general, daños a la membrana celular, modificaciones a enzimas y proteínas y daño al DNA. Inclusive, también esta involucrado en el envejecimiento (Meydani, 1999) y a la generación de cáncer (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### 1.3. Los Antioxidantes en Sistemas Biológicos

La oxidación se define como el intercambio de electrones de un átomo a otro bajo el esquema general



De acuerdo al esquema, un antioxidante es una especie química que puede reaccionar con otra de naturaleza oxidante, y que previene la oxidación de un sustrato.

#### 1.3.1 Antioxidantes en Humanos

Los sistemas biológicos no están exentos de las reacciones de oxidación por parte de moléculas oxidantes como los radicales libres, por lo que poseen una importante cantidad de sistemas antioxidantes. Estos antioxidantes del organismo, se pueden definir como "cualquier sustancia que, cuando se encuentra presente en bajas concentraciones comparadas con el sustrato que se puede oxidar, detiene o previene significativamente la oxidación de ese sustrato" (Halliwell, 1990). Los sustratos que se pueden oxidar en sistemas biológicos incluye todo lo que se puede encontrar en las células vivas, incluyendo

proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. Dentro de la diversa protección que muestran los antioxidantes está el prevenir los daños ocasionados por las reacciones de las especies reactivas (*ROS* ó *RNS*), con las moléculas endógenas, y que incluyen la prevención de la formación de esas especies reactivas, la intercepción de las ya formadas y la reparación de los tejidos dañados.

Los antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 1.6).

**Tabla 1.6** Principales tipos de sistemas antioxidantes presentes en sistemas biológicos.

Enzimáticos	No enzimáticos
superóxido dismutasas	$\alpha$ -tocoferol (vitamina E)
GSH peroxidasas	ascorbato (vitamina A)
catalasa	flavonoides (de la dieta, rutinina, quercetina, etc.)
NaDPH-quinona	sintéticos (BHA, BHT)
oxidoreductasas	$\beta$ -caroteno
epóxido hidrolasa	vitamina A
enzimas de conjugación ( UDP-glucoroniltransferasa)	urato
GSSG reductasa	proteínas plasmáticas
sistemas de transporte (exportación de conjugados)	


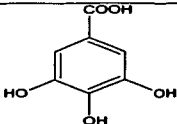
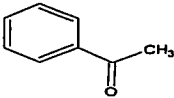
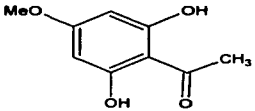
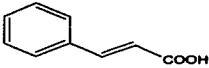
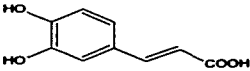
En este caso, nos vamos a enfocar en los antioxidantes no enzimáticos, y que se pueden aislar de plantas, y que para nuestros fines podemos definir como “aquellos metabolitos secundarios que protegen a los sistemas biológicos contra los posibles efectos adversos de las reacciones que pueden causar oxidaciones excesivas” (Edmonds, 2000).

### 1.3.2. Antioxidantes de Origen Vegetal

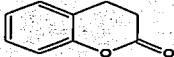
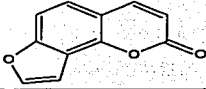
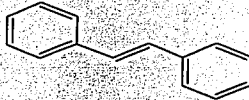
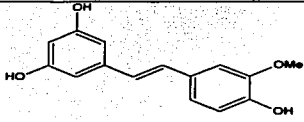
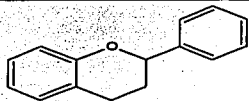
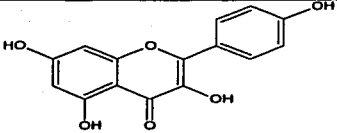
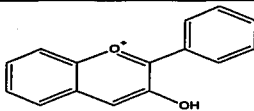
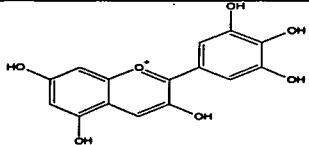
En los últimos años, se han estudiado los metabolitos secundarios de diferentes plantas que poseen actividad antioxidante (Mittler, 2003). Se ha encontrado en general, que los compuestos fenólicos y polifenólicos, son muy activos (Bravo, 1998). En la tabla 1.7, se mencionan algunos de los grupos de compuestos polifenólicos más representativos que poseen actividad antioxidante, que han sido aislados de varias plantas.

Dentro de la amplia variedad de metabolitos secundarios de tipo polifenólicos, algunos de los más relevantes por sus actividades antioxidantes son los diferentes tipos de flavonoides (Burda y Oleszek, 2001).

**Tabla 1.7** Diferentes tipos de Metabolitos Secundarios antioxidantes de tipo polifenólico.

Nombre	Estructura base	Ejemplo	referencia
Ácidos fenólicos			Kim <i>et al.</i> , 2002
acetofenonas			Mathiensen <i>et al.</i> , 1997
ácidos cinámicos			Foley <i>et al.</i> , 1999

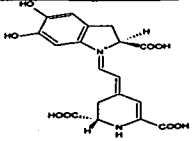
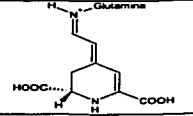
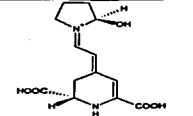


coumarinas			Ng <i>et al.</i> , 2000
Estilbenos			Wang <i>et al.</i> , 2001
Flavonoides			Kim <i>et al.</i> , 2000
Antocianidinas			Noda <i>et al.</i> , 2002

**Tabla 1.7** continuación.

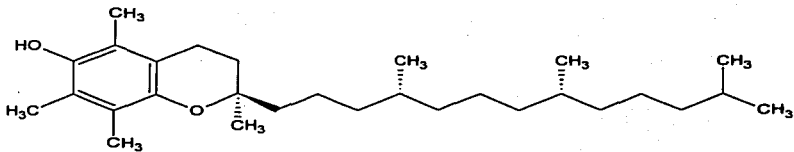
En este rubro, hay que mencionar a las betalainas, otro grupo de compuestos que últimamente están teniendo gran auge en su investigación por sus propiedades antioxidantes (Kanner *et al.*, 2001). En la tabla 1.8 se muestran algunos ejemplos de betalainas con propiedades antioxidantes.

**Tabla 1.8** Algunas moléculas de tipo betalainas, que se han encontrado con actividad antioxidante.

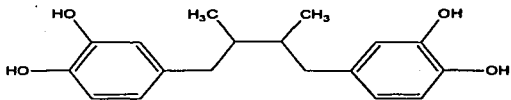
compuesto	Estructura	referencia
Betanidina	 <p>The structure shows a 5-hydroxytryptophan derivative linked via its indole ring to the C2 position of a pyridine ring. The pyridine ring has a carboxylic acid group at the C4 position and a methyl group at the C6 position.</p>	Kanner <i>et al.</i> , 2001
Betaxantina	 <p>The structure shows a tryptophan derivative where the indole ring is linked to the C2 position of a pyridine ring. The pyridine ring has a carboxylic acid group at the C4 position and a methyl group at the C6 position. The tryptophan side chain is labeled as 'Glutamina'.</p>	
Indicaxantina	 <p>The structure shows a tryptophan derivative where the indole ring is linked to the C2 position of a pyridine ring. The pyridine ring has a carboxylic acid group at the C4 position and a methyl group at the C6 position. The tryptophan side chain has a hydroxyl group at the C3 position.</p>	Butera <i>et al.</i> , 2002

Algunos de los antioxidantes de origen vegetal más conocidos por sus potentes actividades antioxidantes se muestran en la figura 1.2. Estas moléculas se utilizan con frecuencia como referencias en algunos de los métodos *in vivo* e *in vitro* más utilizados para determinar actividad antioxidante de MS.

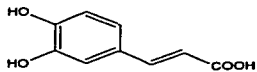
**$\alpha$ -tocoferol**



**ácido nordihidroguaiaretico**



**ácido caféico**



**Figura 1.2** Diferentes tipos de moléculas utilizados como referencias en la búsqueda de antioxidantes.

## 1.4. Métodos de Estudio *in vitro* de Antioxidantes

Estos son algunos de los métodos para determinar la capacidad antioxidante de metabolitos secundarios u otras moléculas químicas, más empleados en la literatura:

### 1.4.1. Método del Radical DPPH<sup>•</sup>

El DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) es un radical libre estable, que fue obtenido por primera vez por Goldschmidt (Goldschmidt, 1922, citado en Walling, 1957). Es estable a temperatura ambiente como cristales de color violeta, y en solución con etanol o MeOH, presenta un intenso color violeta.

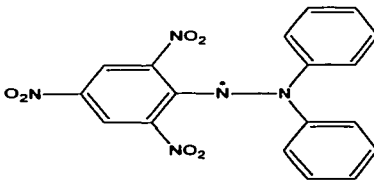


Figura 1.3. Estructura del DPPH<sup>•</sup>

De la estructura de esta molécula (Figura 1.3) podemos decir que debido al paramagnetismo de su electrón no apareado, puede reaccionar como cualquier radical libre, y al hacerlo, resulta en una molécula estable, diamagnética.

El DPPH<sup>•</sup>, presenta un fuerte color violeta en solución con metanol o etanol, que cuando reacciona con un antioxidante, se pierde resultando en una solución de color amarilla clara debida a la formación de la difenilpicril hidracina (DPPH-H), lo que representa una clara ventaja para las determinaciones espectroscópicas, pudiendo identificar moléculas con potencial antioxidante, a través de este método (Blois, 1958).

Este radical ha sido empleado en estudios de moléculas antioxidantes puesto que reacciona con una amplia variedad de compuestos como cisteína, glutatión, ácido ascórbico, tocoferoles, compuestos aromáticos polihidroxilados, aminas aromáticas entre muchas otras. Tiene una estabilidad relativamente alta a la autoreducción en soluciones de metanol o etanol, presenta reacciones de reducción irreversibles con las sustancias antioxidantes, presenta un máximo de absorción en el visible en solución etanólica de 517 nm que se pierde al formarse el DPPH-H, que hace de esta molécula un excelente reactivo para la investigación.

#### **1.4.2. Método TRAP (Parámetro Antioxidante Total de Atrapadores de Radicales Libres)**

Este método se basa en la disminución de la fluorescencia de la R-ficoeritrina debido a que el ABAP (2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) hidrocloreuro) genera radicales libres a 37 °C. Se mezclan 750 µL de ficoeritrina (100 µL suspendidos en 100 mL de solución amortiguadora salina pH 7.0), 250 µL de solución amortiguadora salina pH 7.0, 50 µL de solución antioxidante, en una cubeta para medir fluorescencia, y se mantienen a 37 °C por 10 min. La reacción de oxidación comienza por la adición de 26 mM de ABAP. El decaimiento de la fluorescencia se cuantifica cada 5 min. Los compuestos antioxidantes inhiben la descomposición y por lo tanto retardan el decaimiento de la fluorescencia. El ensayo termina cuando la fluorescencia decrece con regularidad. El potencial antioxidante de las moléculas químicas se evalúa con el retardo del consumo de oxígeno. Este método se ve interferido por proteínas presentes en las muestras y con muestras muy diluidas (Ghiselli *et al.*, 1995).

### **1.4.3. Método del Cation Radical DMPD<sup>+</sup>**

El principio de este método está basado en la reducción del cation radical DMPD<sup>+</sup>. Una solución 100 mM de DMPD (dihidrocloruro de *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina) se prepara disolviendo 209 mg de DMPD en 10 mL de agua destilada. Un mL de esta solución se adiciona a 100 mL de solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.25. se adiciona 0.2 mL de una solución de cloruro férrico 0.05 M, resultando en la formación del cation radical DMPD<sup>+</sup>, de color violeta, el cual se cuantifica a 505 nm, y se ajusta a una absorbancia de 0.900 +/- 0.100. este radical es estable por 12 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Un µL de la solución de DMPD<sup>+</sup> y 50 µL de la solución antioxidante a probar se mezcla por 10 min a 25 °C. Después, se cuantifica la absorbancia a 505 nm (Fogliano *et al.*, 1999).

### **1.4.4. Método de la Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) TEAC.**

Este ensayo se basa en la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)) en la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y metamioglobina para generar el cation radical ABTS<sup>+</sup> (de color azul-verdoso), el cual tiene una λ<sub>max</sub> a 734 nm. Se realiza el experimento antioxidante, en el cual se colocan soluciones de antioxidantes a probar junto al ABTS<sup>+</sup> recién formado, para cuantificar la absorbancia continuamente, y comparar esos resultados con los obtenidos con trolox (ácido (S)-(-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico, es un derivado del α-tocoferol). Todas las soluciones se preparan en solución amortiguadora de sales de fosfatos (PBS) a pH 7.4 (Miller *et al.*, 1993).

#### **1.4.4.1. Método TEAC con $\text{MnO}_2$**

El catión radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  se prepara filtrando una solución de ABTS (en PBS) a través de polvos de dióxido de manganeso. El exceso de  $\text{MnO}_2$  se remueve pasando el filtrado a través de un filtro de jeringa ( $0.2 \mu\text{m}$ ). Esta solución se diluye con PBS (5 mM, pH 7.4) ajustando la absorbancia a 734 nm a  $0.700 \pm 0.020$ , y se preincuba a temperatura ambiente por dos horas antes de usarse.

Un mL de la solución de  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  y  $200 \mu\text{L}$  de la solución acuosa de antioxidantes se mezclan vigorosamente en tubos de reacción por 30 s y se centrifugan 60 s a 10 000 rpm. Se cuantifica la absorbancia de la fase baja a 734 nm (Miller *et al.*, 1996).

#### **1.4.4.2. Método TEAC con ABTS y $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$**

Este ensayo se basa en la reducción del  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ , el cual es formado mezclando una solución stock de ABTS (7 mM en agua) con 2.45 mM de persulfato de potasio. Después de 24 h, la solución de  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  en este ensayo se puede utilizar para medir la actividad antioxidante de moléculas lipofílicas e hidrofílicas, para lo cual se diluye en etanol y agua respectivamente hasta obtener una absorbancia de  $0.700 \pm 0.020$  a 734 nm. Las soluciones de antioxidantes se preparan en agua o etanol según sea el caso. Se mezclan 1 mL de solución de  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  y  $100 \mu\text{L}$  de los antioxidantes por 45 s y se determinan las absorbancias a 734 nm (Re *et al.*, 1999).

#### **1.4.5. Comparación de los Métodos Antioxidantes *in vitro***

Para determinar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios a través de los diferentes métodos sencillos *in vitro* que permiten realizar una gran cantidad de mediciones y que resultan sencillos y reproducibles, se analizaron los resultados de las evaluaciones antioxidantes a través de varios métodos y utilizando diferentes sustancias antioxidantes, representando los diferentes tipos de metabolitos secundarios antioxidantes presentes en las plantas (Schlesier *et al.*, 2002). En este estudio, encontraron que el método del DPPH<sup>•</sup> es adecuado para determinar las propiedades antioxidantes de polifenoles representados por el ácido gálico en ese estudio, y en general, para metabolitos secundarios ligeramente lipofílicos, solubles en solventes orgánicos polares como metanol. Esto constituye un buen antecedente en cuanto a la investigación de las propiedades antioxidantes de Metabolitos Secundarios y constituyó una buena base para la selección del método utilizado en esta tesis.

### **1.5. Empleo de los Antioxidantes como Nutracéuticos**

El término "nutracéutico" fue acuñado en 1989 por la Fundación para la Innovación en Medicina (New York, USA) para darle un nombre a compuestos sintéticos o aislados de fuentes naturales que tenían efectos en la salud de pacientes que padecían enfermedades como cáncer y que consumían regularmente, alimentos que los contenían.

Un nutracéutico se puede definir como aquella sustancia que es un alimento o parte de un alimento, que proporciona beneficios medicinales o en la salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades (Andlauer y Fürst, 2002). Así, tenemos una amplia variedad de nutrientes aislados, suplementos dietéticos y dietas diseñadas genéticamente como alimentos, productos herbales, y productos procesados como cereales, sopas o bebidas.

En este sentido, desde que se relacionó el estrés oxidativo con diferentes enfermedades (como la analizamos en el punto 1.2.3. de esta tesis), se empezaron a utilizar antioxidantes como complementos alimenticios, e inclusive se comenzaron a realizar



estudios enfocados a la manipulación genética de alimentos con el fin de modificar el contenido de determinados metabolitos secundarios, como los flavonoides, presentes en plantas que se consumen habitualmente, y que de esta forma, pueden proporcionar beneficios a quienes las consumen (Dixon y Steele, 1999)

Los nutraceuticos que más nos interesan son aquellos que por su origen vegetal representan verdaderas alternativas de actividad terapéutica o preventiva, y son metabolitos secundarios. Así, los metabolitos secundarios de las cactáceas en general, y de *M. geometrizans* en particular, pueden brindar la posibilidad de encontrar nuevos antioxidantes, o representar nuevas fuentes de obtención de otros ya conocidos (Bruni *et al.*, 2002), proporcionando un valor agregado a los MS presentes en estas plantas, y aumenta las posibilidades de relacionar el uso terapéutico que la planta tiene con la presencia de determinados metabolitos secundarios.

A continuación, hablaremos de la familia de plantas a la que pertenece *M. geometrizans* y se tratarán los aspectos botánicos de esta especie.

## **1.6. Las Cactáceas**

La familia de las Cactáceas incluye plantas ampliamente distribuidas en América con alrededor de 100 a 110 géneros y más de 1500 especies. En México están representadas por aproximadamente 51 géneros y 850 especies clasificadas, 80 % de las cuales son endémicas.

Está dividida en tres subfamilias: la OPUNTIOIDEAE, con formas de pequeños árboles o arbustos, representada por cinco géneros y varios subgéneros; la PERESKIOIDEAE, de forma arborescente y con hojas conspicuas representada por dos géneros; y por último la CACTOIDEAE, la más grande de todas con cerca de 91 géneros y 1300 especies con formas arborescentes o globosas (Bravo, 1937).

Hay que resaltar que a pesar de la gran abundancia de este tipo de plantas en nuestro país, no se han realizado estudios extensos en ellas. La familia enfrenta un serio problema

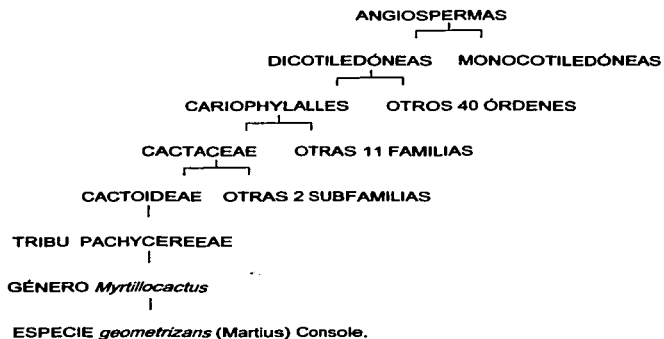
que pone a muchas especies al borde de la extinción, debido a la pérdida de sus ecosistemas, así como la utilización indiscriminada a que se someten, ya que muchas especies son apreciadas como ornatos y existe un importante tráfico ilegal de estas, así como también, su utilización como alimentos o materia prima, la mayoría de las veces sin ningún programa de regeneración o reintroducción.

### **1.6.1. *Myrtillocactus geometrizans***

#### **1.6.1.1. Características Generales y Clasificación**

*M. geometrizans* (Martius) Console, se clasifica siguiendo la propuesta señalada por la International Organization for Succulent Plant Study (IOS) (figura 2). Es una especie endémica de México y se caracteriza por ser de forma arborescente, llegando a medir hasta más de 4 m de alto; posee un tronco bien definido, corto; con ramificación abundante que forma una copa bastante amplia, hasta de 5 m; tiene numerosas ramas que a su vez se ramifican, algo encorvadas, de 6-10 cm de diámetro, de color verde azulado; presenta de 5 a 6 costillas, redondeadas, de 2-3 cm de alto; las areólas poseen espinas radiales y centrales; las espinas radiales (generalmente 5), son cortas, de 2-10 mm de largo y en ocasiones hasta de 3 cm, rojizas cuando jóvenes, algo aplanadas o hinchadas en la base; por otro lado, la espina central es muy grande, y posee la peculiar característica de ser en forma de daga, de 1-7 cm de largo y 6 mm de ancho, negra. Las flores se sitúan en la parte superior de las areólas, son pequeñas, de 2.5-3.5 cm de ancho, de color blanco verdoso; existen varias en la misma areóla; el fruto es pequeño, de 1-2 cm de diámetro, globoso, purpúreo, sin espinas. Florecen y fructifican entre Febrero y Julio ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)) y en algunos sitios según reportes de los pobladores, crecen en comunidades casi únicas denominadas garrambullales.

## SISTEMÁTICA



**Figura 1.3.** Sistemática de *M. geometrizans*.

Es importante señalar que esta especie no se encuentra en peligro de extinción, por lo que este trabajo no afecta de ninguna forma la población de garambullos en la localidad donde se recolectó.

### 1.6.1.2. Sinónimos

*Cereus geometrizans* Mart.  
*Cereus pugioniferus* Lem.  
*Cereus gladiator* Otto et Dietr.  
*Cereus garambello* Haage  
*Cereus geometrizans pugioniferus* Salm-Dyck  
*Cereus geometrizans quadrangularispinus* Lem.  
*Myrtillocereus geometrizans* (Mart.) Console var. *pugioniferus* (SD) Fric et Kreuz.

### **1.6.1.3. Nombres Comunes**

Garambullo en comunidades del centro de México, padre nuestro, tnu dichi noni (Mixteco, Oax.), too dichi noni (mixteco, Oax.).

### **1.6.1.4. Localización**

Está ampliamente distribuida en el territorio nacional, encontrándose en los Estados de Aguascalientes, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Arias *et al.* 1997).

### **1.6.1.5. Usos**

De esta planta se aprovechan como alimento las flores y los frutos, que la gente de las comunidades recolecta, ya sea de ejemplares domesticados o de garambullos silvestres. Las flores se consumen en platillos con huevo, y los frutos se consumen frescos, en conserva como mermelada o formando parte de bebidas.

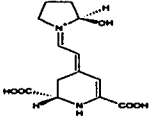
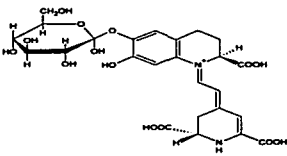
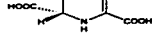
Por otro lado, según reportes de los pobladores, se utilizan los tallos en emplastos para curar inflamaciones y otras enfermedades cutáneas ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)).

## II. Antecedentes Fitoquímicos

### 2.1. Metabolitos Secundarios Aislados

Estos son los estudios fitoquímicos que se han realizado de *M. geometrizans* desde 1957 (tabla 2.1).

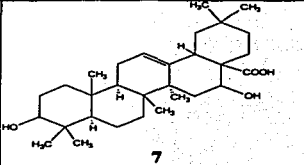
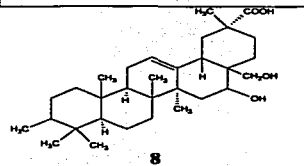
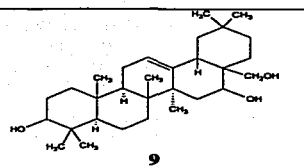
**Tabla 2.1** Estructuras de los MS que conforman los antecedentes fitoquímicos de *M. geometrizans*

Parte trabajada	Metabolito aislado	estructuras	Referencia
Cultivo de tejido de tallos	betalainas	No determinadas	Colomas y Bulard, 1977
Frutos y cultivos de tejido de tallos	indicaxantina 1,		Colomas <i>et al.</i> , 1978
	betanina 2,	<p><b>1</b></p> 	
	phyllocactina 3.	<p><b>2</b></p> 	

**Tabla 2.1** continuación.

		<p><b>3</b></p>	
Tallos y espinas	<p>quercetina <b>4</b>, kaempferol <b>5</b>, isorhamnetina <b>6</b>.</p>	<p><b>4</b></p> <p><b>5</b></p> <p><b>6</b></p>	<p>Burret <i>et al.</i>, 1982</p>
Frutos	betalainas	No determinadas	<p>Reynoso <i>et al.</i>, 1997</p>

**Tabla 2.1** continuación.

Parte trabajada	Metabolito aislado	estructuras	Referencia
Partes aéreas	Ácido cochálico <b>7</b>	 <p style="text-align: center;"><b>7</b></p>	Djerassi <i>et al.</i> , 1957
	Acido myrtilogénico <b>8</b>	 <p style="text-align: center;"><b>8</b></p>	
	Longispinogenina <b>9</b>	 <p style="text-align: center;"><b>9</b></p>	

## 2.2. Otros Antecedentes

En otro estudio se caracterizó el comportamiento de cultivos celulares de tejido de tallos, encontrando que tienen la capacidad de oxidar el  $\Delta^2$ -careno, por lo cual los autores suponen que en los tejidos del garmabullo se pueden sintetizar sesqui- y diterpenoides, lo cual no ha sido comprobado aún (Gil *et al.*, 1995).

Por otro lado, se estudió la composición de su mucílago, encontrando que este polímero estaba constituido por rhamnosa (50.3 %), galactosa (19.2 %), xilosa (4.9 %), arabinosa (4.1) y ácido galacturónico (21.5 %) (Pérez *et al.*, 1994).

### **III. Justificación**

Las plantas han proporcionado muchos de los fármacos empleados actualmente y muchas moléculas base para sintetizar otros tantos (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002), proporcionando una gran diversidad de estructuras químicas activas, y ofreciendo alternativas viables para la obtención de principios activos contra diversas enfermedades, con novedosos mecanismos de acción o que disminuyen la toxicidad o los efectos adversos que los actuales causan. Por la relación que se ha encontrado entre el consumo de antioxidantes de origen natural y la prevención de diversas enfermedades (Ross y Kasum, 2002), muchos de los estudios que se realizan en la actualidad en diversos centros de investigación, están encaminados a obtener metabolitos secundarios antioxidantes.

Los antecedentes fitoquímicos de *Myrtillocactus geometrizans*, nos informan que se han aislado Metabolitos Secundarios que, por otro lado, están reportados como antioxidantes, hechos que nos permiten realizar el estudio dirigido de las partes aéreas para obtener solamente los antioxidantes.

Es importante destacar que en la literatura no se ha reportado ningún estudio de actividad antioxidante de las partes aéreas de esta especie y este trabajo nos otorga la oportunidad de contribuir al conocimiento de la fitoquímica de la planta y a dar un valor agregado a sus metabolitos secundarios.



## **IV. Hipótesis**

Si *M. geometrizans*, crece y se desarrolla en ambientes semiáridos, sometidos a un elevado de estrés oxidativo, producirá en sus tejidos Metabolitos Secundarios de tipo polifenólicos con actividad antioxidante.

## **V. Objetivos**

### **5.1 General**

Conocer a través de un estudio fitoquímico dirigido, cuales Metabolitos Secundarios de tipo polifenólicos de las partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans*, poseen actividad antioxidante, a través de la reducción del radical libre DPPH.

### **5.2 Particulares**

- 1.- Caracterizar la actividad antioxidante de los extractos de *n*-hex y de etanol al 80 % de *Myrtillocactus geometrizans* utilizando el método del DPPH'.
- 2.- Aislar, purificar e identificar, por los métodos más convenientes, los metabolitos secundarios antioxidantes del extracto que resulte más activo.
- 3.- Caracterizar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios aislados.

## **VI. Materiales y Equipo**

Todos los reactivos empleados para la realización de este trabajo, fueron obtenidos comercialmente. El radical DPPH' (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), sephadex LH 20 para cromatografía (25-100  $\mu\text{m}$ ) y  $\alpha$ -tocoferol (2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetiltridecil)-6-cromanol) se compraron de Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, México. El *n*-hexano (*n*-hex), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ), metanol ( $\text{MeOH}$ ), Etanol ( $\text{EtOH}$ ), éter dietílico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), *n*-butanol (*n*-but), las cromatoplasmas analíticas de sílica gel GF<sub>254</sub> para cromatografía en capa fina, y la sílica gel grado 60 (70-230, 60A°) para cromatografía en columna, de Merck-Mexico, S.A., Mexico.

Para concentrar a presión reducida los diferentes extractos, se utilizó un rotavaporador Büchi RE 111 con baño de agua con temperatura variable; para la cuantificación de la reducción del DPPH' y para la obtención y registro del espectro de barrido en el UV de 200 a 400 nm del MS aislado, se utilizó un espectrofotómetro Spectronic modelo Génesis 5, y un aparato Fisher-Johns con termómetro hasta 300 °C, para la medición de la temperatura de fusión.

## **VII. Parte Experimental**

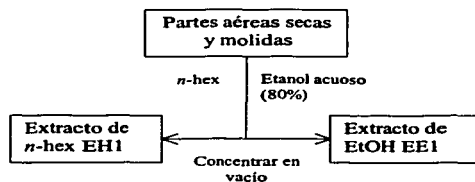
### **7.1. Material Vegetal**

Las partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans* se recolectaron en enero del 2001 a la altura del kilómetro 20 de la carretera federal Pachuca-Actopan.

Se secaron completamente a temperatura ambiente y posteriormente se pulverizaron en un molino para obtener 934 gramos de material seco y molido.

## 7.2. Obtención de los Extractos Primarios

Con el fin de extraer los metabolitos secundarios antioxidantes, las partes aéreas secas y molidas se colocaron en un recipiente de vidrio, para su maceración adicionando 10 L de *n*-hex por 48 horas a temperatura ambiente, se filtró y se separaron los filtrados para repetir la maceración con el residuo vegetal. Posteriormente, este residuo vegetal se maceró con 4 L de etanol al 80% por 48 h a temperatura ambiente, después de lo cual se filtró, para separar el filtrado y se repitió la operación (esquema 7.1).



**Esquema 7.1** Procedimiento para la obtención de los extractos orgánicos a partir del material vegetal seco y molido.

Los filtrados de *n*-hex y EtOH acuoso al 80 % se concentraron por separado en un rotavapor a presión reducida, obteniendo un residuo color café amarillento, espeso, viscoso, sin olor que corresponde a EH1 y un residuo acuoso de color amarillento que corresponde a EE1, respectivamente. Los pesos de estos extractos se muestran en la tabla 7.1.

**Tabla 7.1** Cantidades finales de los extractos, después de concentrarlos a presión reducida. EH1 se pesó en una balanza analítica y EE1 se midió su volumen en una probeta.

Extractos primarios	
EH1	EE1
22.89 ± 0.005 g	1.9 L

## **7.3. Determinación de la Actividad Antioxidante**

### **7.3.1. Ensayo Antioxidante Autobiográfico en Cromatografía en Capa Fina (CCF)**

De cada extracto o compuesto se realizó una CCF en cromatofolios de aluminio de sílica gel utilizando el sistema de elución adecuado en cada caso. Una vez que se desarrolla la cromatografía, se aplica uniformemente en la superficie de la cromatoplaaca una solución al 0.1 % (p / v) de DPPH<sup>•</sup> en metanol como reactivo revelador. Se observa un color violeta intenso en la superficie aplicada. Si existen Metabolitos Secundarios antioxidantes, aparecen manchas de color amarillo de diferentes intensidades que van del pálido al intenso dependiendo de la naturaleza química del compuesto antioxidante (Céspedes *et al.*, 2002).

La aparición del color amarillo se debe a la reducción del DPPH<sup>•</sup> en presencia del o los compuestos antioxidantes se debe a la formación de difenilpicril hidracina (DPPH-H), (Blois, 1958).

### **7.3.2. Ensayo Antioxidante en Espectrofotómetro UV**

Se prepararon soluciones stock de los extractos, fracciones, sub-fracciones y compuestos que se probaron, con los disolventes apropiados (*n*-hex, AcOEt, MeOH, éter, etc.), para realizar diluciones y obtener las concentraciones necesarias, para añadir alícuotas de 50 µL a 5 mL de una solución metanólica de al 0.004% (m/v) y obtener las concentraciones finales reportadas en las gráficas que más adelante se ilustran. La mezcla de reacción se agitó por 30 min, para después, determinar la absorbancia a 517 nm. Se utiliza  $\alpha$ -tocoferol como referencia positiva a una concentración final de 50 ppm y el disolvente utilizado en cada muestra junto con la solución metanólica de DPPH<sup>•</sup> como blanco. Cada determinación se realiza por triplicado y se obtiene el promedio.

El porcentaje de reducción del DPPH<sup>•</sup> se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$\% \text{ de reducción} = 100 \times (1 - \text{absorbancia de la muestra} / \text{absorbancia del blanco})$

y se determina la concentración antioxidante del 50 % ( $CA_{50\%}$ ) de una gráfica Dosis-Respuesta (% de DPPH' reducido  $v$ , concentración de antioxidante).

## **7.4. Estadística**

Los datos recopilados de los experimentos de reducción del DPPH' se trataron en el programa Origin 5.0, para obtener los promedios, desviaciones estándar, curvas dosis-respuesta y los valores de Concentración Antioxidante 50 % ( $CA_{50\%}$ ) a partir de las curvas dosis-respuesta.

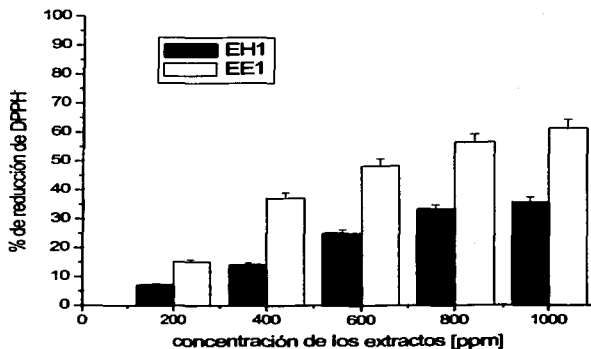
# **VIII. Resultados y Discusión**

## **8.1. Determinación de la Actividad Antioxidante de EH1 y EE1**

Después de concentrar los extractos a presión reducida, se realizó el ensayo antioxidante para determinar en que extracto se concentraban los metabolitos con actividad antioxidante.

Se realizó CCF de cada uno de los extractos (para EH1, sílica gel fase normal y *n*-hex-AcOEt 7:3 (v/v); para EE1, sílica gel fase normal y MeOH-AcOEt 9:1 (v/v), revelada una con DPPH'), encontrando manchas antioxidantes en ambos extractos, siendo más intensas y amarillas, las manchas del extracto etanólico.

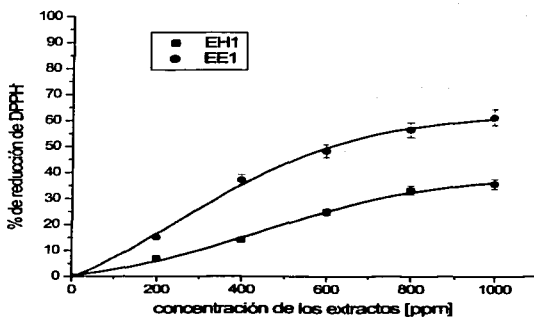
Se realizó la evaluación espectroscópica de los dos extractos hasta 1000 ppm, obteniendo un comportamiento de la reducción de DPPH dosis-dependiente,



**Gráfica 8.1** % de reducción de EH1 y EE1 a diferentes concentraciones. Barras de error al 5 %. EH1 extracto de *n*-hex, EE1 extracto de etanol al 80 %.

Podemos observar que el extracto de etanol presenta una mayor actividad antioxidante que el extracto de *n*-hex, lo que corresponde a lo observado en la CCF, en donde se aprecian más manchas con actividad antioxidante y más intensas en el extracto de etanol que en el de *n*-hex.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Gráfica 8.2** Porcentaje de reducción de DPPH de EH1 y EE1 a diferentes concentraciones. Barras de error al 5 %.

De la interpolación de esta grafica se obtuvieron los  $CA_{50\%}$  mostrados en la tabla 8.1.

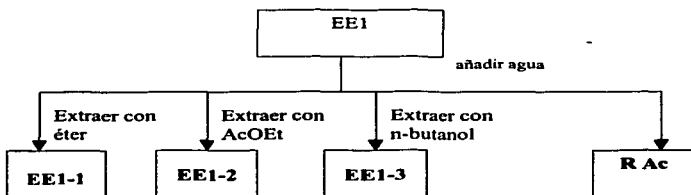
**Tabla 8.1** Valores de los obtenidos  $CA_{50\%}$  para los extractos, obtenidos de la gráfica 8.2. ND = no determinado, puesto que el valor máximo de inhibición de EH1 fue menor al 50 %.

	EH1	EE1
$CA_{50\%}$ [ppm]	ND	620.96 ±

En base al valor de 592.2 ppm de la  $CA_{50\%}$ , determinamos continuar trabajando con el extracto de etanol. No se determinó el  $CA_{50\%}$  del extracto de *n*-hex debido a que no presentó una actividad mayor al 50 % de reducción del DPPH presente en la solución de prueba.

## 8.2. Fraccionamiento Primario de EE1

Al extracto acuoso se adicionaron 100 mL de agua destilada y se extrajo con éter (3 x 800 mL), AcOEt (3 x 800 mL), y *n*-butanol (3 x 800 mL), de tal forma que se obtuvieron extractos de polaridad creciente. La fracción acuosa residual se dejó evaporar a temperatura ambiente hasta completa sequedad (ver esquema 8.1).



**Esquema 8.1** Procedimiento para la obtención de los extractos EE1-1, EE1-2, EE1-3 y R Ac (Residuo acuoso) a partir del extracto de etanol.

Se pesaron las cantidades obtenidas de los diferentes extractos, que se muestran en la tabla 8.2.

**Tabla 8.2** Pesos de los extractos obtenidos a partir de EE1.

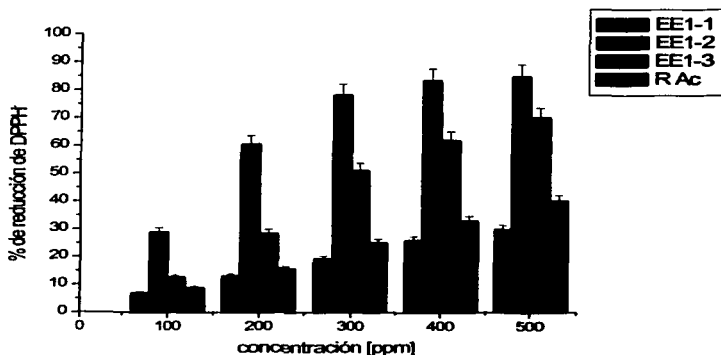
Extracto	EE1-1	EE1-2	EE1-3	R Ac
Cantidad (g)	11.27 ± 0.005	14.01 ± 0.005	58.84 ± 0.05	284.3 ± 0.005



### 8.3. Determinación de la Actividad Antioxidante de las Fracciones de EE1

De igual forma a la antes explicada se realizó CCF de cada uno de los extractos mostrando cada una de las placas diferentes patrones de actividad antioxidante, resultando la fracción EE1-2 la que presenta mayor cantidad de manchas amarillas de mayor intensidad.

Se procedió a realizar el ensayo espectroscópico con EE1-1, EE1-2, EE1-3 y R Ac hasta 500 ppm para determinar sus  $CA_{50\%}$  y determinar cual o cuales son los más activos.



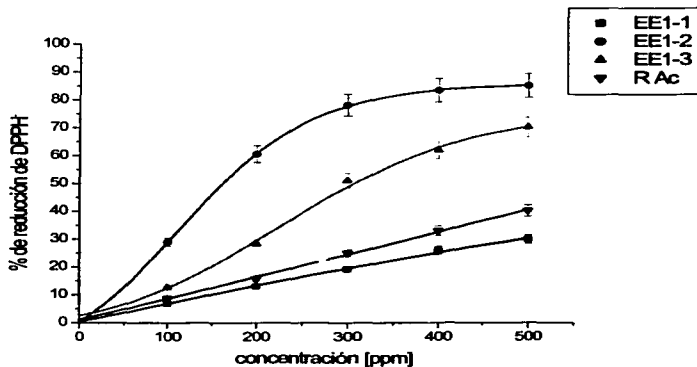
**Gráfica 8.3** % de reducción de DPPH de los diferentes extractos, en donde se muestra el efecto dependiente de la concentración. Barras de error al 5 %.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la gráfica 8.3 se puede observar que todas las muestras en este experimento, tienen un efecto dosis-dependiente, resultando EE1-2 el más activo, aunque EE1-3, que tiene compuestos más polares, también presenta actividad aunque menor que la de acetato.

EE1-1 y R Ac, no muestran una actividad notable, por lo que se asume que los compuestos antioxidantes que nos interesan, están contenidos en los extractos de acetato y *n*-butanol.

Para poder determinar la fracción más activa se graficaron los resultados de tal forma que se pueda obtener la CA<sub>50%</sub> y así determinar con cual extracto se continuará el estudio (gráfica 8.4).



**Gráfica 8.4** Efecto de los diferentes extractos sobre la reducción del DPPH' a diferentes concentraciones. Barras de error al 5 %. R Ac = residuo acuoso.

Una vez obtenidos los valores de los  $CA_{50\%}$  para cada uno de los extractos, observamos el efecto de la concentración de los diferentes extractos sobre la reducción del DPPH', que se comporta de forma dosis-dependiente.

EE1-1 y R Ac no presentaron actividad mayor al 50 % por lo que no se pudo determinar su  $CA_{50\%}$ . Los resultados se muestran en la tabla 8.3.

**Tabla 8.3** Valores de  $CA_{50\%}$  para los diferentes extractos, obtenidos a partir de la gráfica 8.4. ND = no determinado, debido a que la actividad mostrada no fue mayor al 50 %.

	$CA_{50\%}$ [ppm]
EE1-1	ND
EE1-2	162.16
EE1-3	308.17
R Ac	ND

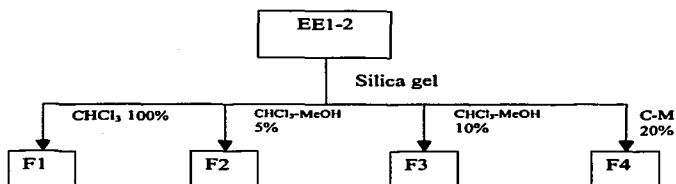
De esta tabla observamos que los extractos que mayor actividad presentaron a las concentraciones evaluadas son EE1-2 y EE1-3, siendo más activo el primero, por lo que en base a los antecedentes fitoquímicos de la planta que nos indican la presencia de flavonoides, y a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con EE1-2 por ser el más activo y en donde podríamos encontrar compuestos del tipo antes mencionado.

## 8.4. Fraccionamiento de EE1-2

EE1-2, que presentó la mayor actividad antioxidante, se trabajó de la forma que a continuación se describe y que se muestra en el esquema 8.2.

5 g del extracto de EE1-2 disueltos en AcOEt, se adsorbieron en aproximadamente 10 g de silica gel, para realizar una cromatografía en columna abierta con silica gel como adsorbente, para proceder a eluir como mezclas de  $CHCl_3$  y MeOH comenzando por  $CHCl_3$

100%, hasta MeOH 100 %. Se obtuvieron fracciones de 250 mL, las cuales se concentraron en un rotavapor a presión reducida. Se utilizó CCF de cada una de las fracciones reveladas con DPPH' para identificar la presencia de los compuestos antioxidantes y de esta manera seguir la evolución de la cromatografía, hasta obtener las fracciones con compuestos antioxidantes.

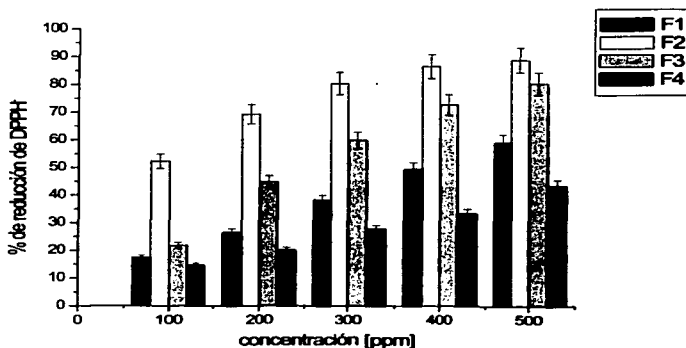


**Esquema 8.2** Esquema para el fraccionamiento del extracto EE1-2. C-M = CHCl<sub>3</sub>-MeOH.

Se obtuvieron las fracciones F1, F2, F3 y F4, utilizando identidad cromatográfica para agruparlas de la siguiente manera: de 1 - 14, corresponden a F1; de 15 - 38 a F2; de 39 - 62 a F3; de 63 - 94 a F4.

## 8.5. Determinación de la Actividad Antioxidante de las Fracciones de EE1-2.

El seguimiento de la cromatografía en columna se realizó con ayuda del ensayo autobiográfico en CCF siguiendo la metodología descrita, para seleccionar las fracciones que contenían compuestos antioxidantes. Los resultados de la cromatografía nos indican que la fracción que concentra los compuestos antioxidantes fue F2, sin descartar F3 que también presentó manchas de color amarillo intensas. Para saber con cual fracción se continuaría trabajando se recurrió a la prueba espectrofotométrica, dando los resultados que a continuación se representan en la gráfica 8.5.

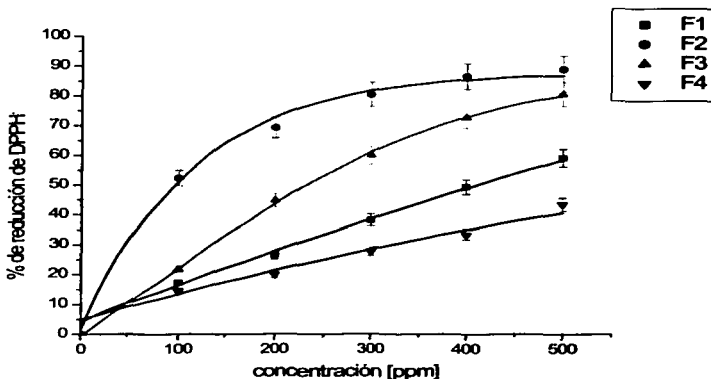


**Gráfica 8.5** Efecto de las diferentes fracciones de EE1-2 sobre la reducción de DPPH a diferentes concentraciones. Barras de error al 5 %.

Esta gráfica nos permite visualizar que efectivamente, la fracción que presentó mayor actividad frente al DPPH' fue F2, con la que se continuó trabajando con el fin de aislar los metabolitos secundarios antioxidantes presentes en ella.

La forma en que se presenta la curva de reducción del DPPH' nos permite ver que la reducción se lleva a cabo de una forma dosis-dependiente, por lo que asumimos que a mayor concentración de los metabolitos presentes en F2, existe una mayor cantidad de DPPH' reducido, y a pesar que el porcentaje de reducción no es total a 500 ppm, si se lleva a cabo de forma cuantitativa para asumir que existe una concentración adecuada de los metabolitos presentes en esa fracción.

A continuación se muestra la gráfica 8.6, la cual nos permite determinar la  $CA_{50\%}$  de las fracciones evaluadas.



**Gráfica 8.6** Efecto de las diferentes fracciones de EE1-2 sobre la reducción de DPPH'. Barras de error al 5%.

De esta gráfica podemos inferir que el efecto dosis dependiente que las diferentes fracciones tienen sobre la reducción del DPPH' es diferente para cada una, lo que se puede atribuir a la diferente naturaleza de los Metabolitos Secundarios presentes, sin que esto nos de algún indicio del tipo de moléculas que contengan. Se obtuvieron los valores de las CA<sub>50%</sub> para cada una de esas fracciones, mostrados en la tabla 8.4.

**Tabla 8.4** Valores obtenidos de la interpolación de la gráfica 8.6. ND = no determinado, puesto que el % de reducción del radical no fue mayor al 50 %.

	CA <sub>50%</sub> [ppm]
F1	412.44
F2	98.88
F3	234.14
F4	ND

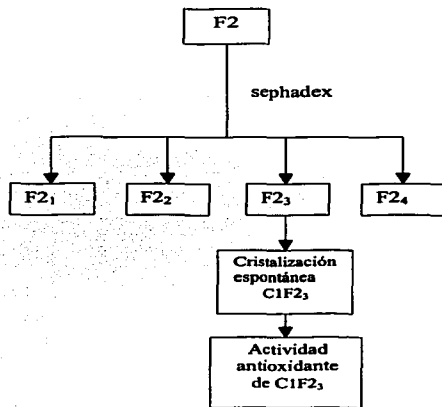
En esta tabla, se describen los valores de los CA<sub>50%</sub>. El obtenido para F2, es mucho menor que el de F3, lo cual nos permite seleccionar sin lugar a dudas a F2 para continuar con el estudio, por ser la más activa, y por tanto, en la que se pueden concentrar los metabolitos secundarios antioxidantes más activos.

## 8.6. Fraccionamiento de F2

La totalidad de F2 (0.739 g) se separó en una columna abierta, empacada con Sephadex como fase estacionaria, de 32.5 x 3.5 cm, y se eluyó con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1 v/v) a una velocidad de flujo de 1 mL / min, para obtener cuatro diferentes fracciones (F2<sub>1</sub> [1-189 mL], F2<sub>2</sub> [190-279 mL], F2<sub>3</sub> [280-420 mL] y F2<sub>4</sub> [421-630 mL]) según su identidad cromatográfica en capa fina, de los cuales todos poseían actividad antioxidante al ser revelados con DPPH' (esquema 8.3).

Así mismo, se observó que el menos complejo de las cuatro fracciones fue F2<sub>2</sub>. Además, precipitaron de forma espontánea, cristales amorfos de color amarillo a los cuales se les asignó la clave C1F2<sub>3</sub>. Resultó relevante para los fines que perseguíamos, el que

estos cristales presentarían actividad antioxidante. Se procedió a purificar este MS, para su posterior identificación.



**Esquema 8.3** Procedimiento para el aislamiento de C1F<sub>23</sub>.



## 8.7. Purificación e Identificación de C1F2<sub>3</sub>

Los cristales se separaron de las aguas madres para recrystalizarlos utilizando "par de disolventes" (*n*-hex-MeOH), para aislar 13 mg de cristales amorfos de color amarillo (rendimiento: 0.26%), los cuales no fundieron a 300 °C, por lo que no se pudo obtener su temperatura de fusión. Presentó un *R<sub>f</sub>* de 0.719 (AcOEt 100%). Se probaron tres diferentes sistemas de elución para determinar por cromatografía que el metabolito aislado se encontraba puro, puesto que en los tres sistemas solo presentó una mancha.

Al realizar un espectro de barrido en UV de 200-500 nm [(espectro UV-1, apéndice I), se confirma que es un flavonoide por presentar la forma característica de estos compuestos en esta técnica, además de presentar el desplazamiento característico de un flavonol en presencia de tres gotas de NaOMe (0.025 ml, sodio metálico en MeOH) mostrado en el espectro UV-2.

No fue necesario el empleo de otras técnicas para la determinación estructural de la molécula debido a que en la literatura están reportados los datos de muchos flavonoides, y al realizar una búsqueda exhaustiva se encontraron valores idénticos de temperatura de fusión, *R<sub>f</sub>*, espectro de UV y desplazamiento con NaOMe para el flavonol denominado trivialmente quercetina, y el metabolito aislado se comparó con una muestra auténtica, dando los mismos resultados (tabla 8.5).

**Tabla 8.5** Valores de las crestas obtenidas de la literatura para quercetina, en comparación con las obtenidas para C1F2<sub>3</sub> en MeOH.

	MeOH (reportado)	MeOH (experimental)	+ NaOMe (reportado)	+ NaOMe (experimental)
Crestas, nm	255	256.0 ± 0.05	247	247.0 ± 0.05
	269	270.0 ± 0.05	321	322.0 ± 0.05
	301	302.0 ± 0.05	-	-
	370	372.0 ± 0.05	-	-

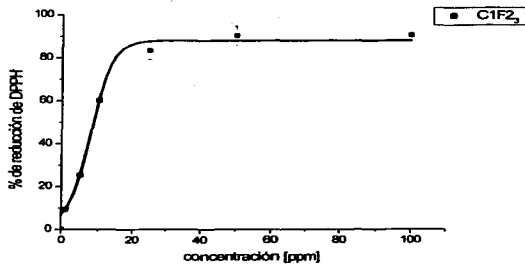
La zona en que se encuentra localizada la banda denominada I para los flavonoles, corresponde de 320 a 380 nm, señalando la literatura una sola y bien definida cresta, mientras que para la banda denominada II, la zona señalada es de 240 a 270, con la característica de separarse en una cresta muy definida y otra que no alcanza a desarrollarse, quedando como hombro, señales características de un flavonol 3',4' dihidroxilado.

El desplazamiento que sufrió la banda I al adicionarse NaOMe es indicativo de un patrón de oxidación 3,3',4' trihidroxilado libres, que en el caso de C1F2<sub>3</sub> son idénticos para el flavonol denominado quercetina .

Estos resultados también corroboran con los antecedentes fitoquímicos de la planta, ya que se reportó con anterioridad el aislamiento de quercetina de las partes aéreas de *M. geometrizans* como lo revisamos en el segundo numeral de este trabajo.

## **6.8. Actividad Antioxidante de C1F2<sub>3</sub>**

Se realizó el ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad antioxidante de C1F2<sub>3</sub> (quercetina), encontrando el mismo comportamiento que para la muestra auténtica. Los resultados se muestran en la gráfica 8.7, donde la reducción del DPPH<sup>•</sup> se comporta de manera dosis-dependiente con casi un cien por ciento de reducción del radical libre utilizado en el ensayo.



**gráfica 8.7** Representación gráfica de la actividad antioxidante de C1F2<sub>3</sub> medido a través de la reducción del radical DPPH<sup>•</sup>. Barras de error al 5 %.

La CA<sub>50%</sub> para este metabolito aislado fue de 8.76 ppm, que es menor que la mostrada por el control positivo utilizado en este ensayo, el  $\alpha$ -tocoferol que fue de 27.5 ppm.

Con estos resultados, estamos aislando, identificando y caracterizando la actividad antioxidante de un MS presente en *Myrtillocactus geometrizans*, aunque existen otros metabolitos que no se aislaron, y que representan una oportunidad de seguir trabajando esta planta.

## IX. Conclusiones

Se obtuvieron los extractos de *n*-hex y etanol (80%) de las partes aéreas de *M geometrizans*, planta perteneciente a las cactáceas llamada vulgarmente garambullo. Se verificó la existencia de metabolitos secundarios antioxidantes en dichos extractos, siendo mayor la actividad y concentración de estos en el extracto etanólico. Después de su estudio dirigido a través de la actividad antioxidante se obtuvo un compuesto puro, cristalino de color amarillo, con una  $CA_{50\%}$  de 8.6 ppm, que es menor que el  $\alpha$ -tocoferol (27.5 ppm) utilizado de referencia. Se identificó a este flavonoide como quercetina por sus datos del  $R_f$  en diferentes sistemas de elusión, espectro de barrido UV en MeOH y adicionando NaOMe, comparándolo con los datos de la literatura y con una muestra auténtica. De estos resultados podemos decir que se cumplieron los objetivos general y particulares planteados, pero resulta importante señalar que no es el único MS con actividad antioxidante en esta planta, por lo que se requiere mayor investigación en este sentido de las diferentes fracciones y sub-fracciones obtenidas.

Los datos obtenidos aportan evidencia suficiente para confirmar la hipótesis planteada, debido a que se aisló un MS de tipo polifenólico con potente actividad antioxidante. Sin embargo, se necesita profundizar más en el aislamiento, purificación y determinación estructural del resto de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de esta planta.

## **X. Perspectivas**

El estudio fitoquímico de esta planta constituye un buen acercamiento para la comprensión del uso tradicional que se le da a esta planta en algunas comunidades del centro de México. La presencia de quercetina y otros metabolitos explica de forma parcial la actividad antioxidante del extracto de etanol acuoso de las partes aéreas de *M. geometrizzans*, y así mismo, puede explicar en forma parcial, la actividad antiinflamatoria de los emplastes de la planta, por lo queda abierta la investigación futura en ese sentido.

Queda abierta la puerta para realizar la búsqueda de los MS responsables de la actividad antioxidante de las flores y de los frutos de esta planta, puesto que se conoce que de esas partes del garambullo, se han aislado betalainas y flavonoides, y podrían tener actividad antioxidante.

## XI. Bibliografía

- Achnine L., Bah M., Pereda-Miranda R., Mata R., y Lotina-Hennsen B. 1999. Tricolorin A, a potent natural non-protonophoric uncoupler and inhibitor of the  $Q_b$  redox enzyme on spinach chloroplasts. En: *Recent Advances in Allelopathy*. Vol. 1. A Science for the Future. Maclas F. A., Galindo J. C. G., Molinillo J. M. G., and Cutler H. G. (Eds). Servicio de Publicaciones, Universidad de Cádiz, International Allelopathy Society. Chapter 19.
- Alen Y., Nakajima S., Nitoda T., Baba N., Kansaki H., and Kawazu K. 2000. Two antinematodal phenolics from *Knema Hookeriana*, a sumatran rainforest plant. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55c, pp. 300-303.
- Alkofahi A., Rupprecht J. K., Anderson J. E., McLaughlin J. L., Mikolajczak K. L., and Scott B. A. 1989. *Search for New Pesticides from Higher Plants*. En: *Insecticides of Plant Origin*. Amason J. T., Philogene B. J. R., and Morand P. (Eds). American Chemical Society, Washington, DC, pp. 25-43.
- Anaya A. L., y Cruz-Ortega R. 2001. *La alelopatía: algunos estudios de caso y posibles aplicaciones*. En: *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. Anaya A. L., Espinosa-García F., y Cruz-Ortega R. (Eds). Instituto de Ecología, UNAM y Plaza y Valdés editores. 1ª edición, pp. 33-68.
- Andlauer W. and Fürst P. 2002. Nutraceuticas: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35: 2-3, pp. 171-176.
- Arias, S., Gamma S., Guzmán L. 1997. Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. Fascículo 14. Cactaceae A.L. Juss. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Asami S., Manabe H., Miyake J., Tsurudome Y., Hirano T., Yamaguchi R., Itoh H. and Kasai H. 1997. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 18: 1763-1766.
- Baker K., Marcus C.B., Huffman K., Kruk H., Malfroy B. and Doctrow S.R. 1998. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a

- delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther* 284, pp. 215-221.
- Benzie I.F.F., and Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 1, pp. 70-76.
- Blois M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, pp. 1199-1200.
- Bravo H. H. 1937. Las cactáceas en México. Universidad Nacional Autónoma de México México.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 11, pp. 317-333.
- Bruni R., Medici A., Guerrini A., Scalia S., Poli F., Romagnoli C., Muzzoli M., and Sacchetti G. 2002. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. *Food Chemistry*, 77:3, pp. 337-341.
- Burda S., and Oleszek W. 2001. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 2774-2779.
- Burret F., Lebreton P. and Voirin B. 1982. Les aglycones flavoniques de cactees: distribution, signification. *Journal of Natural Products*. 45: 6, pp. 687-693.
- Butera D., Tesoriere L., Di Gaudio F., Bongiorno A., Allegra M., Pintaudi A.M., Kohen R., and Levrea M.A. 2002. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 6895-6901.
- Céspedes C. L., Martínez-Vázquez M., Calderón J. S., Salazar J. R., and Aranda E. 2001. Insect growth regulatory activity of some extracts and compounds from *Parthenium argentatum* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Zeitschrift fur Naturforsch* 56c, 95-105.
- Céspedes C.L., Uchoa A., Salazar J.R., Perich F., and Pardo F. 2001. Plant Growth inhibitory activity of *p*-hidroxyacetophenones and tremetones from Chilean endemic *Baccharis* species and some analogous: a comparative study. *J Agric Food Chem*, 50, pp. 2283-2292.

- Cichewicz R. H., Nair M. G. 2002. Isolation and characterization of stelladerol, a new antioxidant naphthalene glycoside, and other antioxidant glycosides from edible daylily (*Heemerocallis*) flowers. *J Agric Food Chem*, 50:1, pp. 87-91.
- Cohen G. 1984. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5, pp. 77-82.
- Colomas J., and Bullard C. 1977. Behavior of a *M. geometrizans* (Mart) cons (T) stem tissue culture *in vitro* and betalain biosynthesis. *Bulletin de la Societe Botanique de France*. 124: 7-8, pp. 385-393.
- Colomas J., Barthe P., and Bulard C. 1978. Separation and characterization of betalainas synthesized by *M. geometrizans* stem tissues cultivated *in vitro*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*. 87: 4, pp. 341-346.
- Davies G.R., Simmonds N.J., Stevens T.R.J., Grandison A., Blake D.R. and Rampton D.S. 1992. Mucosal reactive oxygen metabolite production in duodenal ulcer disease. *Gut* 33, pp. 1467-1472.
- Dianzani M.U. 1985. Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. *Alcohol Alcohol* 20, pp. 161-173.
- Dixon R.A., and Steele C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids –a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4: 10, 394-400.
- Djerassi C., Burstein S., Estrada H., Lemin A.J., Lippman A.J., Manjares A., and Monsimer H.G. 1957. Terpenoids XXVIII. The triterpene composition of the genus *Myrtillocactus*. *Journal of the American Chemical Society*, 79, pp. 3525-3528.
- Domínguez X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa S.A., México D.F. México.
- Edmonds, 2000. Do antioxidants have a role in the therapy of human inflammatory diseases? In *Free Radicals and Inflammation*. Winyard P.G., Blake D.R., and Evans C.H. (Eds.). Birkhauser Boston, INC.
- Flores S.C., Marecki J.C., Harper K.P., Bose S.K., Nelson S.K. and McCord J.M. 1993. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, pp. 7632-7636.



- Fogliano V., Verde V., Randazzo G., and Ritieni A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3, pp. 1035-1040.
- Foley S., Navaratnam S., McGarvey D.J., Land E.J., Truscott T.G., and Rice-Evans C.A. 1999. Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 9-10, pp. 1202-1208.
- Ghisalberti E.L. 1993. Detection and isolation of bioactive natural products. Chapter 2, pp. 10-49. En: *Bioactive Natural Products: Detection, isolation, and structural determination*. Colegate S.M., and Molyneux R.J. (ed). CRC Press, INC Boca Raton, USA.
- Ghiselli A., Serafin M., Maiani G., Azzini E., and Ferro\_Luzzi A. 1995. A fluorescence -- based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, pp. 29-36.
- Gibson A. C. and Horak K.E. 1978. Systematic anatomy and Phylogeny of Mexican columnar cacti. *Ann. Missouri Bot. Gar.*, 65, 999-1097.
- Gil G., Ferreira dos Santos P., and Bullard C. 1995. Biotransformation of  $\Delta^2$ -carene by callus tissues. *Phytochemistry*, 38: 3, pp. 629-631.
- Grassmann J., Hippeli S., and Elstner E.F. 2002. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, pp. 471-478.
- Gutteridge J.M., and Wilkins S. 1982. Copper-dependent hydroxyl radical damage to ascorbic acid: formation of a thiobarbituric acid-reactive product. *FEBS Letters*, 137(2):327-30.
- Halliwell B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9: 1, pp. 1-32.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University, New York, USA, pp. 48-92.
- Harbone J.B., and Baxter H. 1999. En: *The Handbook of Natural Flavonoids*, Volume 1, John Willey & Sons, New York, USA, pp. vii-xiii.
- Harborne J.B., and Williams C.A. 2000. Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, pp. 481-504.

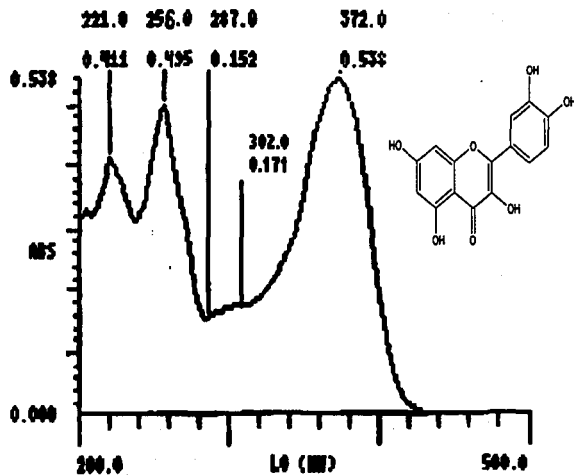
- Hernández-Luis F. 2001. El estrés oxidativo. Temas de Toxicología. Apuntes para la materia de Toxicología. Facultad de Química, UNAM, pp. 1-9.
- Hostettmann K. 1997. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. Invited lecture presented in the International Conference on Bioresources: Conservation and Utilization, 23-27 November, Phuket, Thailand. IUPAC. En: [www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/hostettmann.html](http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/hostettmann.html)
- Kanner J., Harel S., and Granit R. 2001. Betalains- A new class of dietary cationized antioxidants. *J Agri Food Chem.* 49, pp. 5178-5185.
- Kehrer J. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, pp. 43-50.
- Kerr S., Brosnan M.J., McIntyre M., Reid J.L., Dominiczak A.F., and Hamilton C.A. 1999. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 33, pp. 1353-1358.
- Kim D., Lee K.W., Lee H.J., and Lee C.Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*, 50, pp. 3713-3717.
- Kim M., Choi S., and Chung S. 2000. Antioxidative flavonoides from the garlic (*Allium sativum* L.) Shoot. *Food Science and Biotechnology*. 9: 4, pp. 199-203.
- Kohda H., Kasai R., Yamasaki K., Tanaka K. M., and Tanaka O. 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*, *Phytochemistry*, 15: 6, pp. 981-983
- Kubo I., Fujita K. 2001. Naturally occurring anti-Salmonella agents. *J. of Agric. Food Chem.* 49 (12), 5750-5754.
- Lacey E., Gill J. H., Power M. L., Rickards R. W., O'Shea M. G. and Rothschild J. M. 1995. Bafilolides, Potent Inhibitors of the Motility and Development of the Free-Living Stages of Parasitic Nematodes. *International Journal for Parasitology*, 25: 3, pp. 349-357
- Lyras L., Cairns N.J., Jenner A., Jenner P. and Halliwell B. 1997. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68, pp. 2061-2069.
- Mabry T.j., Markham K.R. and Thomas M.B. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, pp. 35-45 .

- Macías F. A., Molinillo J. M. G., Galindo J. C. G., Varela R. M., Torres A., and Simonet A. M. 1999. En: *Natural Products: Agrochemicals and Pharmaceuticals*. Cutler H.G. and Cutler S. (Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Mathiesen L., Malterud K.E., and Sund R.B. 1997. Hydrogen bond formation as a basis for radical scavenging activity: A structure-activity study of c-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radical Biology and Medicine*, 22: 1-2, pp. 307-311.
- McCord J. M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108 (8), pp. 652-659.
- McCord, J. M. 1974. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185, pp. 529-531.
- Meydani M. 1999. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mechanisms of ageing and development*. 111, pp. 123-132.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., and Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sciences*, 84, pp. 407-412.
- Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., and Rice-Evans C.A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 384, pp. 240-242.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 9, pp. 405-410.
- Mohan I. K. and Das U. N. 1997. Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 56, pp. 193-198. citado en McCord, 2000.
- Moncada S., Palmer R. M., and Higgs E. A. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43, pp. 109-142.
- Ng T.B., Liu F., and Wang Z.T. 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life sciences*, 66: 8, pp. 709-723.
- Noda Y.; Kaneyuki T.; Mori A.; Packer L. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin.; *J. Agric. Food Chem*; 50(1): 166-171.

- Omar B.A. and McCord J.M. 1991. Interstitial equilibration of superoxide dismutase correlates with its protective effect in the isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 23, pp. 149-159.
- Pietta P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 63, pp. 1035-1042.
- Peterson J., and Dwyer J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18: 12, pp. 1995-2018.
- Pérez R.M., Pérez S., and Pérez C. 1994. estructura del mucilago aislado del *Myrtillocactus geometrizans*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 38: 6, pp. 424-429.
- Popov I., and Lewin G. 1999. Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods in Enzymology*, 300, pp. 437-456.
- Putnam A. R. and Tang C. S. 1986. Allelopathy: State of the science. En: *The Science of Allelopathy*. Putnam A. R. and Tang C. S. (Eds). Wiley-Interscience Publications.
- Ragusa R.J., Chow C.K. and Porter J.D. 1997. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7, pp. 379-386.
- Ramachandra Rao S. and Ravishankar G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 2, pp. 101-153.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C.A. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, pp. 1231-1237.
- Reyes-Chilpa, R. Quiroz-Vazquez, R. I. Jimenez-Estrada, M. Navarro-Ocana, A. Cassani-Hernandez, 1997. Antifungal activity of selected plant secondary metabolites against *Coriolus versicolor*. *Journal of Tropical Forest Products*. 3: 1, 110-113.
- Reynoso R., García F. A., Morales D. and Gonzalez de Mejia E. 1997. Stability of betalain pigments from a Cactaceae fruit. *J Agric Food Chem*, 45, pp. 2884-2889.
- Rice E.L. 1984. Allelopathy. Academic Press, INC. Second edition. USA, Chapter 10 pp. 267.
- Rosen G.M., Britigan B.E., Halpern H.J., and Pou S. 1999. Free Radicals. Biology and Detection by Spin Trapping. Oxford University Press, Oxford, New York, USA. Chapter 3, pp. 83-109.

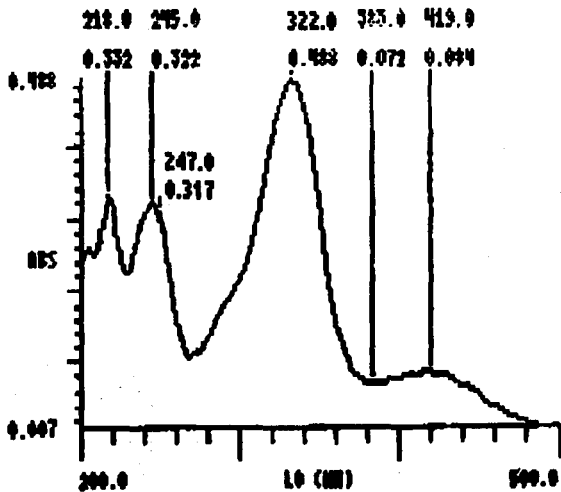
- Ross J.A., and Kasum C.M. 2002. Dietary flavonoides: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Reviews in Nutrition*, 22, pp. 19-34
- Schlesier K., Harwat M., BÖHM V., and Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36: 2, pp. 177-187.
- Shah S.V. 1995. The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu Rev Physiol* 57, pp. 245-262.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: introduction. En: Sies, H., Editor. *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, San Diego, CA, pp. XV-XXII.
- Tanaka O. 1982. Steviol-glycosides: New natural sweeteners, *Trends in Analytical Chemistry*, 1: 11, pp. 246-248.
- Toshniwal P. K. and Zarling E. J. 1992. Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochem Res* 17, pp. 205-207.
- Vaněk T., Nepovím A. and Valíček P. 2001. Determination of Stevioside in Plant Material and Fruit Teas, *Journal of Food Composition and Analysis*, 14: 4, pp. 383-388.
- Walling C. 1957. *Free Radicals in Solution*. John Willey and Sons, INC. USA. Pag. 163.
- Wallaert B., Aerts C., Gressier B., Gosset P. and Voisin C. 1993. Oxidative inactivation of alpha(1)-proteinase inhibitor by alveolar epithelial type II cells. *J Appl Physiol* 75, pp. 2376-2382.
- Wang Q.L., Lin M., and Liu G.T. 2001. Antioxidative activity of natural isorhapontigenin. *Japanese Journal of Pharmacology*. 87, pp. 61-66.
- Warren, K.R. Yabroff, D.M. Mandel, K.J. Johnson and Ward P.A. 1990. Role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in neutrophil recruitment into sites of dermal and pulmonary vasculitis. *Free Radical Biol Med* 8, pp. 163-172.

## **XII. Apéndice**



Espectro UV-1. Espectro UV de barrido de C1F2, en MeOH, de 200 a 500 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Espectro UV-2. Espectro de barrido de  $\text{ClF}_2_3$ , en MeOH posterior a la adición de NaOMe, de 200 a 500 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

64