



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis químico y actividad biológica de hojas de
Siparuna andina (Tul.) A. DC. (Monimiaceae)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
WENDY ROCIO JUÁREZ PÉREZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO
2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de Cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Juárez Pérez Wendy Rocío 53 96 98 20 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098091087</p>
<p>2. Datos del Tutor Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno</p>	<p>2. Datos del Tutor Dra Josefina Herrera Santoyo</p>
<p>3. Datos del Sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno</p>	<p>3. Datos del Sinodal 1 Dra Patricia Guevara Fefer</p>
<p>4. Datos del Sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno</p>	<p>4. Datos del Sinodal 2 Dr Víctor Manuel Chávez Ávila</p>
<p>5. Datos del Sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno</p>	<p>5. Datos del Sinodal 3 M en C Beatriz Zúñiga Ruiz</p>
<p>6. Datos del Sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno</p>	<p>6. Datos del Sinodal 4 M en C Octavio González Caballero</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Título Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito Análisis químico y actividad biológica de hojas de <i>Siparuna andina</i> (Tul.) A. DC. (Monimiaceae) 95 p 2010</p>

“La Tierra es una entidad viviente en evolución. Cada forma de vida en la Tierra es una parte importante de esta entidad viviente. En consecuencia, nosotros los miembros de la raza humana debemos de cultivar la consciencia de que somos parte de una comunidad global de vida y que todos compartimos una misión común y una responsabilidad por el futuro de nuestro planeta. Crearemos un mundo en el cual cada persona esté consciente de que somos capaces de vivir con las bendiciones de la naturaleza y de vivir en armonía con ella, mostrando gratitud y respeto por todo animal, planta y cualquier otra forma de vida.”

Mahatma Gandhi

Tan poética, tan mágica, tan enigmática, tan perfecta,
tan hermosa y tan viva:

A la naturaleza
Al Planeta Tierra

DEDICATORIA

A ti SEÑOR

A mis Padres:
Gustavo y Dolores

A mi hermano Gerardo, a Gaby
y a mis dos lucecitas Madai y Janai

A Oscar, mi hermano

A mis abuelitas: Carmen† y Dolores†,
mis ángeles de la guarda

A mi abuelito Amalio

A mis tías y tíos
A mis primas y primos

A ti Octavio

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a quien debo mi formación académica y un tanto personal, por permitirme seguir formando, con orgullo, parte de ella.

Agradezco a los integrantes del jurado por sus valiosos y acertados comentarios que enriquecieron esta investigación. Por ver las fallas que yo no pude ver, pero sobre todo, les agradezco mucho su apoyo, su tiempo y amable disposición:

Dra. Patricia Guevara Fefer
Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Dra. Josefina Herrera Santoyo
M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz
M. en C. Octavio González Caballero

Agradezco a la Dra. Cristina Pérez-Amador, a la Q. en A. Verónica Muñoz y a la Dra. Aida García, por todas sus enseñanzas. Por compartir conmigo una parte de sus conocimientos para formarme en la disciplina de la fitoquímica. Gracias por su disposición, siempre tan amable, de apoyarme. GRAZIE TANTE!!

Agradezco a la M. en C. María Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho por las facilidades brindadas en la parte farmacológica de este trabajo, muchas gracias por su tiempo pero sobre todo su amable disposición para aclarar mis dudas.

A la Lic. Georgina Ortega, Coordinadora de la Biblioteca del Instituto de Biología de la UNAM, le agradezco mucho la ayuda que me brindo en la búsqueda bibliográfica para enriquecer este trabajo.

Al M. en C. Álvaro Campos Villanueva por ser una extraordinaria guía en la localización y recolecta del material vegetal, muchas gracias por su amabilidad y por compartir sus conocimientos acerca de la especie.

Gracias a mis amigos del laboratorio de Fitoquímica: José, Enrique, Marce y Sandra, por los momentos y los viajes compartidos, por su apoyo académico y personal, por las risas, por los consejos y por ese carácter tan particular de cada uno de ustedes. Gracias por su amistad!!!

Beatriz, gracias por tu amabilidad y tu sonrisa siempre tan cálida que me hace sentir en confianza, gracias por compartir conmigo parte de tus experiencias y conocimientos en esta área, porque gracias a ti tomé este rumbo en mi vida, decisión del cual no me arrepiento y te aseguro que me ha fascinado, gracias Bety por ser una linda persona.

Paty, te agradezco el haber creído en mí desde el principio, jamás lo olvidare. Por tu tiempo, por los consejos y por las llamadas de atención que me hicieron retomar de nuevo el camino. Por iniciarme en este sueño y que hoy podemos culminarlo. Gracias por ser una excelente maestra, mentora y por compartir conmigo tus conocimientos. Por ser una gran persona, por tu apoyo, por tus risas, muchas gracias.

Josefina, te agradezco infinitamente el ser mi maestra, asesora y mentora, por compartir conmigo tus conocimientos y por formarme en esta disciplina. Gracias por enseñarme a quitarme el miedo de criticar mi propio trabajo, sin olvidar la confianza que hay en mi misma. Gracias por la gran y hermosa persona que eres, por tu tiempo, comprensión, paciencia, por tu apoyo, cariño y amistad; por guiarme en esta etapa final tan importante en mi vida y por culminarla juntas. Gracias por ayudarme a realizar uno de mis más grandes sueños. Jose fue un honor trabajar contigo.

Dr. Chávez, no es suficiente con decirle gracias por todo lo que ha hecho por mí, por siempre estar ahí. Por ser una de las pocas personas que tienen esa luz en el alma, esa calidez, que lo hacen ser único. Gracias, porque también se preocupa por todos los seres vivos del Planeta y porque lucha por conservar un Reino en particular. Gracias por sus enseñanzas, por sus consejos, por su confianza, por las risas en las comidas y por hacer el día más ameno, pero sobre todo, gracias, mil gracias por su sincera amistad. Es usted una persona muy admirable.

A mis amigos del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales: Claudia, Julio y el Sr. Fernando, por todos estos años de amistad, de apoyo. Por las innumerables risas, por los buenos y los malos momentos, por ser para mí personas admirables e inteligentes de una forma particular y única.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de CTV: Mabel, Isaac, Luis, Rosa, Mónica, Jesús, Iris, María Luisa, Mara, Minerva, Isabel, Vicente, Germán, Gerardo, Miguel, Neri, Roberto, Joaquín, Pablo, Paty, Maricela, Laura M., Laura V., Alejandra P., Alfonso, Mariana, Alejandra F., Mary H, por los momentos que hemos compartido y más aún, por los que hemos aprendido.

A Barbarita, por ser una linda y maravillosa persona, por tus sonrisas, por tu calidez. Gracias por todo el apoyo que me brindas, por los ánimos, por escucharme y por la paciencia infinita que tienes, por esa paz interior que puedo ver en ti y me tranquiliza. Por tu linda amistad, muchas gracias!!!

A la Dra. Estela Sandoval, por las sonrisas, por el apoyo y por ese positivismo que la caracteriza y me contagia. Muchas gracias.

A Guadalupe Castellanos (Lupita), por las carcajadas y tantas ocurrencias. Por ser una persona a la que agradezco mucho su sinceridad y esa forma directa de decir las cosas. Muchas gracias.

A Pau y Mari, por su apoyo académico y moral, por la amistad que se ha desarrollado durante este tiempo. Por entender, un poco, mi carácter, por la confianza que me han brindado y me permiten brindarles; y sin olvidar a su gran amiga Guadalupe, por tu espontaneidad para hacer reír, por ese valor único y la gran voluntad que hay en ti.

A mi amigo Marco Antonio, porque a pesar de la distancia seguimos siendo grandes amigos, muchas gracias por hacerme sentir mejor en mis depresiones y aún más en mis alegrías, gracias por ser mi confidente.

A Miguel Garduño (Mike), por esa amistad tan especial que se ha desarrollado durante tanto tiempo. Porque siempre escuchas todos mis conflictos internos y me ayudas a controlarlos. Gracias por tus consejos, por tu apoyo y por los ánimos. Gracias, también, a tu linda familia por las sonrisas y la calidez que tienen en el alma.

A Efro, por ser una de mis grandes amigas, gracias por hacerme ver que no hay imposibles. Gracias por el camino que recorrimos juntas, por escucharme, por las porras, y sobre todo por seguir siendo mi AMIGA!!!

A mis queridas amigas de toda la carrera y que aún lo siguen siendo: Paulina y Abigail, porque recorrimos juntas este camino desconocido y que sin su compañía hubiera sido para mí, mucho más difícil. Gracias por estar siempre ahí, he aprendido tanto de ambas. Paulina, gracias por no dejar que quite el dedo del renglón, eres una persona de la que admiro mucho su madurez, su inteligencia, su amabilidad, su elocuencia y sobretodo su Fe, por enseñarme que jamás hay que darse por vencida, amiga mía....lo logramos!!!!. Abi, gracias por toda tu ayuda, por tu risa contagiosa, por tu enorme inteligencia, por tu gran madurez y porque me ensañaste a ver siempre hacia adelante. Las extraño mucho....

A mis compañeros y amigos de la carrera: Nieves, Jorge, Iván, Oscar, Paula, Yislem, César, Miguel Angel, por su amistad, gracias.

A la mejor de mis mejores amigas, Alejandra, por enseñarme que la vida puede estar llena de bendiciones y sorpresas, por seguir adelante. Porque aún recorreremos este camino siendo amigas y aún nos queda mucho más por recorrer. Gracias por las agradables comidas, por las risas, por escucharme, por ser mi amiga... te quiero mucho. A Moni por su ternura.

A Rossana, Miriam, Isabel y Pablo porque aún seguimos estando juntos, gracias por el apoyo. Los quiero mucho.

Te agradezco infinitamente, SEÑOR, por escuchar mis plegarias, por darme la gracia de sentir tu presencia cada vez que la he necesitado. Gracias por la magia que creaste con tu amor, en cada ser vivo.

A mis Padres, Gustavo y Dolores, por toda una vida de esfuerzos y sacrificios, para hacer de mí una mejor persona, por los valores que me han inculcado. Gracias por su amor incondicional, por apoyarme en todo y creer en mí siempre. Espero algún día retribuirles de alguna forma, todo lo que me han dado, aunque no me lo pidan. Siento un enorme orgullo de ser su hija. Con infinito amor y agradecimiento. Esta tesis es suya.

A mi Mamá, por la extraordinaria mujer que eres, por esa linda, hermosa y preciosa persona que hay en ti y que aún no termino de conocer. Gracias por enseñarme a luchar ante cualquier circunstancia y seguir mis sueños, por quererme tanto y aguantarme aún más. Gracias porque me impulsas a seguir construyendo mi propio camino con el ejemplo que me das cada día. No te lo digo siempre pero....Te quiero y te adoro muchísimo....

A mi Papá, porque eres mi héroe, por ese gran valor que tienes, que espero haberlo heredado. Por tu creatividad para llevar a cabo muchas cosas y muchos planes y nunca darse por vencido. Papá, tu eres, junto con mi Mamá, los más grandes ejemplos de vida. Gracias por consentirme, por quererme tanto, por aguantar mi mal humor. Gracias por todos los principios que me has dado, porque sé que mi alma, se parece más a la tuya. Te quiero y te adoro...padre mío.

A mi hermano Gerardo, estoy orgullosa de ti porque eres el pilar de una hermosa familia que me da esperanza de que, tal vez, algún día, yo pueda formar parte de algo tan importante. Por enseñarme ese valor, heredado, de enfrentar el mundo, pero que aún no puedo encontrar en mí. Te quiero mucho. Gracias por tener ese corazón tan noble y sé que en el fondo crees en mí. A Gaby, gracias por ser parte de la familia. A mis sobrinas, Madai y Janai, por ser las lucecitas que iluminan y le dan esperanza a mi vida, las adoro.

A mi hermano Oscar, porque tienes esa forma de ser tan diferente que me hace estar orgullosa de ti, admiro esa inteligencia que tienes y la forma tan directa que tienes de decir las cosas. Porque las críticas que me has hecho no siempre fueron constructivas, pero me hicieron creer más en mí. Gracias por ayudarme cada vez que lo necesité. Gracias porque últimamente te has interesado un poco en mi mundo, la biología, por cualquier motivo que tengas, así has visto cosas que nunca habías imaginado. Te quiero.


A la memoria de mis queridas abuelitas que siempre están en mi corazón: Carmen† y Dolores†. Por ser mis ángeles de la guarda, porque fueron dos mujeres con una extraordinaria fuerza de vida, como ustedes siempre luchare. Las extraño siempre.

A mi abuelito Amalio, porque siempre que llego a casa me recibes con una cálida sonrisa que hace que lo malo del día se me olvide. Gracias por tu paciencia y tu ayuda. Gracias por enseñarme, a que en esta vida, hay que seguir adelante y a aprender a vivir con el dolor. Te quiero mucho Abue.

A mis tías y tíos, por su cariño, porque son parte importante en mi vida. A mis primas y primos, de cada uno de ustedes he aprendido tantas cosas de la vida, gracias por ser mis amigos en los cuales puedo confiar siempre y porque sé que siempre están ahí. Los quiero con todo mi corazón a todos y cada uno de ustedes.

A ti Octavio, porque has recorrido junto a mí este camino, desde antes que comenzara esta etapa en mi vida, y con cada paso que damos crecemos juntos. Por todo lo que he aprendido a tu lado y por lo que me has enseñado, creer en mí misma y quitarme el miedo de decir lo que pienso, ya sea lo correcto o no. Gracias por ser mi pilar, por ser un ejemplo de constancia y dedicación. Por tu gran amor y paciencia, por tu confianza y tu fe. Por consentirme, por aguantarme, por amarme!!! Gracias por ser mi amigo, mi persona, por estar en mi vida y ser lo mejor de ella.

A Mí, por cada sacrificio que hice. Porque estoy exactamente donde se supone que debo estar. Por la persona que me he convertido y la madurez que he adquirido, debido a todo el esfuerzo desde mis inicios en la vida y en la educación.

A todas aquellas pequeñas Vidas que dejan su huellita  en mi corazón, por su ternura, por su nobleza, por su lealtad, por estar a mi lado siempre. Por darle consuelo, paz y alegría a mi existencia.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	5
A. Metabolitos secundarios	5
Terpenos	6
Alcaloides o compuestos nitrogenados	7
Compuestos fenólicos	8
Flavonoides	10
Glucósidos	11
B. Análisis fitoquímico	11
C. Ensayos biológicos	13
Actividad Citotóxica	14
Actividad antiinflamatoria	15
Actividad antioxidante	15
D. Características y Distribución del Género <i>Siparuna</i> Aublet.	17
Distribución geográfica del Género	17
Usos medicinales del Género <i>Siparuna</i> Aublet.	18
Estudios químicos del Género	19
Actividad biológica reportada para especies del Género	20
E. Características y Distribución de <i>Siparuna andina</i> (Tul.) A. DC.	23
Clasificación taxonómica	23
Distribución geográfica de la especie	23
Sinonimias de <i>Siparuna andina</i>	25
Usos medicinales de la especie	26
Estudios químicos reportados para la especie	26
Actividad biológica reportada para <i>Siparuna andina</i>	27
II. JUSTIFICACIÓN	29
III. OBJETIVOS	30
A. Objetivo general	30
B. Objetivos particulares	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
A. Recolecta del material vegetal	32
B. Obtención de extractos	32
C. Análisis de los extractos	32
Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios	32
Perfil cromatográfico de los extractos crudos	33
Actividad biológica	33
1. EXTRACTO HEXÁNICO	35
Separación por cromatografía en columna	35
Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios	36
Análisis cromatográfico comparativo	36
Actividad biológica de fracciones y cristales obtenidos	36

2. EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	38
Fraccionamiento del extracto	38
Perfil cromatográfico de las fracciones	38
Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios	39
Actividad biológica	39
3. EXTRACTO METANÓLICO	41
Fraccionamiento del extracto	41
Perfil cromatográfico de las fracciones	41
Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios	42
Actividad biológica	42
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
A. Material biológico	43
B. Rendimiento de los extractos	43
C. Análisis de los extractos	44
Detección de grupos de metabolitos secundarios	44
Separación de los extractos por cromatografía en capa fina	46
Actividad biológica	47
Actividad antiinflamatoria	47
Actividad citotóxica en <i>Artemia salina</i> L.	48
1. EXTRACTO HEXÁNICO	49
Separación por cromatografía en columna	49
Detección de grupos de metabolitos secundarios	52
Actividad biológica de fracciones	53
2. EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	56
Fraccionamiento del extracto	56
Perfil cromatográfico de las fracciones	56
Detección de grupos de metabolitos secundarios	58
Actividad biológica	58
3. EXTRACTO METANÓLICO	60
Fraccionamiento del extracto	60
Perfil cromatográfico de las fracciones	61
Detección de grupos de metabolitos secundarios	62
Actividad biológica	62
CONCLUSIONES	66
SUGERENCIAS	69
BIBLIOGRAFÍA	70
APÉNDICES	78
Apéndice 1	78
Apéndice 2	79

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ABTS	Ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenztiazolina)-6-sulfónico
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CG	Cromatografía de Gases
CG/EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CHS	Carbohidratos
CMI	Concentración Mínima Inhibidora
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXP	Vía de la 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EI	Espectrometría Infrarroja
EM	Espectrometría de Masas
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
Hex	Hexano
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration
MeOH	Metanol
ppm	partes por millón
R_f	Ratio of front (Factor de retención)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RPN	Revelador de Productos Naturales (2-Aminoetil difenilborato)
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetato
UV	Radiación Ultravioleta
VAM	Vía del Ácido Mevalónico

RESUMEN

Siparuna andina (Tul.) A. DC. es una especie utilizada para tratar diferentes tipos de padecimientos como los resfriados, la artritis reumatoide, diarrea, fiebre, golpes, dolor de cabeza y ha mostrado tener actividad antipalúdica. Se distribuye en zonas tropicales y subtropicales, desde México hasta América del Sur. Es conocida como “limoncillo” debido a su característico olor a limón. Faltan estudios que identifiquen los compuestos activos de la especie. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis químico y evaluar la actividad biológica de las hojas para proporcionar algún conocimiento científico que explique el uso medicinal de esta especie. A partir de hojas, se obtuvieron 3 extractos de diferente polaridad, en los cuales se detectó la presencia de flavonoides, terpenos-esteroides, y en el extracto metanólico, se observó, además, la presencia de glucósidos. Los 3 extractos presentaron actividad antiinflamatoria siendo mayor en el de acetato de etilo. La prueba de citotoxicidad en *Artemia salina* mostró que el extracto hexánico fue el más activo a 1000 ppm. Los perfiles cromatográficos mostraron la diferencia de compuestos entre los 3 extractos. Las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas de cada extracto, fueron sometidas a prueba de citotoxicidad en *Artemia salina*, de actividad antiinflamatoria (TPA) y de actividad antioxidante (DPPH). Las fracciones más activas para la actividad citotóxica fueron las del extracto metanólico. La mayor actividad antiinflamatoria se observó en las fracciones del extracto hexánico. Las fracciones que mostraron mayor actividad antioxidante fueron las del extracto metanólico. En base a estos resultados se evidenció de forma novedosa el potencial antioxidante, antiinflamatorio y citotóxico de esta especie, la cual podría ser de gran utilidad en la búsqueda de sustancias activas contra patologías causadas por radicales libres y/o procesos inflamatorios, así como en la destrucción de células cancerígenas. Por lo tanto, la necesidad de nuevos fármacos obtenidos de productos naturales hace interesante el estudio químico de esta especie medicinal.

INTRODUCCIÓN

México está considerado como el cuarto país con mayor diversidad vegetal a nivel mundial en términos de riqueza de especies, diversidad genética, tipos de vegetación y de germoplasma de plantas cultivadas (Soberón y Llorente, 1993). Debido a su situación geográfica, a su gran diversidad de climas y a lo accidentado de su topografía, alberga una flora que ha sido considerada de las más ricas y variadas del Planeta. Se calculan aproximadamente 30,000 especies de plantas superiores (Toledo, 1988) de las cuales aproximadamente 9,500 son endémicas (Huerta, 1997).

Se pueden reconocer hasta 10 tipos básicos de vegetación como los bosques y las selvas tropicales, que contienen una increíble diversidad de especies vegetales aún inexploradas, muchas únicas y potencialmente útiles como fuentes medicinales (Rzedowski, 1978; Bravo-Hollis, 1978). Las regiones tropicales son los ecosistemas más antiguos, más diversos y son las comunidades ecológicamente más complejas de la Tierra. Aunque ocupan solo el 7% de la superficie terrestre del Planeta, es probable que contengan más de la mitad de los seres vivos. Este tipo de ecosistema es considerado como la farmacopea de productos naturales, provee de servicios vitales al ecosistema y reduce el riesgo de inundaciones (Laurance, 1999).

Las especies vegetales poseen características de gran importancia para el hombre, entre éstas se pueden identificar propiedades por las cuales han sido utilizadas. Dichas propiedades han cambiado incluso el curso de la historia, y han repercutido en distintos aspectos de la vida del hombre (Herrera, 2001) constituyendo su alimento, vestido, casa, ornamentación, aspectos religiosos y el uso medicinal (Arnaz, 2002).

Durante las últimas décadas, ha surgido el interés por las plantas medicinales, en busca de sustancias con actividad farmacológica o de nuevas moléculas para el entendimiento de fenómenos fisiológicos y/o bioquímicos. El estudio químico de las plantas medicinales es una parte muy importante en esta nueva línea de investigación, cuyo objetivo es el aislamiento de los principios activos que puedan existir en la planta y que son responsables de las propiedades terapéuticas atribuidas a la misma (Harvey, 1999), tal es el caso de artemisinina (nombre comercial Artemotil®) un potente compuesto utilizado contra la malaria aislado de *Artemisia annua*, el paclitaxel (nombre comercial

Taxol[®]) es un agente anticancerígeno aislado de la corteza de *Taxus brevifolia*, galantamina (nombre comercial Reminyl[®]) compuesto natural aislado de *Galanthus woronowii* para tratar la enfermedad del Alzheimer, estos productos naturales han sido probados con éxito e introducidos al mercado comercial (Balunas y Kinghorn, 2005).

Los efectos terapéuticos de las plantas se encuentran asociados a compuestos químicos o metabolitos secundarios como los alcaloides, los flavonoides, los terpenoides, los compuestos fenólicos, glucósidos, polisacáridos y poliacetilenos (Lovkova *et al.*, 2001), los cuales se conocen también por jugar un papel importante en la adaptación de las plantas a su ambiente (Bourgaud *et al.*, 2001) como la atracción de polinizadores, la defensa contra depredadores y patógenos, entre otros aspectos ecológicos.

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades es una actividad común y tradicional en muchas partes del mundo. Hoy en día se estima que más de dos tercios de la población mundial basa su salud en compuestos derivados de plantas y junto con otros compuestos para tratar una amplia variedad de padecimientos (Taylor *et al.*, 2001).

Un rasgo característico de las plantas medicinales es su capacidad para ejercer un efecto en el organismo humano, de tal forma que el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas deberá ser constatado y validado para garantizar una terapia adecuada, eficaz y con la menor incidencia de ocasionar riesgos para el paciente (Maldonado, 2004).

No es sorprendente encontrar que en muchos países del mundo, como China, India, México y en varios países de África, exista un sistema bien establecido de medicina tradicional (Cordell, 1995). En México, muchos de estos remedios se encuentran documentados, tal es el caso del “cuaulote” (*Guazuma ulmifolia*), “pipitzahoac” (*Perezia adnata*), “cachani” (*Roldana sessilifolia*, *Psacalium* sp), “hierba anís” (*Tagetes lucida*), y están comercialmente disponibles como tinturas, pastillas o polvos, mientras que otros remedios están celosamente guardados por el curandero (Cordell, 1995; Linares y Bye, 1987; Villatoro, *et al.*, 2006).

Las plantas medicinales son el recurso terapéutico principal para muchos mexicanos. La flora medicinal del país es extensa y en las prácticas médicas populares se utilizan como remedio una amplia gama de variedades y especies botánicas, por ejemplo el “matarique” (*Psacalium decompositum*) que se utiliza para el reumatismo, resfriados y dolores de espalda; “bavisa” (*Cosmos pringlei*) utilizada para tratar la tos, trastornos gastrointestinales, entre otros. El conocimiento indígena representa una fuente capaz de proveer plantas que beneficien al sistema de atención a la salud, por ello resulta importante la valoración experimental de la flora medicinal mediante metodologías que impulsen alternativas confiables y útiles para la población (Aranda, 1996; Linares y Bye, 1987; Bye, 1986; Villatoro *et al.*, 2006;).

Aun cuando las plantas medicinales se han empleado desde hace siglos, no fue sino hasta principios del siglo XIX, cuando se tuvo la inquietud de estudiarlas con el objetivo primordial de aislar los principios activos responsables de sus propiedades terapéuticas (Pérez, 1994). De esta manera en la investigación en productos naturales, los especialistas se orientaron al aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de las plantas (Anónimo, 1995).

Para el estudio de las plantas medicinales es necesario una investigación interdisciplinaria completa e integrada, de forma que la etnobotánica indique el uso medicinal de la especie en la comunidad de recolecta (Pérez, 1994) y en el área fitoquímica se caractericen sus compuestos activos, los cuales son separados y sometidos a análisis estructurales detallados (Briskin, 2000). En las últimas décadas, la investigación fitoquímica ha identificado los principios activos mediante técnicas como la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (EM), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía de Gases (CG), etc. (Zuluaga, 2005). La investigación en la farmacognosia de plantas medicinales también se ha involucrado en ensayos de bioactividad, identificación de los potenciales modelos de acción y los sitios blancos para los compuestos fitoquímicos (Briskin, 2000). Faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma fehaciente los efectos fisiológicos de las plantas y los principios activos responsables porque al combinarse con otras sustancias pueden ser tóxicos o incluso el mismo compuesto puede ser tóxico al sobrepasar una cierta dosis o emplearse repetidamente (Beyra *et al.*, 2004).

Un ejemplo de lo anterior es *Siparuna andina*, la cual, en Veracruz, México, utilizan las hojas para tratar el reumatismo; en Oaxaca, las hojas son utilizadas para tratar los golpes, dolor de cabeza y fiebre (datos obtenidos de las fichas de los ejemplares depositados en el MEXU) y, junto con las flores, para tratar picaduras de insectos (Campos, com. per.); en Panamá, la infusión de las hojas trituradas se usa para tratar resfriados y reumatismo; en Guatemala, las hojas frescas se colocan en la frente para aliviar dolores de cabeza (Ciccio y Gómez-Laurito, 2002). En los trópicos se usa la infusión de las hojas y frutos como remedio contra la cefalea, diarrea y fiebre. También los extractos han evidenciado tener actividad antipalúdica (González, 2006).

La mayoría de estos padecimientos tienen un síntoma en común: la inflamación, por tal motivo, la finalidad de este estudio fue realizar el análisis químico con el fin de determinar qué metabolitos secundarios se encuentran presentes en esta especie y su relación con la actividad antiinflamatoria. La actividad antioxidante y la citotóxica en *Artemia salina* se realizaron buscando un posible uso potencial en diferentes padecimientos como el estrés oxidativo y el cáncer.

I. ANTECEDENTES

A. Metabolitos secundarios.

En los vegetales, el proceso de síntesis primario es la fotosíntesis y los productos iniciales son los carbohidratos, cuyas transformaciones dan origen a los procesos metabólicos primario y secundario (**Figura 1**) (Pérez-Amador y Romo de Vivar en Waizel, 2006).

Los metabolitos secundarios son compuestos con distribución restringida en los grupos taxonómicos. La síntesis específica de cada compuesto suele estar limitada a estados específicos del desarrollo de cada tipo de organismos, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Estos compuestos no son necesarios para el crecimiento de la célula u organismo, sin embargo juegan un papel importante en la interacción con su ambiente, asegurando la sobrevivencia del organismo en su ecosistema. Esta definición se basa en dos aspectos. En el primer aspecto, las plantas producen compuestos para protegerse de depredadores herbívoros, contra infecciones por microorganismos, o para la atracción de los insectos polinizadores a través del color y aroma (Nugroho y Verpoorte, 2002). El segundo aspecto es que estos compuestos químicos se presentan típicamente en sólo una especie o un grupo de plantas taxonómicamente relacionadas por lo que muchos de ellos se consideran marcadores taxonómicos de familias y géneros (García, 2004).

Los metabolitos secundarios se encuentran principalmente en las vacuolas, la periferia adyacente interna o el centro de los orgánulos citoplasmáticos además de que sus concentraciones se diferencian en las distintas partes de la planta. Intervienen de distintas maneras en la interacción del organismo con su ambiente como por ejemplo, en las relaciones de competencia con otras plantas, actuando como agentes alelopáticos (monoterpenos, fenoles, taninos) y contra invasiones de hongos, bacterias y virus (fenoles); en relaciones de mutualismo (flavonoides); en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas (flavonoides, carotenoides); en funciones defensivas causando toxicidad (alcaloides); como protección contra la radiación ultravioleta y la desecación (flavonoides) (García, 2004).

Atendiendo a las vías biosintéticas que les dan origen, los compuestos secundarios se dividen en tres grandes grupos (**Figura 1**): los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura (Valdés y Balbín, 2000).

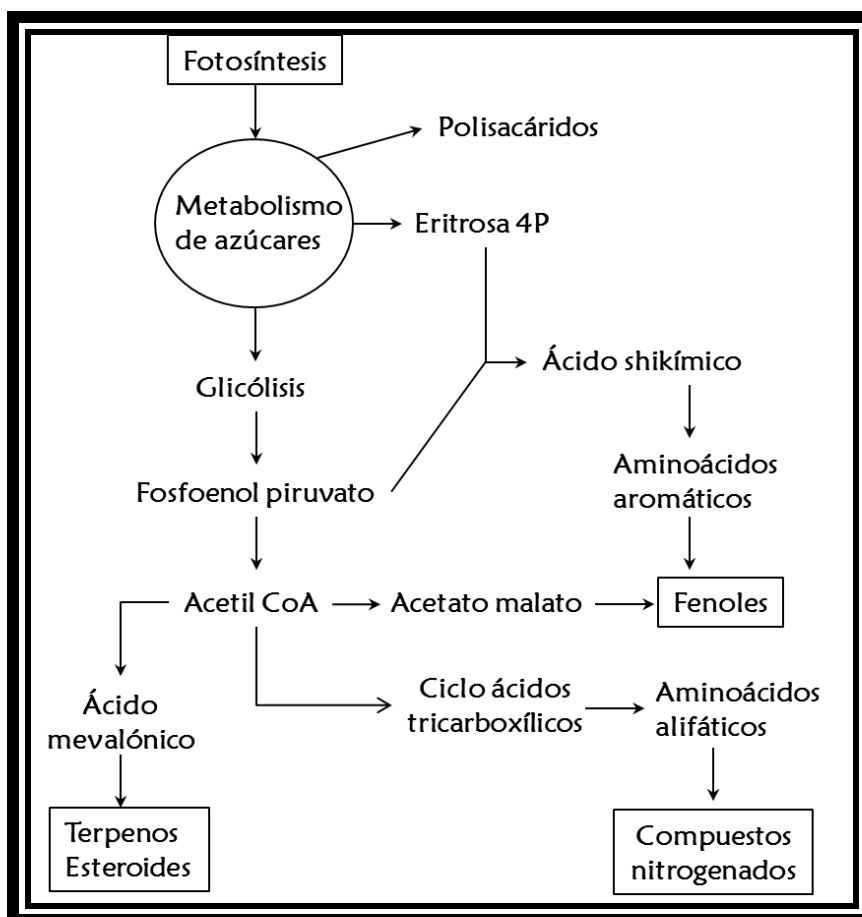


Fig. 1. Vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios y su relación con la fotosíntesis (Modificado de Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Terpenos

Son el grupo de productos naturales más numeroso y variado, cuenta con más de 30,000 compuestos. Se producen a partir de acetil-CoA por dos vías: 1) la vía del ácido mevalónico (MVA) o 2) la vía de la deoxixilulosa fosfato (DOXP) (Julsing *et al.*, 2006) y se divide de acuerdo al número de unidades de isopreno $(C_5H_8)_n$ que contenga su molécula (**Tabla 1**) (Pérez-Amador y Romo de Vivar en Waizel, 2006).

Tabla 1. Grupos, compuestos y algunos usos de los terpenos (modificado de Pérez-Amador y Romo de Vivar en Waizel, 2006).

Grupo	Compuesto	Usos
Hemiterpenos	Alcohol dimetilalítico, isoprenol, alcohol isoamílico	
Monoterpenos	Geraniol, mentol, timol	Dan aroma a flores, hojas, raíces y tallos
Sesquiterpenos ¹	Farnesol, artemisinina ^{1a} , zingibereno, ácido abscísico	Contra la malaria ^{1a}
Diterpenos	Paclitaxel ^{1b} , ácido giberélico ^{1c} , vitamina A ²	Para el tratamiento del cáncer de ovario y mama ^{1b} , regula procesos de crecimiento vegetal y germinación de las semillas ^{1c}
Sesterpenos	Lípidos insaponificables	
Triterpenos	Escualeno, faradiol, calenduladiol, esteroides, vitaminas ² , saponinas ^{2a}	(Efectos terapéuticos antirrítmicos, sedativos, analgésicos, antiinflamatorios, expectorantes, diuréticos, cardiotónicos) ^{2a}
Tetraterpenos	Carotenoides ^{1d} , xantofila.	(Colorante, anticancerígeno) ^{1d}
Politerpenos	Solanesol, espadicol	Hule

(Julsing *et al.*, 2006¹; Lovkova *et al.*, 2001²)

Nota: las letras idénticas significa el uso que se le da a ese compuesto.

Alcaloides o compuestos nitrogenados

Por definición, los alcaloides contienen nitrógeno, que suele ser derivado de los aminoácidos. Debido a la presencia de un átomo de nitrógeno, los alcaloides reaccionan de forma alcalina y la mayoría son capaces de formar sales solubles en medios acuosos. En plantas, sin embargo, pueden aparecer en estado libre, como una sal o como un N-óxido y son acumulados en la vacuola de la planta como reserva o a menudo junto a los ácidos fenólicos como el ácido clorogénico o el ácido cafeico. Los alcaloides pueden clasificarse en términos de su actividad biológica, su estructura química o, la más aceptada, de acuerdo a su ruta biosintética. En las plantas cerca de 12,000 alcaloides son conocidos y varios son usados en la medicina. Los alcaloides se dividen usualmente en cinco grandes grupos dependiendo del aminoácido de origen en la biosíntesis (Julsing *et al.*, 2006):

1. Derivados del tropano: la pirrolidina y la pirrolizidina (ornitina).
2. La benzilisoquinolina (tirosina).
3. La indolequinolina (triptófano).
4. La piridina (piridina).
5. La quinolizidina y la piperidina (lisina).

El consumo de algunos alcaloides forma parte de las costumbres de gran parte de la humanidad, como se muestra en la **tabla 2**.

Tabla 2. Ejemplos de algunos alcaloides y sus usos (Pérez-Amador y Romo de Vivar en Waizel, 2006; Julsing *et al.*, 2006).

Alcaloide	Uso
Cafeína	En café y té
Nicotina	En tabaco
Mescalina	Con fines ceremoniales
Quinina	Contra la malaria
Estricnina	Veneno que mata por parálisis respiratoria, tónico nervioso
Pirrolizidínicos	Tóxicos
Escopolamina	Tóxico
Morfina Codeína	Producen analgesia
Papaverina	Como relajante muscular
Berberina Sanguinarina	Como antimicrobiales

Compuestos fenólicos

Son compuestos orgánicos, abundantes en las plantas, que se encuentran en forma de ésteres o heterósidos, cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo. En general se originan principalmente de tres rutas biosintéticas (García, 2004):

- **La ruta del ácido shikímico:** participa en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores. Mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) conduce a los ácidos cinámicos y sus derivados.
- **La ruta del acetato-malato:** participa en la biosíntesis los compuestos fenólicos en la mayoría de los microorganismos (bacterias y hongos). Su precursor es el Acetil-CoA.
- **La ruta del ácido shikímico y del acetato-malato:** a partir de esta ruta se derivan los flavonoides, incluyendo a las flavononas, flavonas, flavonoles, catecoles, antocianinas, antraquinonas, etc.

En la **tabla 3** se muestra el ordenamiento de los compuestos fenólicos basado en el esqueleto carbonatado, así como algunos ejemplos y su uso.

Tabla 3. Ordenamiento de los fenoles basado en el esqueleto carbonatado (modificado de García, 2004).

Esqueleto carbonatado	Ejemplos	Usos
C ₆ C ₆ -C ₁	Fenoles simples y benzoquinonas ^a Ácidos fenólicos	Poder alergizante ^a Colerética, diuréticos, inmunoestimulantes
C ₆ -C ₂ C ₆ -C ₃	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides, cumarinas ^{1b} , isocumarinas y cromonas	(En algunas enfermedades de la piel, venotónicas) ^{1b}
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	Para la tos, antibacteriano y fungicida
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	Larvicida, insecticida
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos y antraquinonas ^c	Estreñimiento ^c
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides y isoflavonoides ^d	Provoca un efecto estrógeno ^d
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanós, neolignanós, ácido rosmarínico ^{2e}	(Contra cólicos, colerético, diurético y antioxidante) ^{2e}
(C ₆ -C ₃) _n (C ₆) ₆ , (C ₆ -C ₃ - C ₆) _n	Lignanós ^f , melaninas de catecol y flavolanós	(Para trastornos digestivos, como antibiótico, antitumoral) ^f

(Carretero, 2000^{1b}; Pérez-Amador y Romo de Vivar en Waizel, 2006^{2e})

Flavonoides

Dentro de los compuestos fenólicos, existen polifenoles de bajo peso molecular que proceden de la ruta del ácido shikímico y del acetato-malato. Este es el caso de los flavonoides, son, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, desde musgos hasta angiospermas (Schijlen *et al.*, 2004), se localizan en la savia vacuolar de las células (Agostini *et al.*, 2004), son abundantes en las flores, hojas y frutos.

Se caracterizan por la presencia de dos anillos de benceno que están unidos por un puente de tres átomos de carbono (para formar chalconas) o por un anillo de pirano. Dependiendo de la posición y la modificación de los anillos, los más de 6,000 flavonoides descubiertos hasta ahora pueden ser clasificados en varias clases como flavononas, isoflavonas, flavonas, flavonoles, flavanoles y antocianinas (Taylor y Grotewold, 2006). Aunque la función más visible de los flavonoides es la formación de los pigmentos (antocianinas) rojo y morado, los flavonoides que no forman pigmentos también juegan un papel importante en la biología de las plantas, sirviendo como señales para los polinizadores y otros organismos benéficos, participando en la planta como señaladores hormonales, actuando como moléculas señales en la interacción de planta-microbio, para la fertilidad y germinación del polen, protegiendo a la planta de los rayos UV, funcionan como fitoalexinas y compuestos alelopáticos (Taylor y Grotewold, 2006; Schijlen *et al.*, 2004).

Estudios sobre los derivados de los flavonoides muestran una amplia gama de acción biológica como antibacteriales, antivirales, anti-inflamatorios, actividad antialérgica y funciones de protección en enfermedades del corazón, cáncer y diferentes patologías (Montoro *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2007). La propiedad antioxidante de los flavonoides fue el primer mecanismo de acción estudiado, en particular con respecto a su efecto protector contra enfermedades cardiovasculares. Estos compuestos han mostrado ser altamente efectivos en atrapar muchos tipos de moléculas oxidantes, incluyendo oxígeno y radicales libres que están probablemente involucrados en varias enfermedades. El mecanismo de acción antioxidante puede incluir la supresión en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), ya sea por inhibición de enzimas o por oligoelementos quelantes que participan en la producción de radicales libres hasta la regulación y protección de las defensas antioxidantes (Montoro *et al.*, 2005).

Glucósidos

Son un grupo heterogéneo, resultan de la unión del carbonilo de un azúcar con el oxhidrilo de diferentes alcoholes pudiendo tener diversos núcleos aromáticos, anillos flavónicos, anillos fenólicos o bencénicos, aldehídos, ácidos, etc. Muchas plantas almacenan los productos químicos importantes en forma de glucósidos inactivos; si estos productos químicos son necesarios, se hidrolizan en presencia de agua y una enzima (hidrólisis ácida), generando azúcares importantes en el metabolismo de la planta. Por la hidrólisis, los glucósidos dan un glúcido el cual se conoce como glicona y un grupo ajeno al glúcido, la aglicona o genina. La mayoría son β -glucósidos (Sánchez, 1945).

Ejemplos de algunos glucósidos farmacológicamente activos abarcan desde los compuestos fenólicos simples, como la salicina; hasta los flavonoides, como la rutina; antraquinonas, los sennosidos; glucosidos cardiacos, la digoxina; y saponinas, como los ginsenósidos (Williamson *et al.*, 1996). En cambio, algunos de ellos como los glucósidos flavónicos, dan coloración amarillenta a diversas corolas y frutos, pudiendo ocurrir asociaciones con antocianos o antocianinas y otros pigmentos (Sánchez, 1945).

Desde el punto de vista químico, los principales glucósidos vegetales pueden clasificarse, dependiendo de la estructura de la glicona y de la aglicona, siendo esta última, la más importante y útil en bioquímica y farmacología, en glucósidos cianogénicos, glucósidos fenólicos simples, glucósidos cardiacos, glucósidos cumarínicos, saponinas, por mencionar algunos (Sánchez, 1945).

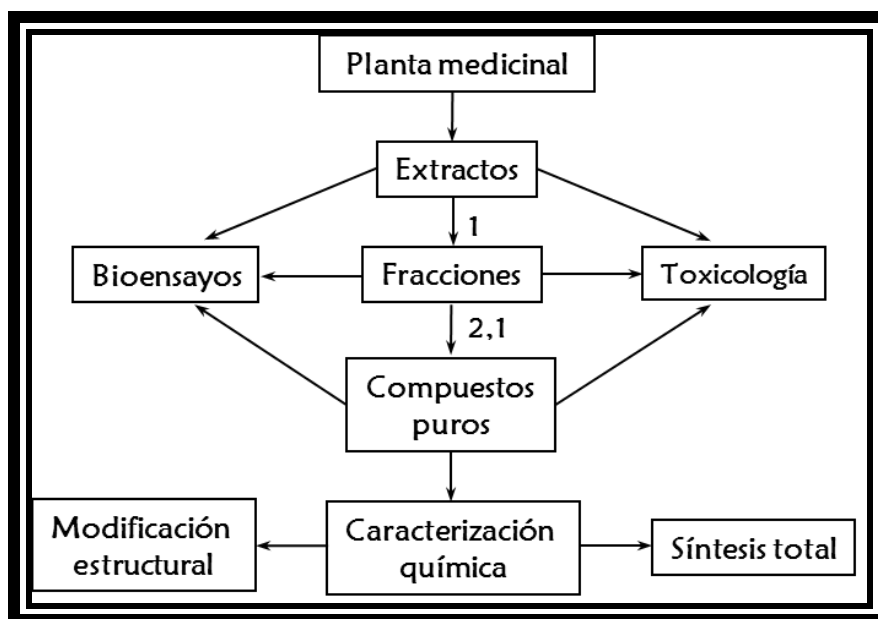
B. Análisis fitoquímico.

Con el fin de validar de manera científica las propiedades atribuidas a las plantas medicinales, se recomienda comenzar primero el análisis fitoquímico general o preliminar (Pérez-Amador y Romo de Vivar en Waizel, 2006).

Una vez que la planta es elegida, el siguiente paso es su recolecta e identificación botánica, y a continuación debe ser sometida a un proceso de secado a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Después de este proceso, el material vegetal debe ser sometido a procesos de extracción adecuados. Cuando la composición química es desconocida, el procedimiento de extracción se puede basar en cómo la planta se

utiliza en la medicina tradicional, o se pueden realizar varias extracciones con disolventes de polaridad creciente (Williamson *et al.*, 1996).

Para tratar de aislar el o los principios activos responsables de la actividad, los extractos vegetales son analizados cualitativamente por cromatografía en capa fina (CCF) y/o mediante otros métodos cromatográficos y se lleva a cabo una evaluación general de las actividades biológicas. Para la purificación y el aislamiento, el extracto vegetal activo es secuencialmente fraccionado, cada fracción y/o compuesto puro es sometido a bioensayos y evaluaciones de toxicidad en animales (**Figura 2**). Después de verificar la pureza del compuesto activo, la estructura se determina por métodos como la espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría infrarroja (EI), espectroscopia ultravioleta (UV) y cristalografía de rayos X. Después de completar todos estos pasos, el aislamiento a gran escala o la síntesis total o parcial es requerida para la evaluación farmacológica en los ensayos pre-clínicos, clínicos y toxicológicos para destinar un uso terapéutico en el futuro (Rates, 2001).



1. Proceso de fraccionamiento; 2. Purificación

Fig. 2. Método para la obtención de sustancias activas en plantas medicinales (Modificado de Rates, 2001).

Para alcanzar un sentido y significado en el análisis fitoquímico, la investigación de la actividad biológica de compuestos naturales completa la búsqueda y el aislamiento de nuevos compuestos de origen vegetal, sin embargo, la elección de un bioensayo debe hacerse de manera cuidadosa con base en la información que se desee obtener (Cole, 1994).

C. Ensayos biológicos.

Los ensayos biológicos pueden ser realizados usando microorganismos, moluscos, insectos, sistemas celulares (enzimas, receptores, etc.), cultivos celulares (animales y humanos), y organismos aislados o *in vivo* (mamíferos, anfibios, aves, etc.) (Rates, 2001), en donde se provoca una respuesta específica. Las pruebas deben ser simples, reproducibles y rápidas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Bioensayos utilizados para el estudio fitoquímico (Hamburger y Hostettmann, 1991).

Actividad	Organismo en el que se realiza el ensayo
Actividad antibacterial.	Bacterias patógenas para los humanos y plantas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia sp.</i>).
Actividad antifúngica.	Hongos y levaduras patógenas para los humanos y plantas (<i>Candida sp</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i>).
Toxicidad en <i>Artemia</i> .	<i>Artemia salina</i> L.
Inhibición tumoral de agalla de la corona (ensayo en disco de papa).	En células de los tubérculos de papa transformadas por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Actividad antimitótica.	<i>Micrasterias denticulata</i> (alga verde), huevo de erizo de mar (<i>Strongylocentrotus sp.</i> , etc.).
Actividad antialimentaria en insectos.	<i>Spodoptera sp.</i> , <i>Epilachna varivestis</i> (escarabajo de frijol mexicano).
Actividad larvícida.	<i>Aedes aegypti</i> (fiebre amarilla).
Actividad molusquícida.	<i>Biomphalaria glabrata</i> (esquistosomiasis).

Otra forma de proceder es decidir sobre un conjunto de modelos (**Tabla 5**) para alguna enfermedad determinada; por ejemplo, el cáncer, la inflamación, hipertensión, niveles bajos de colesterol, daño oxidativo, etc., y probar los extractos para una posible utilidad terapéutica en el tratamiento de la enfermedad (Williamson *et al.*, 1996).

Tabla 5. Bioensayos realizados en algunas plantas medicinales.

Planta medicinal	Bioactividad	Referencia
<i>Tetradenia riparia</i> (Hochst) Codd.	Antibacterial, antifúngica, citotóxica.	Pieters y Vlietinck, 2005
<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> (Lindl.) Schlechter	Antibacterial, antifúngica, antiparasítico.	Pieters y Vlietinck, 2005
<i>Uvaria narum</i> Wall.	Pesticida, insecticida, citotóxica.	Pieters y Vlietinck, 2005
<i>Zizyphus spina-christi</i> L.	Antiviral, antioxidante	Pieters y Vlietinck, 2005
<i>Bridelia ferruginea</i> Benth.	Antioxidante	Pieters y Vlietinck, 2005
<i>Ugni molinae</i> Turcz.	Antiinflamatoria	Aguirre <i>et al.</i> , 2003
<i>Bidens reptans</i>	Actividad antioxidante	Vásquez <i>et al.</i> , 2007
<i>Phyllonoma laticuspis</i>	Actividad antiinflamatoria	Vega, 2002

Actividad citotóxica.

Los procedimientos actuales para detectar agentes anticancerígenos incluyen ensayos de citotoxicidad con cultivos celulares. Sin embargo, una serie de bioensayos simples se han desarrollado; tal es el caso de *Artemia salina* L. (Artemiidae) que se ha propuesto como un sustituto por su bajo costo (Hamburger y Hostettmann, 1991). De esta forma, puede ser usado en el laboratorio con el fin de determinar la citotoxicidad a través de la estimación de la concentración letal media (valores LC₅₀) (Lagarto Parra *et al.*, 2001), como se ha realizado en compuestos naturales activos como la cafeína (306 LC₅₀), la podofilotoxina (2.4 LC₅₀), entre otros (Meyer *et al.*, 1982). El ensayo se basa en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a dosis altas y que la letalidad, en un organismo simple, podría ser utilizada como medio de control (Hamburger y Hostettmann, 1991). *A. salina* es un indicador biológico de la toxicidad en sustancias químicas, pesticidas, micotoxinas, contaminantes, anestésicos, toxinas de dinoflagelados y toxicidad de aceites dispersantes (Lopes *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 1982).

Actividad antiinflamatoria.

La inflamación es un proceso defensivo, protector y localizador causado por diversos factores, como lesiones por golpes, microorganismos como bacterias, virus o parásitos, que actúan generalmente por sus toxinas y los agentes irritantes. Como todo mecanismo de defensa puede dispararse e ir más allá y transformarse en un proceso perjudicial que es necesario frenar, esto se logra con los antiinflamatorios capaces de inhibirla (Williamson *et al.*, 1996; Vane *et al.*, 1998 en Vega, 2002).

Los compuestos con actividad antiinflamatoria, provenientes de plantas medicinales de uso tradicional, deben someterse a pruebas con animales o modelos bioquímicos. Los extractos y los compuestos purificados se pueden aplicar a métodos experimentales por medio de promotores de la inflamación para obtener información biológica (Taylor *et al.*, 2001).

Entre los diferentes métodos experimentales que permiten un mayor entendimiento sobre el proceso inflamatorio se encuentra el modelo del TPA (12-O -tetradecanoylphorbol 13 -acetato), un agente promotor de tumores ampliamente usado como agente de inflamación cutáneo en experimentos con animales (Rao *et al.*, 1993 en Vega, 2002).

La práctica del modelo del TPA en oreja de ratón es ampliamente usado ya que además de su fácil realización, se obtienen resultados eficaces y casi inmediatos, se practica para conocer la actividad antiinflamatoria que presentan los productos de origen natural, este diseño puede proveer alternativas para los agentes comunes terapéuticos o puede ser usado para establecer los mecanismos de control del proceso inflamatorio a nivel celular y molecular (Payá *et al.*, 1996).

Actividad antioxidante.

La producción excesiva de radicales libres y el desequilibrio en los mecanismos de la protección antioxidante resulta en el inicio de numerosas enfermedades (Luximon-Ramma *et al.*, 2002) como la aterosclerosis, isquemia cardiaca y cerebral, desórdenes neurodegenerativos, carcinogénesis, diabetes, desórdenes reumáticos y aceleran el envejecimiento (Ślusarczyk *et al.*, 2009).

Los radicales libres (moléculas activas dotadas de un electrón desapareado) se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Venereo, 2002).

Los antioxidantes son sustancias que detienen o previenen una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical libre. Nuestro organismo posee antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para protegerse de estos radicales, sin embargo, otra fuente muy importante de ellos son las plantas (Pietta, 2000).

La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de éstos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como los ensayos de ABTS (ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), entre otros (Mosquera *et al.*, 2005).

El DPPH es un ensayo que se utiliza ampliamente para proporcionar información básica sobre la capacidad antioxidante de extractos de plantas, alimentos o compuestos individuales, ya que este método ha demostrado ser rápido y sencillo (Shi *et al.*, 2009). Consiste en la medición a 515 nm de la reducción del radical libre estable 1-1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (que sea capaz de capturar un radical libre) u otro radical (cediendo un átomo de hidrógeno) (Silva *et al.*, 2002). La actividad se expresa como concentración efectiva 50 (IC₅₀) que es la concentración de la muestra requerida para disminuir la absorbancia del radical en un 50% comparado con una solución blanco (Paniagua-Pérez *et al.*, 2006).

D. Características y Distribución del Género *Siparuna* Aublet.

La Familia Monimiaceae comprende 34 géneros y cerca de 440 especies que se encuentran en las zonas más cálidas del hemisferio sur (Philipson, 1993), principalmente en regiones tropicales y subtropicales de Polinesia, Australia, Madagascar, África Tropical y América (**Figura 3**) (Heywood, 1985). Dos géneros, *Siparuna* y *Mollinedia*, se destacan por su complejidad y número de especies; *Siparuna* con 150 y *Mollinedia* con 94 (Leitão et al., 1999).



Fig. 3. Principales regiones en las que se distribuyen las especies de la Familia Monimiaceae.

Distribución geográfica del Género.

Se encuentra ampliamente distribuido a través de toda América, desde México a Perú, Bolivia y Brasil. De todas las especies de este género, *S. guianenses* tiene una amplia área de distribución, la cual es bastante común en Brasil y también se ha encontrado en Bolivia, Perú, Colombia, Venezuela, Guyana y Trinidad. Tres especies presentan una distribución discontinua (América Central-Perú, México-Colombia y Colombia-Bolivia). Todas las demás especies de este gran género parecen tener áreas limitadas de distribución (Heilborn, 1931).

Usos medicinales del Género *Siparuna* Aublet.

En los trópicos se usa la infusión de las hojas y frutos como remedio contra la cefalea, diarrea, gastralgia y afecciones psicosomáticas. También los extractos de *Siparuna* han evidenciado tener actividad antipalúdica. En las Guayanas utilizan la decocción de la corteza de *S. cuspidata* contra la malaria, y le confieren propiedades alexitéricas, antihelmínticas y antipiréticas. Las hojas y la corteza macerada la emplean como fungicida. A la infusión de las hojas le atribuyen propiedades abortivas, estimulantes, hipoglucemiantes, hipotensoras y vulnerarias; la administran en casos de afta, cefalea y la recomiendan como reconstituyente a las mujeres después del parto (González, 2006).

Las hojas de *S. apiosyce* se usan para tratar desórdenes gastrointestinales y respiratorias (dispepsia, flatulencia, tos, bronquitis, laringitis), también tiene un uso tópico en contusiones y heridas (Fischer *et al.*, 1999); esta misma especie es utilizada para enfermedades de la piel, fiebre, dolor de cabeza y reumatismo, así como en la curación de mordeduras de serpientes (Leitão *et al.*, 1999).

Los indios de la tribu Amazónica “Jammadi” usan las hojas de *S. guianensis*, preparadas en té, para dolores reumáticos (Leitão *et al.*, 1999); de la misma forma, las hojas y los frutos de esta especie se utilizan contra dispepsia y dolores estomacales (Machado *et al.*, 1998). López y colaboradores (1993) mencionan que algunas especies de este género también son utilizadas para curar varias infecciones; tal es el caso de *S. pauciflora*, la decocción de las hojas es usada por ciertos indios en Panamá contra la fiebre (Jenett-Siems *et al.*, 2003).

Los extractos de varias especies de este género se han utilizado contra la esterilidad femenina, mientras que algunas son conocidas por ser venenosas para el ganado (López *et al.*, 1988).

Estudios químicos del Género.

Los componentes de los aceites esenciales del género *Siparuna*, son una mezcla de terpenos y fenilpropanoides. Los aceites obtenidos de las hojas de *S. guianensis* contienen un derivado oxidado de β -elemeno-curzerenona, como un mayor constituyente, y el fenilpropanoide miristicina y eugenol metileter en cantidades significativas; otros compuestos obtenidos por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) en esta misma especie fueron epi- α -bisabolol, espatulenol, selin-11-en-4 α -ol, β -eudesmol, elemol, germacrona, germacreno D, biciclogermacreno, germacreno B y atractilona, ácido decanoico y 2-undecanona. El aceite de los frutos consiste principalmente de 2-undecanona, β -pineno y limoneno (Leitão *et al.*, 1999; Zoghbi *et al.*, 1998; Antonio *et al.*, 1984; Fischer *et al.*, 2005).

Se encontró que *S. dresslerana* contenía alcaloides del tipo morfinedienona O-metilflavinantina y flavinantina; en cambio, las trazas de alcaloides obtenidos del extracto de las hojas de *S. patelliformis* no fueron suficientes para su caracterización (Gerard *et al.*, 1986).

Estudios de los extractos crudos de hojas y ramas de la planta medicinal ecuatoriana *S. macrotepala*, revelaron la presencia de sesquiterpenos del grupo candinano: cadaleno, calameneno, 7-hidroxi-calameneno (**Tabla 6**), y dos nuevos compuestos: 1-hidroxi-calameneno y 1-6-dimetiltetrahidronaftalenona-4 (El-Seedi *et al.*, 1994).

El aceite esencial, obtenido de las hojas de *S. guianensis* recolectadas en diferentes meses del año, (E)-nerolidol fue el mayor componente del aceite de *S. guianensis*, recolectada en junio durante la floración. Una gran variación en el contenido de nerolidol se observó en los diferentes meses en los que se recolectó la planta (Machado *et al.*, 1998).

El sitosterol se encontró en *S. apiosyce* (en las hojas) y *S. arianae* en los receptáculos del fruto. Las aporfinas forman un gran grupo de alcaloides aislados del género *Siparuna*, así como el alcaloide liriodenina (oxoaporfina) tienen una marcada presencia en este género. La presencia de este alcaloide en las hojas de *S. apiosyce* puede ser responsable del uso medicinal contra la tos. El primer reporte sobre el

aislamiento de flavonoides en el género *Siparuna* se hizo para *S. apiosyce*, que al purificar el extracto metanólico, se aisló el flavonol 3,7,4'-tri-O-metilkaempferol presente en todos los órganos de la planta (siendo más abundante en las hojas). Adicionalmente, la tilirosida y otros flavonoides glucosilados (derivados del rhamnosil) fueron aislados de las hojas de esta misma especie (Leitão *et al.*, 1999).

Más tarde, estudios realizados por Leitão y colaboradores (2000) en hojas de *S. apiosyce*, determinaron la presencia de un nuevo compuesto, el cual fue caracterizado como kaempferol-3,7-di-O-metil-4'-O-β-[α-rhamnosil (1→6)]-glucopiranosido, brevemente nombrado siparunosido. Es interesante notar que todos los flavonoides aislados de esta especie, hasta el momento, muestran el mismo patrón de sustitución, es decir, un 3,5,7,4'-tetraoxigenado, por lo que muestran ser derivados del camferol.

Estudios fitoquímicos del género *Siparuna* revelaron la presencia de los alcaloides aporfina, oxoaporfina y morfinanedienona (**Tabla 7**) (Ciccio y Gómez-Laurito, 2002).

Los análisis de una fracción cruda de las hojas de *S. pauciflora* mostraron la presencia de las aporfinas *nor*-boldina, boldina, laurotetanina y *N*-metil-laurotetanina. El extracto lipofílico reveló la presencia de tres compuestos (Sipaucina A, Sipaucina B y Sipaucina C), siendo estos compuestos los primeros sesquiterpenos obtenidos de esta especie (Jenett-Siems *et al.*, 2003).

Actividad biológica reportada para especies del Género.

Jenett-Siems y colaboradores (2003) evaluaron la actividad antiplasmodial de los compuestos aislados de los extractos de las hojas de *S. pauciflora* contra dos cepas de *Plasmodium falciparum* (PoW, Dd2), mostrando que el compuesto *nor*-boldina posee una actividad moderada [valores de IC₅₀: 3.1 µg/ml (PoW), 5.4 µg/ml (Dd2)], mientras que las otras aporfinas así como los sesquiterpenos mostraron ser inactivos.

Tabla 6. Terpenos aislados de algunas especies del género *Siparuna*.

Especie	Parte de la planta	Terpeno	Referencias
<i>S. thecaphora</i> ¹	frutos	β -elemeno, citral, β -ionona	Manjarrez y Mendoza, 1967
<i>S. guianensis</i>	Frutos y hojas	β -elemeno, citral, β -ionona, nonanol, octan-3-ol, carvona, curzerenona, curzereno, miristicina, δ -elemeno, germacrona	Antonio <i>et al.</i> , 1984
<i>S. erythrocarpa</i>	madera	safrol	Antonio <i>et al.</i> , 1984
<i>S. macrotepala</i>	hojas y ramas	Cadeleno, calameneno, espatulenol	El-Seedi <i>et al.</i> , 1994
<i>S. arianeae</i>	frutos	Sitosterol, estigmasterol	Kato-Simas <i>et al.</i> , 1996
<i>S. guianensis</i>	hojas	α -pineno, canfeno, β -pineno, espatulenol, terpinoleno, linalool, α -terpineol, β -gurjunen, germacreno D, β -cariofileno, valenceno, zingibereno	Machado <i>et al.</i> , 1998
<i>S. guianensis</i>	partes aéreas	germacreno B, atractilona, mirceno, safrole, β -eudesmol, elemol, limoneno, isogermacrona, dilapiole, undecanol, germacreno A, valenceno, β -selineno	Zoghbi <i>et al.</i> , 1998
<i>S. thecaphora</i> ¹	hojas	α -copaeno, δ -cadineno, espatulenol, α -pineno, α -cubebeno, limoneno, α -cadinol, β -elemeno, linalool, germacreno D, geraniol	Vila <i>et al.</i> , 2002
<i>S. thecaphora</i> ¹	hojas	α -fenqueno, canfeno, sabineno, mirceno, γ -terpineno, terpinoleno, allo-ocimeno, pinocarvona, pulegona, α -muuroleno, cubebol, sabineno, mirtental	Ciccio y Gómez-Laurito, 2002
<i>S. pauciflora</i>	hojas	sipaucina A, sipaucina B, sipaucina C	Jenett-Siems <i>et al.</i> , 2003
<i>S. guianensis</i>	hojas y frutos	Bergamotenal, siparunona, ácido decanoico, 2-undecanona, sabineno, (E)- β -ocimeno, 2-nonanona	Fischer <i>et al.</i> , 2005

¹sinonimias de *Siparuna andina*

Tabla 7. Alcaloides aislados de algunas especies del género *Siparuna*.

Especie	Parte de la planta	Alcaloide	Referencia
<i>S. guianensis</i>	madera	Liriodenina, casamedina	Braz-Filho <i>et al.</i> , 1976
<i>S. gilgiana</i> ¹	raíces	Liriodenina, oxonantenina	Chiu <i>et al.</i> , 1982
<i>S. nicaraguensis</i> ¹	ramas	liriodenina	Gerard <i>et al.</i> , 1986
<i>S. patelliformis</i>	hojas	Los alcaloides estaban en cantidades insuficientes para su caracterización.	Gerard <i>et al.</i> , 1986
<i>S. dresslerana</i>	hojas	O-metilflavinantina, flavinantina	Gerard <i>et al.</i> , 1986
<i>S. pauciflora</i>	tallos	Nantenina, N-metillaurotetanina	López <i>et al.</i> , 1988
<i>S. tonduziana</i>	corteza de tallo y madera	Nantenina, anonaina, N-metillaurotetanina, norantenina, liriodenina	López <i>et al.</i> , 1990
	raíces	oxonantenina, asimilobina, laurotetanina, reticulina	
<i>S. griseo-flavescens</i>	tallos	Isocoridina, asimilobina, N-metillaurotetanina, nantenina	López <i>et al.</i> , 1993
<i>S. arianeae</i>	fruto	Liriodenina, nantenina, N-metillaurotetanina	Kato-Simas <i>et al.</i> , 1996
<i>S. apiosyce</i>	hojas, madera y corteza	liriodenina	Valverde-Soares <i>et al.</i> , 1997
	hojas	reticulina	
	madera y corteza	N- metillaurotetanina, asimilobina	Fischer <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pauciflora</i>	partes aéreas hojas	nor-boldina, boldina, laurotetanina	Jenett-Siems <i>et al.</i> , 2003

¹ sinonimias de *S. andina*

E. Características y Distribución de *Siparuna andina* (Tul.) A. DC.

Clasificación taxonómica (Cronquist, 1981).

Dominio	Eukarya
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Espermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Lauranae
Orden	Lurales
Familia	Monimiaceae
Género	<i>Siparuna</i> Aublet.
Especie	<i>S. andina</i> (Tul.) A. DC.

Distribución geográfica de la especie.

En México, se distribuye en los estados de Nayarit, Colima, Jalisco, probablemente Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, San Luis Potosí, Veracruz y Tabasco. En América del Sur, se distribuye en Colombia, Ecuador, Perú, Belice, Bolivia, Brasil, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Venezuela y el sur de Panamá (**Figura 4**) (Lorence, 1983; Datos proporcionados por the Herbarium of the Smithsonian Tropical Research Institute).

Como puede esperarse de una especie de amplia distribución, a menudo, *Siparuna andina* (**Figura 5**) es colectada bajo el nombre de *S. nicaraguensis*, debido a su forma, lo variable de la hoja (**Figura 6**) y el grado de pubescencia. Sin embargo, se distingue de otras especies mexicanas por sus hojas con márgenes subenteros o escasamente dentados, los dientes obtusos o a menudo reducidos, y su escasa a moderada pubescencia, tricomas estrellados (Lorence, 1983).



Fig. 4. Distribución geográfica de *S. andina*.

Fig. 5. Hojas e inflorescencias de *Siparuna andina* (Tul.) A. DC. (W. Juárez, MEXU)



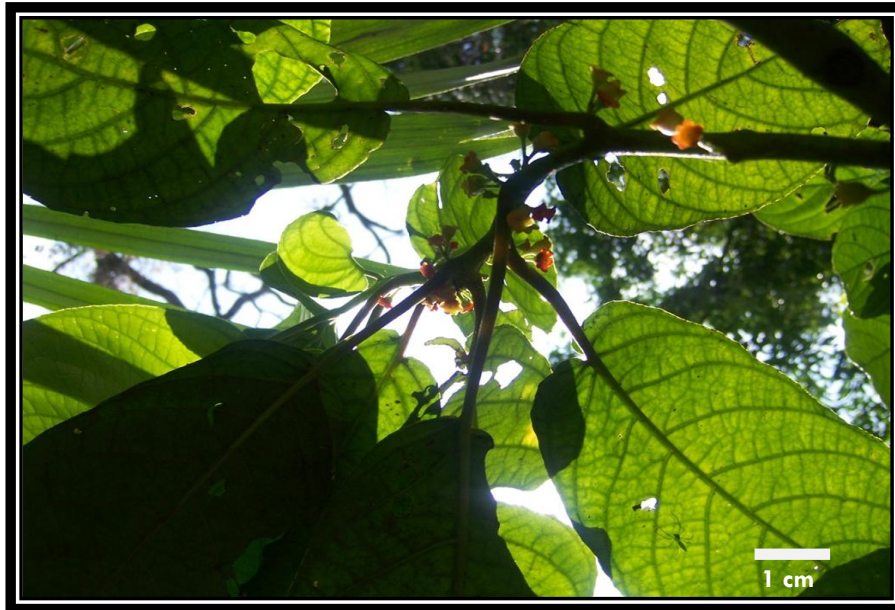


Fig. 6. Hojas e inflorescencia de *S. andina* (Juárez)

Sinonimias de *S. andina*.

Debido a su morfología inconstante, se han encontrado en la literatura un gran número de sinonimias:

- *Citriosma andina* Tul., Ann. Sci. Nat. 4(3): 36. 1855; Tul., Monogr. Monim.: 338. 1855 (Lorence, 1983).
- *Siparuna nicaraguensis* Hemsl., Biol. Centr. Amer. Bot. 3(14): 69. 1882 (Lorence, 1983; Vila *et al.*, 2002; Ciccio y Gómez-Laurito, 2002; The Herbarium of the Smithsonian Tropical Research Institute).
- *Siparuna davillifolia* Perk., Bot. Jahrb. Syst. 28: 681. 1901; Perk. & Gilg, Pflanzenr. 4(101): 92. 1901; Perk., Pflanzenr. 4(101), Nachtr.: 50. 1911 (Lorence, 1983).
- *Siparuna colimensis* Perk., Bot. Jahrb. Syst. 28: 682. 1901; Perk & Gilg, Pflanzenr. 4(101): 92. 1901 (Lorence, 1983).
- *Siparuna thecaphora* (Poepp. & Endl.) A. DC., Prodr. 16(2.2): 657. 1868 (González, 2006; The Herbarium of the Smithsonian Tropical Research Institute).
- *Siparuna macra* Standl., Publ. Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser. 22(2): 75. 1940 (González, 2006).
- *Siparuna gilgiana* Perkins (Ciccio y Gómez-Laurito, 2002).

- *Siparuna diandra* J.A. Duke (Datos proporcionados por the Herbarium of the Smithsonian Tropical Research Institute).
- *Siparuna riparia* (Tul.) A. DC., Prodr. 16(2): 647. 1868 (Datos proporcionados por the Herbarium of the Smithsonian Tropical Research Institute).

Usos medicinales de la especie.

Siparuna andina (bajo el sinónimo de *S. thecaphora*) es llamada coloquialmente “limoncillo” (pequeño limón) probablemente porque sus frutos presentan un fuerte olor a limón (Ciccio y Gómez-Laurito, 2002). En Panamá la decocción de las hojas (bajo el sinónimo de *S. thecaphora*), se utilizan para el tratamiento de los resfriados y para la artritis reumatoide. En Guatemala se usa para el catarro y la gripe (Vila *et al.*, 2002); las hojas frescas se colocan en la frente para aliviar dolores de cabeza (Ciccio y Gómez-Laurito, 2002).

En México, en Hidalgotitlan (Veracruz), la utilizan para el reumatismo; en Cuautitlán (Jalisco), los frutos y las hojas tienen uso medicinal; en Cerro Laguna (Oaxaca), utilizan las hojas para los golpes, dolor de cabeza y fiebre (datos obtenidos de las fichas de los ejemplares depositados en el MEXU).

Estudios químicos reportados para la especie.

En estudios de la composición química del aceite esencial de las hojas de *S. thecaphora* (sinónimo de *S. andina*), se identificaron 76 compuestos, los sesquiterpenos representan el 56.7% y los monoterpenos el 38.7% (Tabla 6) (Ciccio y Gómez-Laurito, 2002; Vila *et al.*, 2002). Dentro de los compuestos minoritarios, treinta y uno se describen por primera vez como constituyentes de este género. Bajo el sinónimo de *S. nicaraguensis* (sinónimo de *S. andina*), se estudiaron los aceites volátiles de los frutos de *S. thecaphora* siendo los componentes principales β -elemeno, citral y β -ionona (Ciccio y Gómez-Laurito, 2002).

De un extracto lipofílico de las hojas de *Siparuna andina*, dos nuevos compuestos han sido aislados: sipandinolido (sesquiterpeno), compuesto con un nuevo tipo de estructura carbonada y (-)-cis-3-acetoxi-4',5,7-trihidroxi-flavona (Jenett-Siems *et al.*, 2000).

Los alcaloides lirioidenina y oxonantenina, fueron aislados de las raíces de *S. thecaphora* (bajo el sinónimo de *S. gilgiana*) (Chiu *et al.*, 1982). La lirioidenina se ha reportado en la literatura como un sedativo del sistema nervioso central (Leitão *et al.*, 1999). Más tarde, Gerard y colaboradores (1986), identificaron el alcaloide lirioidenina en el extracto de las ramas de *S. nicaraguensis* (sinónimo de *S. andina*); no se detectaron alcaloides en las hojas de esta especie.

Actividad biológica reportada para *S. andina*.

A partir de extractos lipofílicos e hidrofílicos de hojas y ramas de *S. andina*, *S. pauciflora* y *S. tonduziana*, Jenett-Siems y colaboradores (1999) evaluaron la actividad antiplasmodial *in vitro* contra dos cepas de *Plasmodium falciparum* (PoW y Dd2). Los efectos citotóxicos de los extractos activos fueron analizados. Los extractos lipofílicos de las tres especies, mostraron una actividad antiplasmodial con valores IC_{50} que van desde 3.0 $\mu\text{g/ml}$ a 18.3 $\mu\text{g/ml}$, detectándose la actividad más alta en extractos de *S. andina* con un IC_{50} de 3.0 $\mu\text{g/ml}$ y 3.9 $\mu\text{g/ml}$ para PoW y Dd2, respectivamente. Los extractos activos fueron moderadamente citotóxicos con valores IC_{50} que están entre 17.9 y 26.3 $\mu\text{g/ml}$, aunque en algunas líneas celulares se observó una baja citotoxicidad ($IC_{50}>30$ $\mu\text{g/ml}$) (**Tabla 8**). Los extractos hidrofílicos no mostraron actividad en ninguno de los sistemas probados.

Tabla 8. Citotoxicidad de los extractos activos contra diferentes líneas celulares (Jenett-Siems *et al.*, 1999).

Especie	Valor Medio de IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
	KB	SK-MEL 30	A 549	MCF-7
<i>S. andina</i> (Tul.) A.D.C.	24.8	17.9	26.3	20.5
<i>S. pauciflora</i> (Beurl) A. DC.	>30	21.0	>30	20.3
<i>S. tonduziana</i> Perk	>30	23.2	>30	21.0

KB=carcinoma escamoso, SK-MEL 30=melanoma, A 549=cáncer de pulmón, MCF-7=cáncer de mama.

Vila y colaboradores (2002) evaluaron la actividad antimicrobial y la actividad larvicida de los aceites esenciales obtenidos de las hojas de *S. thecaphora* (sin. de *S. andina*). La actividad antimicrobial se ensayó contra seis microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando una fuerte actividad antibacterial contra *S. aureus* y *M. smegmatis* a concentraciones de 1000 µg/ml. La actividad larvicida se probó contra *Aedes aegypti*, pero en ninguno de los aceites presentó actividad.

De acuerdo a lo anterior, son pocos los estudios realizados en *Siparuna andina*, la mayoría de éstos, se han realizado bajo distintas sinonimias, principalmente en Centro y Sudamérica; ningún estudio acerca del análisis químico y/o biológico se ha reportado en México, aunque se le atribuyen usos medicinales en Oaxaca, Jalisco y Veracruz, principalmente. Por lo consiguiente, este es el primer estudio en el que se realizó, a partir de hojas, un análisis químico y se evaluó la actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica, actividades biológicas asociadas a distintos padecimientos.

II. JUSTIFICACIÓN

Siparuna andina ha sido estudiada bajo distintas sinonimias en países de Centroamérica (Costa Rica, Panamá, Nicaragua) y América del Sur (Colombia, Ecuador, entre otros), estos estudios se han enfocado a la búsqueda de compuestos químicos y en el estudio de diversas actividades biológicas (bactericida y antipalúdica).

Sin embargo, en nuestro país no se ha registrado, para esta especie, algún estudio químico o de actividad biológica que justifique su uso en la medicina tradicional. Las hojas de esta especie son utilizadas para padecimientos como el reumatismo, picaduras de insectos, dolor de cabeza y golpes, estos padecimientos presentan la inflamación como síntoma común.

La finalidad de este estudio fue realizar el análisis químico preliminar de los extractos y las fracciones para determinar los metabolitos secundarios presentes en esta especie y su relación con la actividad antiinflamatoria (mediante el modelo de TPA en oreja de ratón). La actividad antioxidante (prueba de DPPH) se realizó buscando un posible uso potencial en diferentes padecimientos, en los cuales el estrés oxidativo es la primera respuesta celular. La actividad citotóxica se llevó a cabo en *Artemia salina*, con la intención de buscar un uso potencial contra células cancerígenas.

El análisis químico de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, abre la posibilidad de completar el estudio de los compuestos biológicamente activos, así como de aquellos que no han sido aislados y que puedan tener interés farmacológico.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo General

- * Realizar un estudio fitoquímico de las hojas de *S. andina* para conocer que grupos de metabolitos secundarios están presentes en los extractos orgánicos y su relación con la actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica de los mismos.

B. Objetivos Particulares

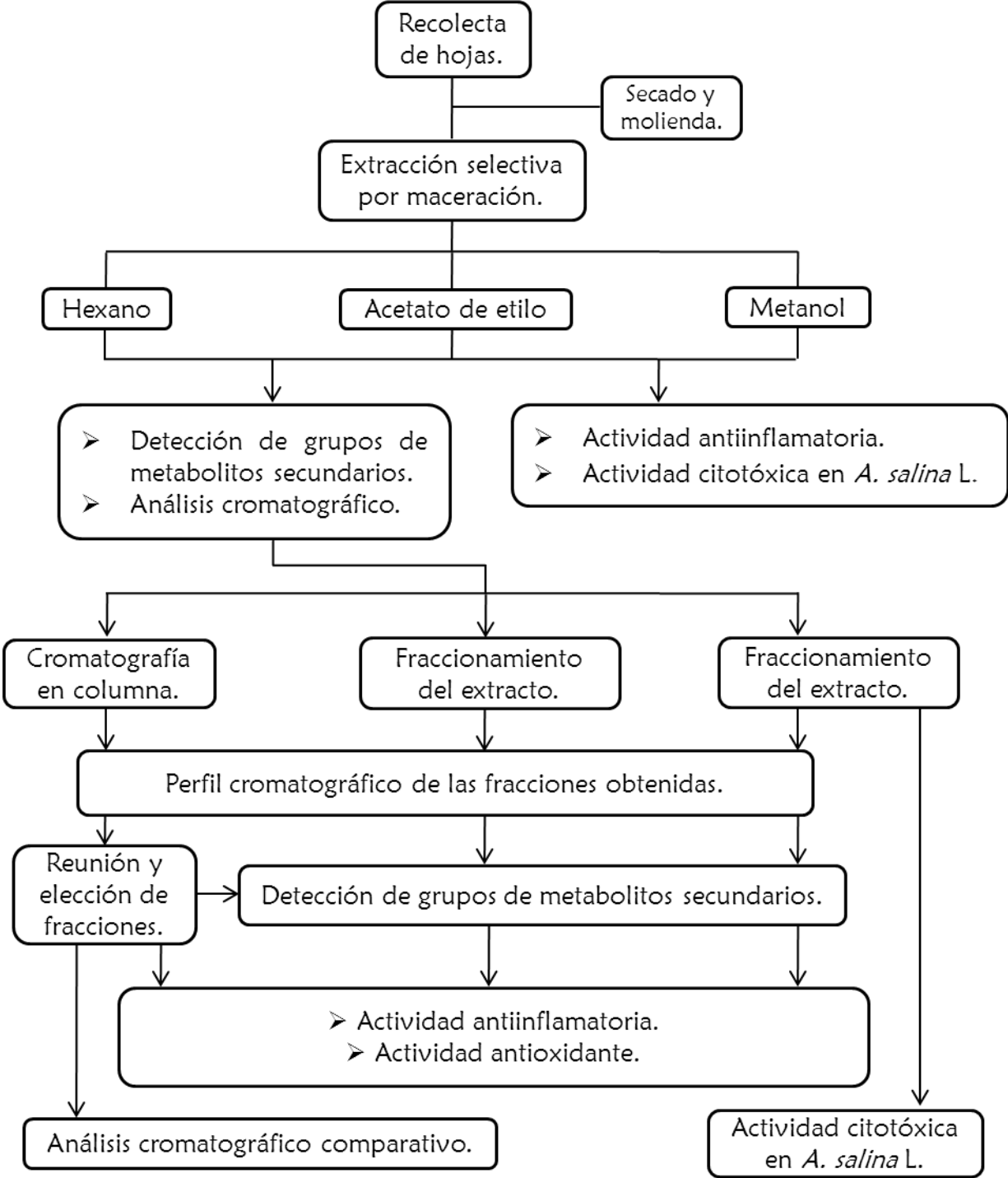
Fitoquímicos:

- * Obtener extractos de diferente polaridad.
- * Evidenciar los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto.
- * Determinar el perfil cromatográfico de cada extracto probando eluyentes de diferentes polaridades para analizar la distribución de los compuestos.
- * Fraccionar los extractos crudos por cromatografía en columna con la finalidad de separar compuestos.

Biológicos:

- * Evaluar, mediante ensayos biológicos, en los extractos crudos y en algunas fracciones:
 - La actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón,
 - La actividad antioxidante mediante el método de captura de radicales libres (DPPH),
 - La actividad citotóxica en el modelo de *Artemia salina* L.

DIAGRAMA GENERAL



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Recolecta del material vegetal

Las hojas de *Siparuna andina* se recolectaron, a partir de arbustos adultos, en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, del Instituto de Biología-UNAM, en el estado de Veracruz, en mayo del 2003.

El material vegetal se deshidrató en una cámara de secado a una temperatura de 39-40 °C, por dos semanas. Una vez seco el material, se realizó la molienda y se procedió a la obtención de los extractos orgánicos de polaridad creciente.

B. Obtención de extractos

Al material vegetal seco (571 g) se le realizaron una serie de extracciones por maceración, con tres diferentes disolventes, a temperatura ambiente cada uno. Se dejó reposar por 24 h, posteriormente se filtró y se destiló a sequedad bajo presión reducida en un rotavapor (Büchi Rotavapor R205). El extracto obtenido fue trasvasado y colocado en una cámara de vacío para eliminar por completo el disolvente. De esta manera se obtuvieron los tres extractos: el hexánico, acetato de etilo y metanólico, y se calcularon los rendimientos.

C. Análisis de los extractos

Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios.

Con el propósito de conocer los grupos de compuestos químicos presentes, se efectuaron pruebas para determinar la presencia de: glucósidos, terpenos y esteroides, flavonoides y alcaloides para cada extracto crudo. Los reactivos se prepararon de acuerdo al apéndice 1.

Se realizaron las pruebas en tubo de ensaye, preparándose una solución de 5 mg de cada extracto para cada prueba. El extracto Hex se disolvió en 1 ml de cloroformo y el extracto de AcOEt y MeOH se disolvieron en 1 ml de MeOH.

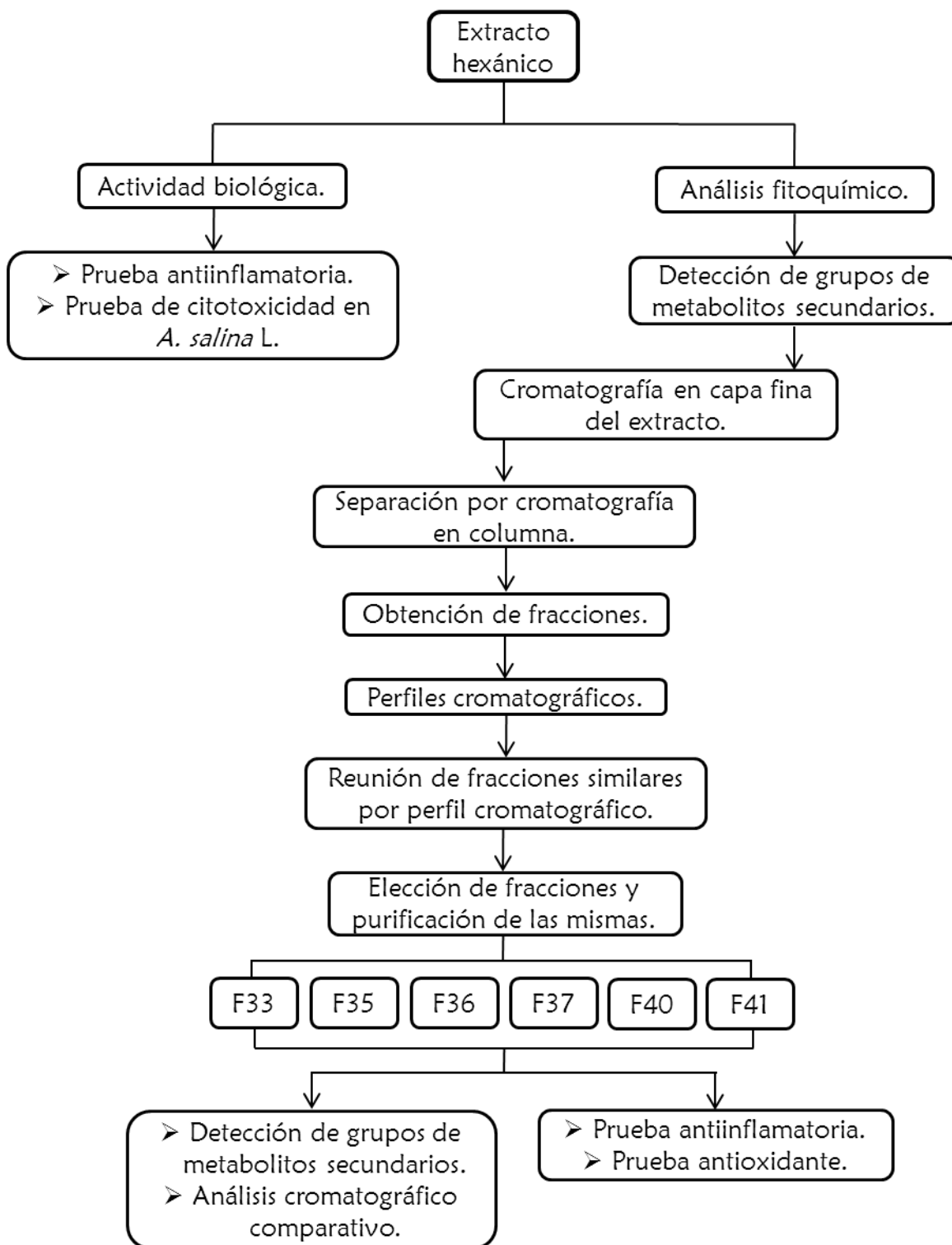
a. Perfil cromatográfico de los extractos crudos.

Para cada uno de los extractos se buscó el mejor sistema de elución, para esto se pesaron 5 mg de cada extracto. El extracto Hex se disolvió en 2 ml de cloroformo y los extractos de AcOEt y MeOH se disolvieron en 2 ml de MeOH. De cada solución se tomó una muestra con capilar para realizar la aplicación sobre la placa cromatográfica (placas con base gel de sílice en soporte de vidrio MERCK®). Se probaron diversos eluyentes de diferente polaridad (Hex, AcOEt y MeOH) hasta obtener aquel que nos diera una mejor resolución de los compuestos contenidos en los extractos. Las placas se desarrollaron en una cámara cromatográfica vertical (Sigma Aldrich®) y fueron observadas bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm). Se revelaron con sulfato cérico.

b. Actividad biológica.

A cada uno de los extractos crudos se les realizó la prueba de actividad antiinflamatoria y la prueba de citotoxicidad en *Artemia salina* L. La realización de estas pruebas se muestra en el apéndice 2.

DIAGRAMA DEL EXTRACTO HEXÁNICO



1. EXTRACTO HEXÁNICO

Separación por cromatografía en columna.

Se adsorbieron 16 g del extracto hexánico en celita hasta quedar un polvo homogéneo y se colocó en la parte superior de una columna de cromatografía abierta, empacada con 160 g de gel de sílice MN Kieselgel 60 como fase estacionaria. Se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de hexano hasta metanol (**Tabla 9**). Se colectaron alícuotas de 100 ml y cada una se concentró bajo presión reducida en un rotavapor, el cambio de polaridad se realizó cuando disminuía notablemente la cantidad de muestra en la fracción.

Tabla 9. Eluyentes utilizados para la cromatografía en columna del extracto hexánico.

Mezcla de eluyentes
Hex 100%
Hex: AcOEt (9:1)
Hex: AcOEt (8.5:1.5)
Hex: AcOEt (8:2)
Hex: AcOEt (7:3)
Hex: AcOEt (6:4)
Hex: AcOEt (4:6)
Hex: AcOEt (2:8)
AcOEt 100%
AcOEt: MeOH (7:3)
AcOEt: MeOH (5:5)
MeOH 100%

Las fracciones que presentaron similitud por cromatografía en capa fina se reunieron y las que presentaron algún precipitado se limpiaron y se tomó el punto de fusión. Una vez reunidas las fracciones de la separación cromatográfica, se eligieron aquellas que mostraron mayor cantidad de muestra, así como también los compuestos purificados.

Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios.

A las fracciones elegidas, se les efectuaron las pruebas para detectar la presencia de terpenos y flavonoides. La realización de estas pruebas se describe en el apéndice 1. Se realizaron pruebas en tubo de ensaye, se preparó una solución de 5 mg de muestra disuelta en 2 ml de disolvente para cada prueba.

Análisis cromatográfico comparativo.

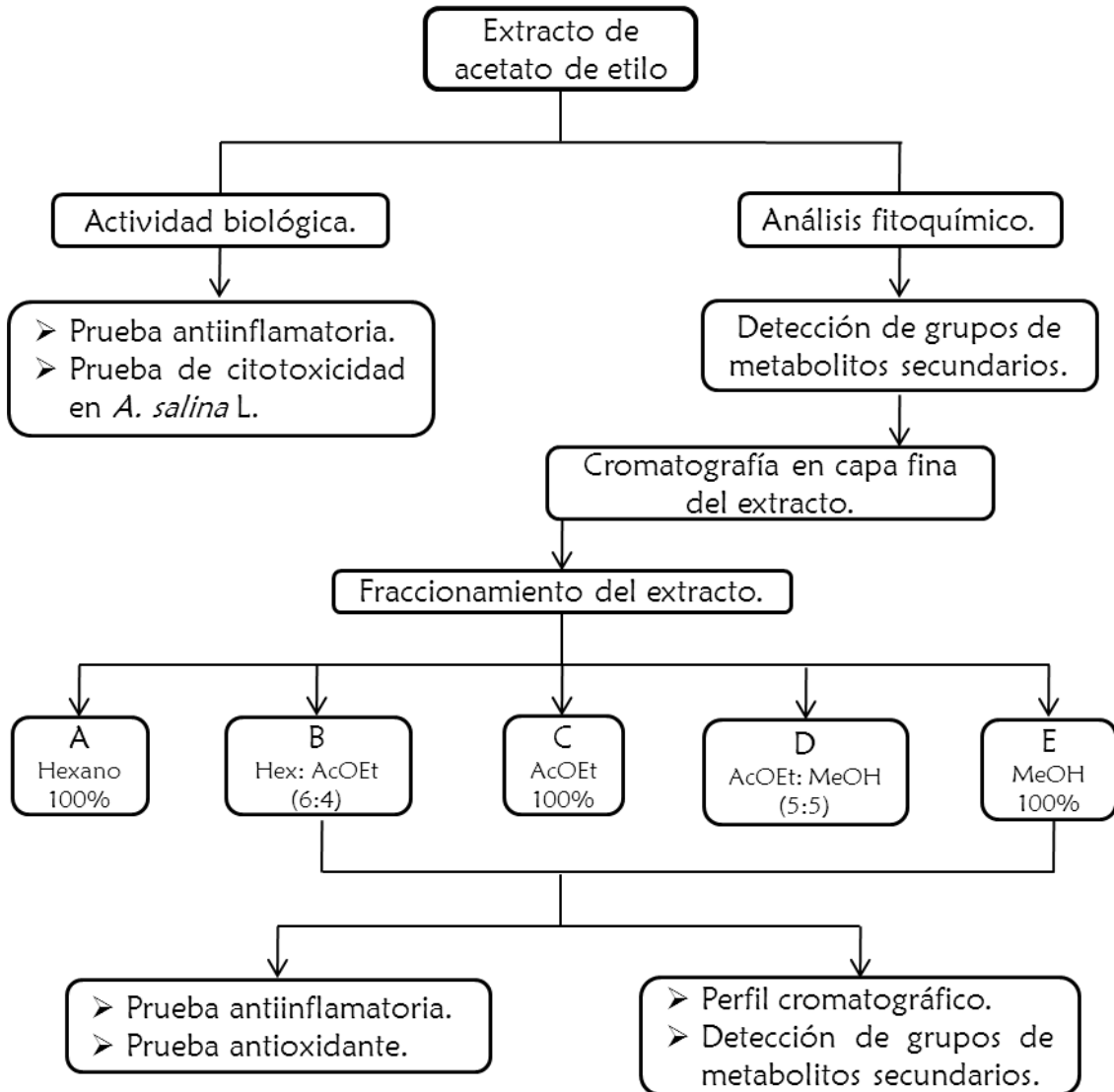
Se prepararon disoluciones de las seis fracciones y se aplicaron 50 µg de muestra con un aplicador automático CAMAG TLC *Sampler* 4, sobre placas cromatográficas de gel de sílice (MERCK®). El eluyente en el cual se desarrolló la placa cromatográfica fue una mezcla de Hex: AcOEt (3:7), la separación se llevó a cabo en una cámara cromatográfica vertical (Sigma Aldrich®), posteriormente se secó y roció con anisaldehído (revelador específico para terpenos), se calentó a 90 °C hasta que no aparecieran nuevas manchas en la placa.

La placa fue escaneada en un densitómetro CAMAG TLC *scanner* 3, operado por software *winCATS-Planar Chromatography* versión 1.2.0. Se realizaron lecturas a diferentes longitudes de onda (450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 y 800 nm) para determinar la longitud de onda a la cual se observaran la mayor cantidad de compuestos, una vez obtenida esta longitud de onda se compararon las absorbancias de cada mancha (representada como área bajo la curva) y se realizó la comparación de fracciones.

Actividad biológica de fracciones y cristales obtenidos.

Se realizó la prueba de actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante para las seis fracciones y para los cristales obtenidos así como la actividad antiinflamatoria y la prueba de citotoxicidad sobre *Artemia salina* L. La realización de estas pruebas se describe en el apéndice 2.

DIAGRAMA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO



2. EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Fraccionamiento del extracto.

Se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de hexano hasta metanol (**Tabla 10**). Se obtuvieron 5 fracciones. El cambio de polaridad se realizó cuando disminuía la concentración de la muestra al rotaevaporar.

Tabla 10. Eluyentes utilizados para el fraccionamiento del extracto crudo de acetato de etilo.

Fracción	Mezcla de eluyente
A	Hex 100%
B	Hex: AcOEt (6:4)
C	AcOEt 100%
D	AcOEt: MeOH (5:5)
E	MeOH 100%

Perfil cromatográfico de las fracciones.

A fin de obtener un análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas, se realizaron cromatografías en capa fina (CCF) de la siguiente manera:

Se pesaron 5 mg de cada fracción. La fracción A no se trabajó debido a la escasa cantidad de muestra. Las fracciones B y C se disolvieron en 2 ml de cloroformo y las fracciones D y E se disolvieron en 2 ml de metanol, con un capilar se aplicó la muestra sobre la placa cromatográfica (placas con base gel de sílice en soporte de vidrio MERCK®). Se probaron diversos eluyentes hasta obtener aquel que nos diera una mejor resolución de las manchas. Además una placa se desarrolló con el siguiente sistema de elución:

AcOEt: Ac. fórmico: Ac. acético: H₂O

(100: 11: 11: 27)

(Sistema usado para la detección de flavonoides)

Las placas se desarrollaron en una cámara cromatográfica vertical (Sigma Aldrich®) y se observaron en un gabinete con luz ultravioleta de onda larga (365 nm). Se revelaron con sulfato cérico, con reactivo de Liebermann-Burchard y anisaldehído (ambos reactivos para evidenciar la presencia de terpenos y esteroides). Para flavonoides se utilizó el revelador específico RPN (2-Aminoetil difenilborato).

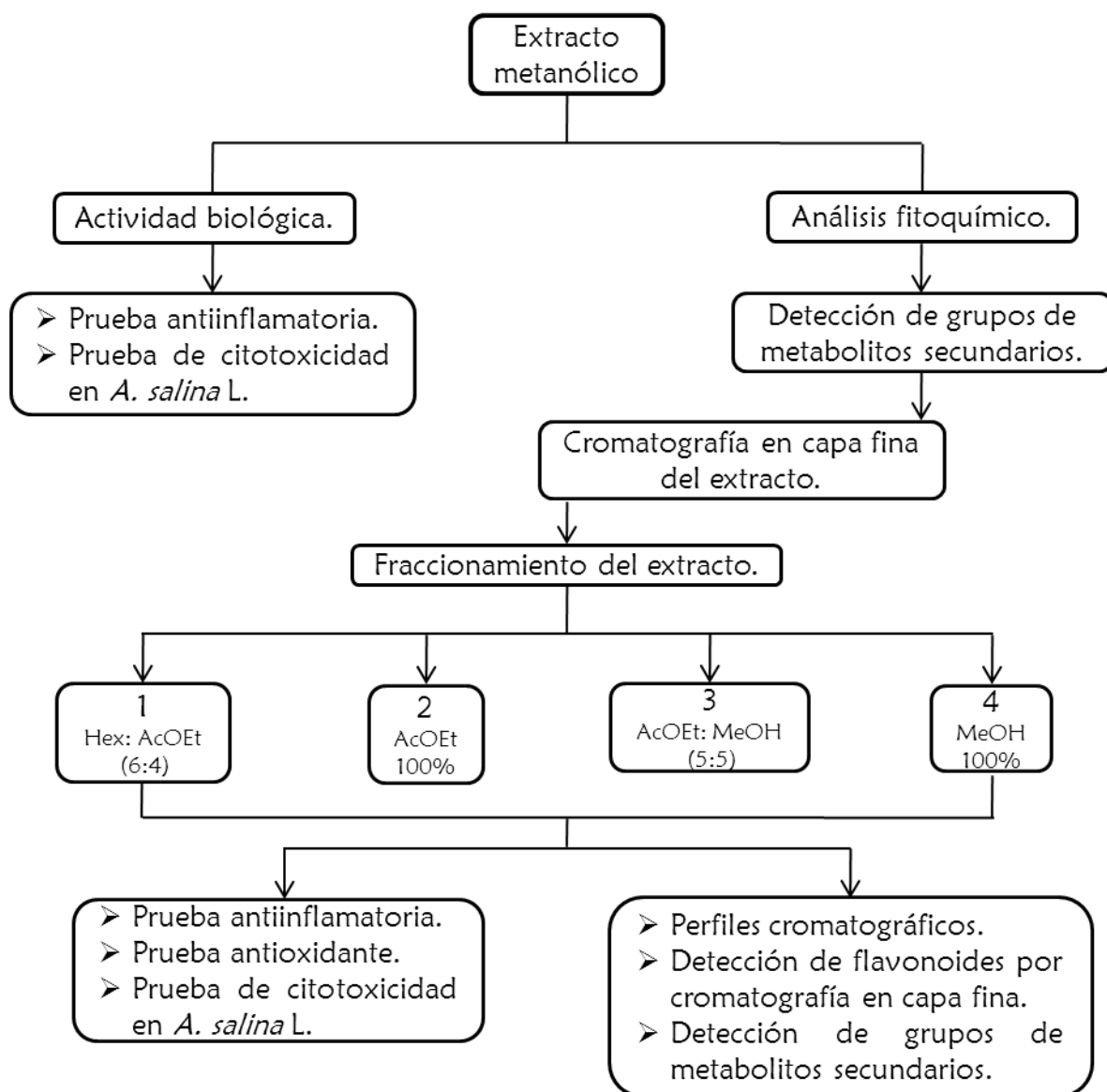
Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios.

Obtenidas las fracciones se procedió a efectuar las pruebas para detectar la presencia de terpenos y flavonoides. La realización de estas pruebas se describe en el apéndice 1. Se realizaron pruebas en tubo de ensaye, se preparó una solución de 5 mg de muestra disuelta en 2 ml de disolvente para cada prueba.

Actividad biológica.

A las cuatro fracciones se les realizó la prueba de actividad antiinflamatoria y la prueba de actividad antioxidante (DPPH). La realización de estas pruebas se describe en el apéndice 2.

DIAGRAMA DEL EXTRACTO METANÓLICO



3. EXTRACTO METANÓLICO

Fraccionamiento del extracto.

Se adsorbieron 42 g de extracto metanólico en celita hasta quedar un polvo homogéneo y se colocó en la parte superior de una columna de cromatografía en columna, empacada con 120 g de gel de sílice 60 GF₂₅₄ (MERCK®) como fase estacionaria y se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de hexano hasta metanol (**Tabla 11**). Se obtuvieron 4 fracciones. El cambio de polaridad se realizó cuando disminuía la concentración de la muestra al rotaevaporar.

Tabla 11. Eluyentes utilizados para el fraccionamiento del extracto metanólico crudo.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1	Hex: AcOEt (6:4)
2	AcOEt 100%
3	AcOEt: MeOH (5:5)
4	MeOH 100%

Perfil cromatográfico de las fracciones.

A fin de obtener un análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas, se realizaron cromatografías en capa fina (CCF) de la siguiente manera:

Se pesaron 5 mg de cada fracción. Las fracciones 1 y 2 se disolvieron en 2 ml de cloroformo y las fracciones 3 y 4 se disolvieron en 2 ml de metanol. De cada solución se tomó una muestra con capilar para realizar la aplicación sobre la placa cromatográfica (placas con base gel de sílice en soporte de vidrio MERCK®). Se probaron diversos eluyentes de diferente polaridad hasta obtener aquel que nos diera una mejor resolución de las manchas. En el perfil cromatográfico de las 4 fracciones se colocaron dos flavonoides puros: la quercitina y la rutina para observar si hay presencia de uno de estos estándares. Las placas se desarrollaron en una cámara cromatográfica vertical (Sigma Aldrich®).

Las placas fueron observadas en un gabinete con luz ultravioleta de onda larga (365 nm). Se revelaron con sulfato cérico (revelador general para productos orgánicos), con Liebermann-Burchard y anisaldehído (ambos reactivos para evidenciar la presencia de terpenos y esteroides).

La placa en la cual se colocaron los flavonoides estándares se utilizó el revelador específico RPN (2-Aminoetil difenilborato).

Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios.

Obtenidas las fracciones se procedió a efectuar las pruebas para detectar la presencia de glucósidos, flavonoides y terpenos. La realización de estas pruebas se describe en el apéndice 1. Se realizaron pruebas en tubo de ensaye, se preparó una solución de 5 mg de muestra disuelta en 1 ml de disolvente para cada prueba.

Actividad biológica.

A las cuatro fracciones se les realizó la prueba de actividad antiinflamatoria, la prueba de actividad antioxidante (DPPH) y la prueba de citotoxicidad en *A. salina* L. La realización de estas pruebas se describe en el apéndice 2.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Material biológico

Las hojas de *Siparuna andina* se recolectaron en la selva alta perennifolia en mayo del 2003. En esta época, los arbustos presentaron floración y comenzaba el desarrollo del fruto, semejante a lo que mencionó Antonio (1983) para *S. pauciflora* y *S. nicaraguensis* que tienen patrones de floración y fructificación similares, en la floración coinciden con el final de la temporada seca y la fructificación comienza con la temporada de lluvias.

Las hojas también presentaron un característico olor a limoncillo, el cual era más intenso en los arbustos femeninos. Esto es debido a la abundante cantidad de aceites volátiles presentes en toda la planta. De acuerdo a estudios de campo realizados por Antonio y colaboradores (1984), las hojas y las flores de cada especie de *Siparuna* tiene su olor característico. Se sospecha que estos olores pueden ser importantes en la polinización para la atracción de insectos.

B. Rendimiento de los extractos

El peso final de las hojas secas y molidas fue de 571 g; de esta cantidad, el peso y el porcentaje de rendimiento que se obtuvieron de los extractos (hexánico, acetato de etilo y metanólico) se presenta en la **tabla 12**:

Tabla 12. Peso y rendimiento de los extractos crudos.

Rendimientos						
Hojas	Hexano		Acetato de etilo		Metanol	
	(g)	%	(g)	%	(g)	%
	16	2.8	9	1.6	42	7.4

El rendimiento del extracto metanólico presentó el porcentaje más alto (7.4%) (**Tabla 12**) en comparación con el resto de los extractos, el extracto hexánico tuvo un porcentaje de rendimiento del 2.8% y el extracto de acetato de etilo tuvo un porcentaje de rendimiento del 1.6%.

Estos datos concuerdan con obtenidos por Leitão y colaboradores (2000) en hojas de *Siparuna apiosyce*, en los cuales el porcentaje de rendimiento para el extracto metanólico fue más alto que el rendimiento del extracto hexánico, esto se debe a que las plantas, en general, presentan mayor cantidad de compuestos polares.

C. Análisis de los extractos

Detección de grupos de metabolitos secundarios.

Los resultados de las pruebas de detección a los que fueron sometidos los extractos crudos se observa en la **tabla 13**.

Tabla 13. Metabolitos secundarios detectados en los 3 extractos crudos.

	Glucósidos	Terpenos y esteroides	Flavonoides	Alcaloides
Extracto hexánico	—	++++	+	—
Extracto de acetato de etilo	—	++++	+	—
Extracto metanólico	+	++	+	—

Nota: El signo + representa la intensidad de la reacción: +25%, ++50%, +++75%, ++++100%; el signo — representa que la cantidad del compuesto fue insuficiente para su detección.

Vila y colaboradores (2002) encontraron que en los análisis cualitativos de aceites en hojas de *S. thecaphora* mostraron la presencia de sesquiterpenos (espatulenol, α -copaeno, α -candinol y δ -candineno) que representan la mayor fracción de los aceites; y monoterpenos que se detectaron en bajas concentraciones. Por otro lado, Leitão y colaboradores (1999) encontraron en hojas y ramas de *S. macrotepala*, una planta medicinal ecuatoriana, la presencia de sesquiterpenos. Estos resultados indican que *S. macrotepala* y *S. andina* (bajo la sinonimia de *S. thecaphora*) presentan este tipo de compuestos en extractos no polares.

Los flavonoides se encontraron en los tres extractos con la misma respuesta (**Tabla 13**). Leitão y colaboradores (1999) mencionaron que los flavonoides hasta ahora encontrados en la Familia Monimiaceae son flavonoles y flavonas, sustituido por hidroxilos libres u *O*-glucósilos. Pocos están sustituidos por grupos *O*-metilos.

De la purificación del extracto metanólico de *S. apiosyce* se aisló el compuesto 3,7,4'-tri-*O*-metilkaempferol en todos los órganos de la planta (principalmente en las hojas) pero no se encontró en *S. arianae*. Adicionalmente, tilirosida y otros flavonoides glicosilados fueron aislados de las hojas de *S. apiosyce*. Jenett-Siems y colaboradores (2000) aislaron de las hojas de *S. andina*, un nuevo flavonoide: (-)-*cis*-3-acetoxi-4',5,7-trihidroxiflavanona. Claros y colaboradores (2000) mencionaron que se aisló un flavonoide, vitexina, de hojas de *Mollinedia costaricensis*, especie que pertenece a uno de los dos géneros con mayor número de especies de la Familia Monimiaceae.

Los glucósidos sólo se observaron en el extracto metanólico con una respuesta ligeramente positiva; en el extracto hexánico y de acetato de etilo los compuestos no fueron suficientes para su detección (**Tabla 13**).

En este estudio, la cantidad de alcaloides fue insuficiente para su detección en los tres extractos; sin embargo, numerosos estudios realizados en especies de la Familia Monimiaceae mostraron una gran riqueza de alcaloides derivados de la benciltetrahydroisoquinolina como proaporfina, aporfina y oxoaporfina. Gerard y colaboradores (1986) mencionaron que es poco común la presencia de compuestos del tipo morfinedienona, como flavinantina y *O*-metilflavinantina, aislados de *S. dresslerana*.

De esta forma, las aporfinas forman el grupo más grande de alcaloides aislados de la Familia Monimiaceae, especialmente de *Laurelia* y *Siparuna*. El alcaloide liriodenina tiene una marcada presencia en este último género siendo encontrado en el extracto metanólico de la raíz de *S. gilgiana* (sinónimo de *S. andina*) (Gerard *et al.*, 1986; Chiu *et al.*, 1982), en el tronco de *S. guianensis* (Braz-Filho *et al.*, 1976), en la corteza y raíces de *S. tonduziana* (López *et al.*, 1990). De las ramas de *S. nicaraguensis* (sinónimo. de *S. andina*) se aisló la liriodenina, pero en las hojas no se detectó este alcaloide. De las hojas de *S. patelliformis* fueron extraídos y examinados alcaloides pero se presentaron en cantidades insuficientes para su caracterización (Gerard *et al.*, 1986). La liriodenina se aisló de hojas, tronco y corteza de *S. apiosyce* y de los receptáculos del fruto de *S. arianae* junto con otros alcaloides (nantenina y *N*-metillaurotetanina (Leitão *et al.*, 1999).

Además de estos compuestos, otras especies presentaron diversos tipos de alcaloides como (+)-asimilobina y (+)-isocoridina presentes en los tallos de *S. griseo-flavescens* (López *et al.*, 1993), de tallos de *S. pauciflora* se aisló noroliverolina (López *et al.*, 1988), también se aisló el alcaloide asimilobina de las partes aéreas de *S. apiosyce* (Fischer *et al.*, 1999). Todas estas diferencias químicas se podrían atribuir a la localización geográfica, al microambiente, al estado fenológico, así como la época del año en que se colectó la planta.

Separación de los extractos por cromatografía en capa fina.

Las cromatografías en capa fina realizadas a los tres extractos para conocer la diferencia de compuestos, mostraron los siguientes perfiles cromatográficos: el mejor sistema de elución para el extracto hexánico fue Hex: AcOEt (7:3), que al ser revelada con sulfato cérico evidenció la presencia de 5 manchas (**Figura 7 a y b**). El mejor sistema de elución para el extracto de acetato de etilo fue AcOEt: MeOH (8:2), en donde se observaron compuestos de mayor polaridad. El extracto metanólico mostró una mayor separación de los compuestos (10 manchas), en el sistema de elución AcOEt: MeOH (6:4), al ser revelada con sulfato cérico (**Figura 8 a y b**). Este sistema de elución se utilizó para el comienzo del fraccionamiento del extracto metanólico.

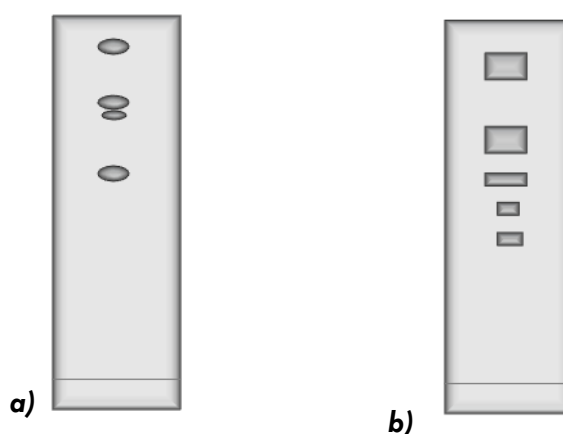


Fig. 7. Perfil cromatográfico del extracto hexánico. a) Las elipses muestran las bandas observadas bajo luz UV ($\lambda=365$ nm) y b) los rectángulos muestran las manchas que se observaron en la placa al ser revelada con sulfato cérico.

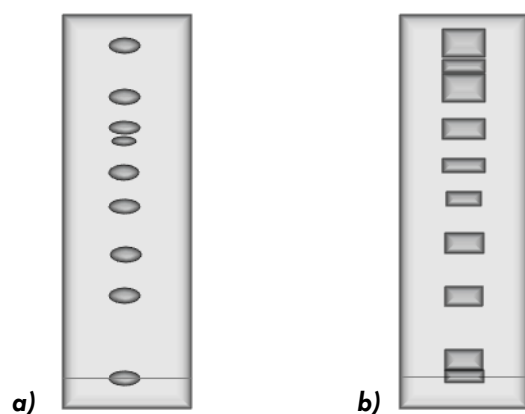
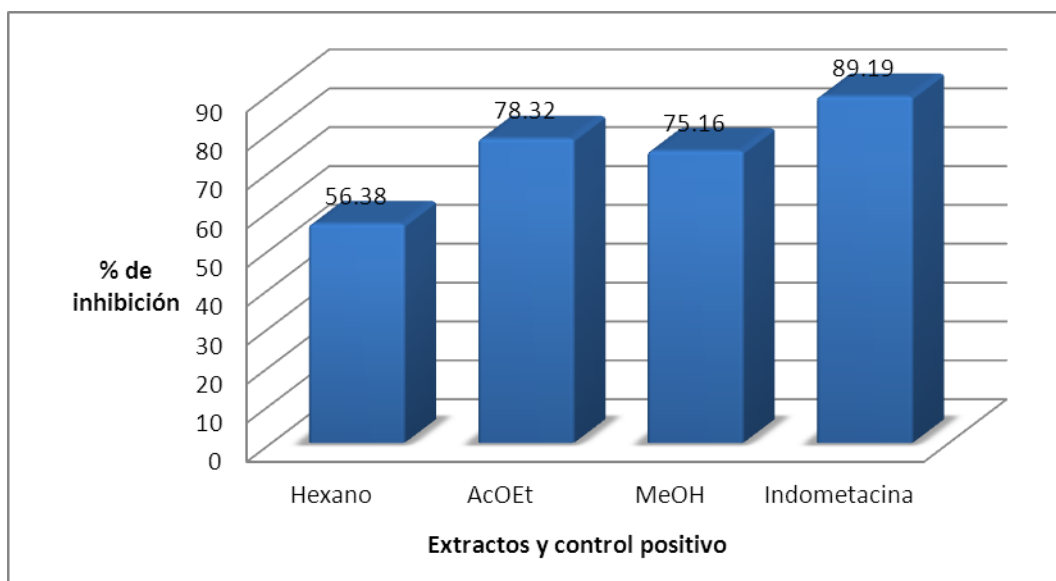


Fig. 8. Perfil cromatográfico del extracto metanólico. a) Las elipses muestran las bandas que se observaron bajo luz UV ($\lambda=365$ nm) y b) los rectángulos muestran las bandas que se observaron al revelar la placa con sulfato cérico.

Actividad biológica.

Actividad antiinflamatoria.

En la **gráfica 1** se muestran los resultados de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA, expresados como porcentaje de inhibición de la inflamación a una concentración de 1 mg extracto/oreja.



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de la inflamación en los extractos crudos.

Como se observa en la tabla anterior, los extractos que mostraron una mayor respuesta en el porcentaje de inhibición, fueron el de AcOEt y MeOH con 78.32% y 75.16% respectivamente, esto en comparación con la indometacina (control positivo) que presentó 89.19% de inhibición; el extracto hexánico fue el que tuvo el menor porcentaje de inhibición con 56.38%. Aunque en el extracto de AcOEt y en el Hex se detectaron los mismos grupos de metabolitos secundarios, así como la misma intensidad de éstos (**Tabla 13**), podemos inferir que los compuestos que proporcionan la actividad antiinflamatoria, en el extracto Hex, se encuentran en menor concentración y que en el extracto de AcOEt y el MeOH se encuentran en mayor concentración. También podemos inferir que hay de compuestos que no se encuentran en los otros extractos dándole una mayor actividad antiinflamatoria al extracto de AcOEt; aunque la presencia de los glucósidos en el extracto MeOH podría influir en dicha actividad.

Actividad citotóxica en Artemia salina L.

La actividad citotóxica de los 3 extractos mostró una relación dosis-respuesta en las 3 concentraciones probadas. En esta prueba el extracto hexánico fue el más citotóxico en *A. salina* a 1000 ppm con un porcentaje de mortandad del 54%. Los extractos de acetato de etilo y metanol tuvieron una respuesta menor a la misma concentración que fue de 40% en ambos.

Al comparar la actividad citotóxica en el extracto Hex y en el de AcOEt se obtuvo un porcentaje de mortandad del 54% y 40%, respectivamente. Por el contrario, la actividad antiinflamatoria en ambos extractos fue de 56.38% y 78.32%, respectivamente, observándose un mayor porcentaje de inhibición en el extracto de AcOEt, todo lo contrario a la actividad citotóxica. En las pruebas para la detección de metabolitos secundarios, ambos extractos mostraron los mismos grupos (flavonoides y terpenos-esteroides) con la misma intensidad. Es notable observar que la actividad antiinflamatoria y la actividad citotóxica no se deben a estos compuestos, es decir, a pesar de que ambos extractos presentan los mismos grupos, las actividades biológicas registradas fueron opuestas, lo cual se pueden deber a las interacciones antagónicas y sinérgicas de las sustancias presentes en los extractos.

1. EXTRACTO HEXÁNICO

Separación por cromatografía en columna.

Se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna (CC) para obtener una separación del extracto con mayor definición y obtener compuestos puros, los eluyentes fueron desde hexano, acetato de etilo hasta el metanol, realizando mezclas de menor a mayor polaridad entre éstos. La separación por CC del extracto hexánico (16 g) arrojó un total de 355 fracciones. La consistencia de las fracciones fue desde la cerosa (en las menos polares) hasta viscosa (en las más polares). Las fracciones que presentaron similitud por cromatografía en capa fina (CCF) se reunieron dando un total de 42 fracciones y se marcaron como se muestra en la **tabla 14**.

Tabla 14. Fracciones reunidas por cromatografía en capa fina del extracto hexánico.

Fracción	Clave	Fracción	Clave	Fracción	Clave	Fracción	Clave	Fracción	Clave
1	F1	11-19	F10	43-44	F19	75-79	F28	230-304	F37
2	F2	20-30	F11	45-49	F20	80-84	F29	305-319	F38
3	F3	31	F12	50	F21	85-98	F30	320-332	F39
4	F4	32-34	F13	51-54	F22	99-103	F31	333-335	F40
5	F5	35-38	F14	55-59	F23	104-113	F32	336-350	F41
6	F6	39	F15	60-63	F24	114-164	F33	351-355	F42
7	F7	40	F16	64	F25	165-169	F34		
8	F8	41	F17	65-69	F26	170-199	F35		
9-10	F9	42	F18	70-74	F27	200-229	F36		

Los rendimientos de las fracciones fueron diferentes, mostrando en algunas rendimientos muy bajos; sin embargo, seis de las fracciones mostraron un rendimiento adecuado para realizar pruebas biológicas (actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante) (**Tabla 15**). Se obtuvieron dos precipitados, uno de la F30 y el otro de la F21, los cuales se recrystalizaron con hexano y se separaron por filtración a vacío. Las características de los precipitados y su punto de fusión son las siguientes:

Fracción	Características	Punto de fusión
F21	sólido blanco	70-75°C
F30	sólido cristalino transparente	153-154°C

Fracción	Peso (g)
F30	0.06
F33	1.61
F35	0.98
F36	0.61
F37	2.24
F40	0.36
F41	0.23

Tabla 15. Peso de los cristales y fracciones reunidas que mostraron mayor cantidad de muestra

A estas seis fracciones se les realizó un análisis cromatográfico comparativo, empleando como eluyente Hex: AcOEt (3:7), se observaron diferentes números de compuestos, que variaba entre 2 y 8 bandas (**Figura 9 y 10**), lo cual indicó que la complejidad del extracto era mayor a la que se observó anteriormente, teniendo una gran cantidad de compuestos que no se habían detectado.

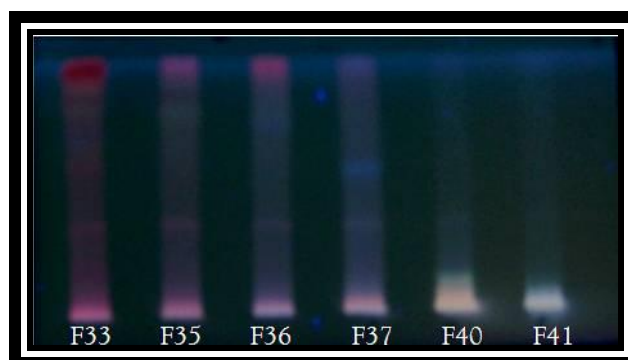


Fig. 9. Placa cromatográfica observada bajo luz UV ($\lambda=365\text{nm}$).

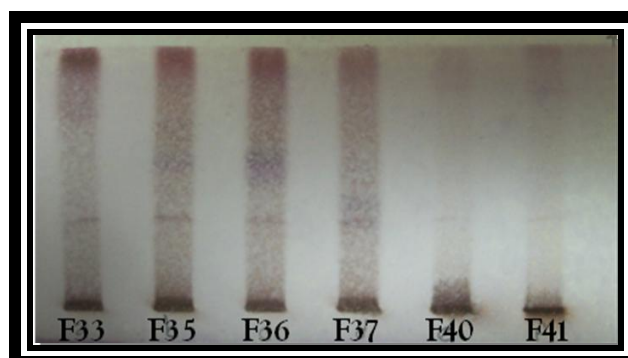


Fig. 10. Placa cromatográfica revelada con anisaldehído.

El revelado específico para la detección de terpenos por medio de anisaldehído mostró la presencia de este grupo (**Figura 11**). Se observó una semejanza entre las fracciones F33, F35, F36 y F37 aunque hubo diferencia entre la concentración de las bandas en cada fracción.

La placa fue analizada por el densitómetro con el fin de obtener una mejor aproximación de las diferencias en compuestos entre las seis fracciones analizadas. Se encontró que la longitud máxima de absorción fue a los 550 nm, en la cual se observó mayor presencia de manchas (**Tabla 16**) y en la **figura 11** se muestra el cromatograma de los compuestos detectados a $\lambda=550$ nm.

Tabla 16. Rfs de las manchas (bandas) detectadas a una $\lambda=550$ nm.

λ 550 nm	Rfs máximos de las bandas														
% de inhibición (actividad antiinflamatoria)	Fracción	0.12 0.13	0.19 0.2	0.28	0.33 0.34	0.37	0.43 0.44	0.5 0.51	0.53 0.54	0.57	0.59	0.72 0.73	0.78	0.81	0.97
71.09	F41				19.2						18	30			33.1
81.12	F40	17			13.3						39			9.1	22
96.07	F37		6.4	5.1		9	8				30.2	12.1	7.2		22.1
86.73	F36	18.1		12		35		13	3.3			3.1			16.2
89.68	F35									26.1					74.1
93.61	F33	9	12.4								23.1				56.1

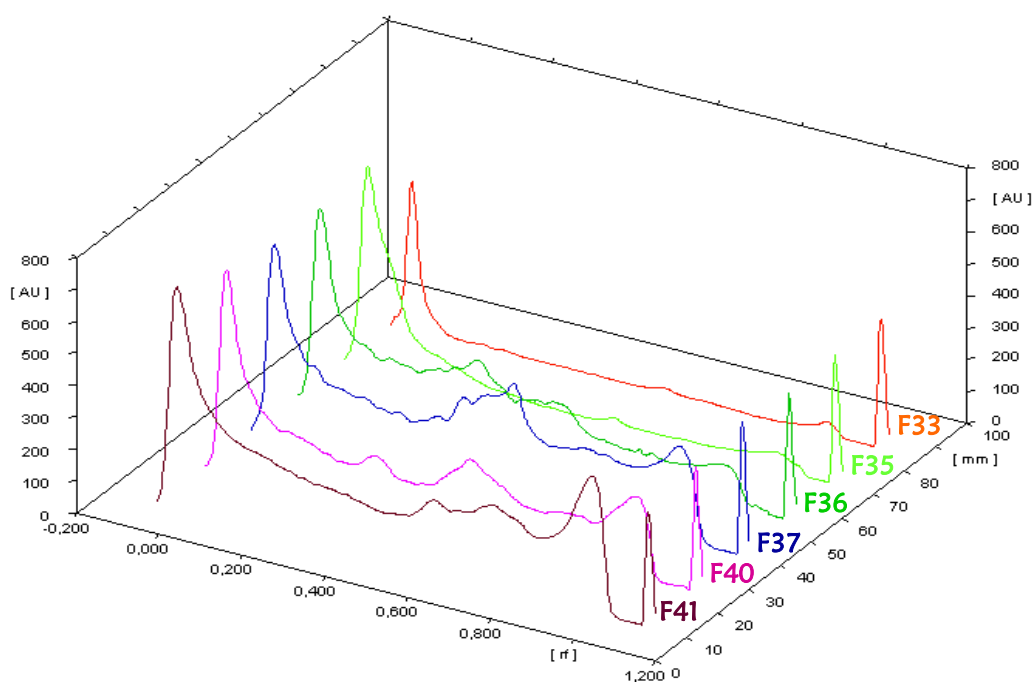


Fig. 11. Cromatograma de los compuestos detectados a una $\lambda=550$ nm en las seis fracciones.

Las fracciones F36 y F37 fueron las que presentaron la mayor diferencia en el patrón de distribución de las bandas desarrolladas, así como en el número de éstas (7 y 8 respectivamente); seguido de estas fracciones, la F40 presentó 5 compuestos, aunque tres de éstos mostraron la misma distribución que la F41; las fracciones F33 y F41 (con cuatro compuestos cada una), mostraron un perfil cromatográfico de mayor similitud entre el número de compuestos observados, aunque la intensidad y la mayoría de la distribución de las banda (coincidiendo solo con 2 bandas en al mismo Rf 0.59 y 0.97) fueron diferentes (**Tabla 16**); la F35 arrojó solo 2 bandas, de éstas, la que se encuentra en el Rf 0.57 no se presentó en las demás fracciones o la cantidad no fue suficiente para su caracterización. De todos los compuestos presentes, solo el de menor polaridad (Rf=0.97) se presentó en todas las fracciones, la abundancia de este compuesto, en orden decreciente, fue de la siguiente manera: F35, F33, F41, F37, F40 y F36 (**Tabla 16**).

Detección de grupos de metabolitos secundarios.

Las fracciones aisladas confirmaron la presencia de flavonoides y terpenos-esteroides (**Tabla 17**), variando en el color de la reacción y en la intensidad. En el caso de los flavonoides, las últimas dos fracciones presentaron este grupo de metabolitos secundarios por el color anaranjado observado; en el resto de las fracciones se observó un color verde el cual varió en la intensidad.

Tabla 17. Resultados observados en la detección de flavonoides y terpenos-esteroides en las fracciones elegidas.

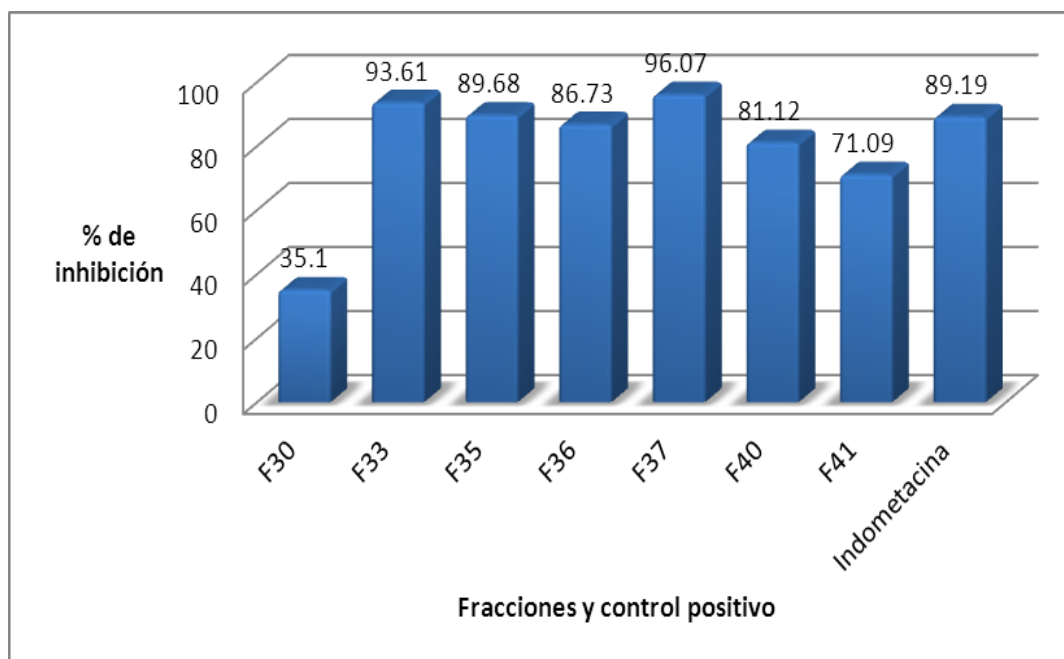
Fracción	Terpenos-esteroides	Flavonoides
F33	++++ Verde oscuro	+ Verde
F35	+++ Vino	+ Verde
F36	++ Café-anaranjado	++ Verde
F37	++++ Vino	++ Verde
F40	++++ Vino	++++ Café-anaranjado
F41	++ Vino	++++ Amarillo-anaranjado

Nota: El signo + representa la intensidad de la reacción: +25%, ++50%, +++75%, ++++100%.

Para los terpenos-esteroides, Claros y colaboradores (2000) aislaron de las hojas de *Mollinedia marliae*, especie perteneciente a la Familia Monimiaceae, un sesquiterpeno el γ -lactona, de la fracción 7-8 con acetona, del extracto hexánico. De las fracciones 18-21, del mismo extracto, purificaron una mezcla de sitosterol y estigmasterol, compuestos pertenecientes a los terpenos.

Actividad biológica de las fracciones.

Con respecto a la actividad antiinflamatoria, las seis fracciones seleccionadas tuvieron alta actividad (del 70 al 96% de inhibición); en cambio, los cristales analizados mostraron una actividad baja (35% de inhibición) (**Gráfica 2**). La fracción más activa fue la F37 (96.07%), seguida de la F33 (93.61%), F35 (89.68%), F36 (86.73%), F40 (81.12%) y por último F41 con 71.09%, esto en relación al control positivo (indometacina) que presentó un porcentaje de inhibición de 89.19%, por lo cual se deduce que tenemos compuestos activos en las seis fracciones. Es importante hacer notar que tres de las fracciones (F35, F33 y F37) presentaron un porcentaje de inhibición por arriba de la indometacina, esto se puede deber a las interacciones entre los compuestos existentes que hayan hecho que la actividad antiinflamatoria de estas fracciones aumente, existiendo de esta forma un sinergismo entre compuestos.



Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria de las seis fracciones y de los cristales.

Por el contrario, en la actividad antioxidante, se observó que el porcentaje de reducción del radical libre estable 1-1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) en las seis fracciones mostraron un porcentaje de reducción bajo (del 29 al 40%) con respecto al α -tocoferol (91.16%) a una concentración de 1000 ppm y un porcentaje de reducción del DPPH aún más bajo (de 4 a 6%) en la concentración de 100 ppm (**Tabla 18**).

Tabla 18. Actividad antioxidante en las seis fracciones del extracto hexánico.

Muestra	Concentración (ppm)	D.O. 515 nm	% de reducción del DPPH
DPPH (100 μM)	-	0.826	-
F33	100	0.783	5.28
	1000	0.516	37.60
F35	100	0.780	5.65
	1000	0.554	33.00
F36	100	0.787	4.80
	1000	0.584	29.37
F37	100	0.777	5.93
	1000	0.560	32.27
F40	100	0.782	5.37
	1000	0.512	38.04
F41	100	0.780	5.61
	1000	0.497	39.81
α-tocoferol	100	0.073	90.91
	1000	0.071	91.16

Cuando los electrones impares del DPPH se aparearon con los electrones tomados de los compuestos fenólicos, la absorbancia a 515 nm disminuyó (Silva *et al.*, 2002). De esta forma, la actividad se expresó como concentración efectiva 50 (IC₅₀) que es la concentración de la muestra requerida para disminuir la absorbancia del radical en un 50% comparado con la solución blanco (solución etanólica de DPPH) (Paniagua-Pérez *et al.*, 2006). El grado de decoloración es una medida de la reducción de la capacidad de los flavonoides y por la cual permite evaluar su actividad antioxidante (Silva *et al.*, 2002); por lo tanto, es posible que las seis fracciones del extracto hexánico no presenten compuestos que tengan una actividad atrapadora de radicales libres o bien, que estos compuestos no estén en cantidad suficiente para que la actividad antioxidante muestre una concentración efectiva por arriba del 50%, es

probable que los compuestos de mediana y alta polaridad tengan una actividad antioxidante alta.

Estos datos se relacionan con la presencia de terpenos-esteroides y flavonoides, esto se debe a que las fracciones F40 y F41 fueron las que presentaron la actividad antiinflamatoria más baja (81.12% y 71.09%, respectivamente) y mostraron una intensidad para terpenos-esteroides del 100% y 50%, respectivamente; por el contrario, se observó en ambas fracciones la mayor intensidad para flavonoides (100%) mostrando, entre las seis fracciones, el mayor porcentaje de reducción del DPPH del 38.04% y 39.81%, respectivamente. En el resto de las fracciones la intensidad de estos compuestos fue distinta.

De esta forma podemos inferir que existe una relación entre la intensidad de flavonoides y terpenos-esteroides con los resultados obtenidos en la actividad antiinflamatoria; es decir, mientras la intensidad de los terpenos y esteroides sea alta y la de los flavonoides sea baja, la actividad antiinflamatoria es alta; si la intensidad de ambos grupos es igual, la actividad antiinflamatoria es baja; y , si la intensidad de los terpenos y esteroides es baja y la intensidad de los flavonoides es alta, la actividad antiinflamatoria es baja. De esta forma, debe existir una alta intensidad en los terpenos-esteroides y una baja intensidad en los flavonoides para que la actividad antiinflamatoria sea significativa.

La actividad citotóxica en la F30 (cristales) a 10 ppm presentó un porcentaje de mortandad del 70%, lo que indica una mortandad moderada. En el resto de las concentraciones se observó un porcentaje de mortandad del 13% y 7% a 1 ppm y 0.1 ppm respectivamente. La actividad antiinflamatoria en esta fracción fue de 35.10% en comparación con la indometacina que fue de 89.19% de inhibición. Estos resultados podrían indicar que mientras más puro sea el compuesto, la actividad citotóxica aumentaría y la actividad antiinflamatoria disminuiría, lo cual indica la necesidad de un sinergismo para que esta última actividad biológica aumente.

Considerando todo lo anterior, las fracciones aun contienen una gran diversidad de compuestos, estos podrían sugerir una alta probabilidad de interacciones entre ellos, incrementando (sinergismo) o disminuyendo (antagonismo) el efecto biológico (Schmeda-Hirschmann y Yesilada, 2005). De esta forma, las interacciones sinérgicas son aquellas en las que la actividad combinada de dos o más sustancias químicas es mayor a lo

esperado dado sus actividades en forma individual. Por otra parte, las interacciones antagónicas son aquellas en las que la actividad combinada de dos o más sustancias químicas es menor al esperado dado sus actividades individuales (Nelson y Kursar, 1999). Ejemplo de esto tenemos a los flavonoides, los cuales están presentes en mucho fitomedicamentos y alimentos, y se sabe que tienen varias actividades como inhibidores de enzimas. Ahora se piensa, que desempeñan un papel en el aumento de la actividad biológica de otros compuestos por mecanismos sinérgicos o de otro tipo.

Esta teoría se apoya en dos cosas: 1) pruebas *in vitro* contra la malaria demostraron que la actividad de la artemisinina aumentó por la presencia de los flavonoides artemetina y casticina y 2) y algunos otros flavonoides como la genisteína, baicaleína, hesperetina, naringenina y quercetina, mostraron ser sinérgicos en la inhibición del crecimiento de una línea celular de cáncer de mama en humanos (Williamson, 2001).

2. EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Fraccionamiento del extracto.

El fraccionamiento del extracto de acetato de etilo arrojó un total de 5 fracciones, las cuales fueron ordenadas de acuerdo al eluyente de separación. En la **tabla 19** se observa el peso obtenido de cada fracción. La fracción A no se trabajó debido a la escasa cantidad de muestra.

Fracción	Peso (g)
A	0.02
B	5.65
C	0.7
D	2.5
E	0.1

Tabla 19. Fracciones y pesos obtenidos del extracto de AcOEt.

Perfil cromatográfico de las fracciones.

El mejor sistema de elución en el que se observó mayor número de bandas fue AcOEt: MeOH (8:2). En la **figura 12** se muestra el perfil cromatográfico de las fracciones del extracto de AcOEt observada bajo luz UV ($\lambda=365$ nm) y revelada con sulfato cérico.

En la **figura 13** se muestra la placa que se desarrolló con el sistema de elución usado para la detección de flavonoides AcOEt: Ácido fórmico: Ácido Acético: H₂O (100:11:11:27). Se puede observar que en la zona de menor polaridad hubo una mayor cantidad de bandas (1) que en el resto de la placa; en la zona de mediana polaridad no se observó ninguna banda (2) y en la zona de mayor polaridad (3) se observó muestra en el punto de aplicación.

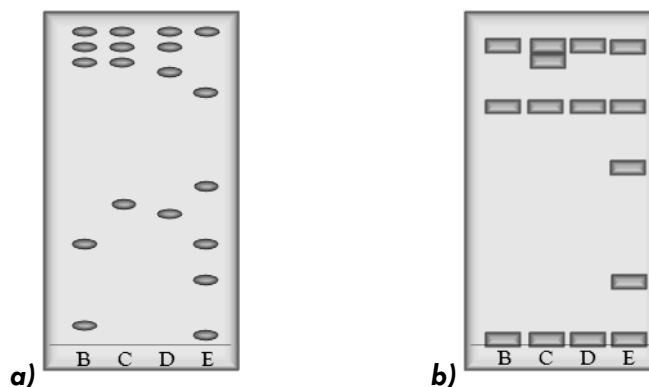


Fig. 12. Perfil cromatográfico de las fracciones del extracto de AcOEt; a) Bandas observadas bajo luz UV ($\lambda=365$ nm) y b) Bandas observadas con el revelador sulfato cérico.

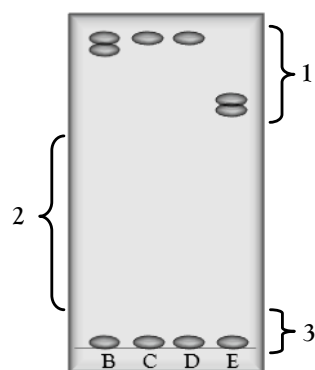


Fig.13. Placa cromatográfica desarrollada con el sistema de elución para la detección de flavonoides. Los círculos muestran las bandas observadas bajo luz UV ($\lambda=365$ nm). (1) Zona de baja polaridad, (2) zona de mediana polaridad y (3) zona de mayor polaridad.

En el perfil cromatográfico (**Figura 12**) se observó que las cuatro fracciones (B, C, D, y E) presentaron similitud en los compuestos que las constituyen, sobre todo en los de baja polaridad, en la zona de mayor polaridad se observaron compuestos semejantes tanto en la fracción B (menor polaridad) como en la fracción E (la más polar), esta última presentó el mayor número de compuestos en luz UV y también en el revelado con sulfato cérico, las fracciones C y D mostraron mayor similitud entre ellas

bajo luz UV y al ser reveladas con sulfato cérico y las fracciones B y D solo presentaron compuestos similares al ser reveladas con sulfato cérico. Esto puede indicar que el fraccionamiento no fue selectivo, lo cual puede deberse, a que el volumen con el que se trabajó en el fraccionamiento no fue suficiente para la separación del extracto así como también la cantidad de gel de sílice y el tamaño de la columna. Esto mismo indica el perfil cromatográfico de la **figura 13** en el cual, el sistema de elución no fue el adecuado para la separación debido a que solo se observaron compuestos no polares y compuestos de mayor polaridad, es decir, no se presentó una distribución a lo largo de la placa.

Detección de grupos de metabolitos secundarios.

Las fracciones confirmaron la presencia de flavonoides y terpenos-esteroides (**tabla 20**), las cuales presentaron similitudes en la intensidad de la reacción. Comparando la intensidad de la reacción de las fracciones con las del extracto crudo, se observó que en la intensidad de los terpenos-esteroides es muy similar; en cambio, para los flavonoides, la intensidad se presentó del 50% en las fracciones B y C, en la E el 75% y en la D el 100%, en el extracto crudo no fue mayor al 25%.

Tabla 20. Intensidad de la reacción de los flavonoides y terpenos-esteroides en las fracciones.

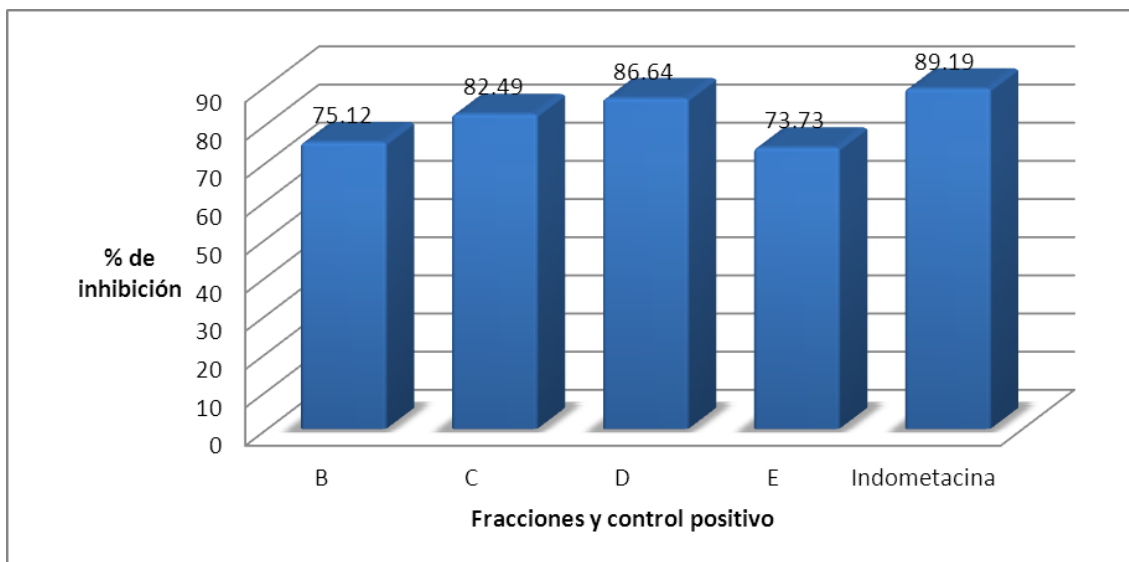
	Fracciones			
	B	C	D	E
Flavonoides	++ Morado-rosado	++ Morado-rosado	++++ Morado-rosado	+++ Morado-rosado
Terpenos-esteroides	+++ Verde-azulado	++++ Verde oscuro	++++ Verde oscuro	+++ Morado-rosado

Nota: El signo + representa la intensidad de la reacción: +25%, ++50%, +++75%, ++++100%.

Actividad biológica.

En la **gráfica 3** se muestra la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA y expresados como porcentaje de inhibición de la inflamación. Los resultados mostraron que el porcentaje de inhibición en las cuatro fracciones (del 72 al 87%), ante la presencia de un edema, fue muy alto con respecto al control, lo cual indicó que los compuestos que le dieron esta actividad no se perdieron o no disminuyeron en cantidad al ser fraccionado el extracto.

En cuanto a la presencia de metabolitos secundarios, la fracción D presentó la mayor intensidad para las pruebas de flavonoides y terpenos-esteroides, también fue la fracción que mostró la mayor actividad antiinflamatoria. Es posible que en este caso sean los terpenos-esteroides los que confieren el incremento en el porcentaje de inhibición en esta fracción.



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas del extracto de AcOEt.

Con respecto a la actividad antioxidante, en la **tabla 21** se observa el porcentaje de reducción del radical libre estable 1-1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) realizado a las fracciones. La fracción E presentó un porcentaje de reducción del DPPH del 79.43% seguida de la fracción D con un 73.50% de reducción del DPPH. Las fracciones B y C mostraron un porcentaje de inhibición muy parecido 70.23% y 70.03%, respectivamente.

Es posible que los flavonoides y los terpenos-esteroides sean los compuestos que les confirieron un porcentaje de reducción del DPPH muy similar a las fracciones D y E, debido a que la intensidad en la que se presentaron estos compuestos fueron similares entre ambas fracciones e iguales entre cada fracción. Entre las fracciones B y C se presentó una actividad antioxidante igual, pero la diferencia entre estas y las dos fracciones (D y E) mencionadas anteriormente es la intensidad en los flavonoides. Cabe destacar que en las fracciones B y C la intensidad de los flavonoides se presentó de igual manera, pero para los terpenos, en la fracción B la intensidad disminuyó.

Tabla 21. Porcentaje de reducción del DPPH realizado en las fracciones del extracto de AcOEt.

Fracción	Concentración (ppm)	D.O. 515 nm	% de reducción del DPPH
DPPH (100 μ M)	-	0.826	-
B	100	0.714	13.63
	1000	0.246	70.23
C	100	0.713	13.72
	1000	0.248	70.03
D	100	0.714	13.63
	1000	0.219	73.50
E	100	0.672	18.72
	1000	0.170	79.43
α-tocoferol	100	0.073	90.91
	1000	0.071	91.16

La similitud entre las fracciones indica que se hace necesaria una separación cromatográfica más fina para separar la mayor cantidad de compuestos y realizar las pruebas biológicas nuevamente a fracciones que muestren mayor diferencia de polaridad y poder determinar cuáles son las más activas.

3. EXTRACTO METANÓLICO

Fraccionamiento del extracto.

En el fraccionamiento del extracto metanólico se obtuvieron 4 fracciones, las cuales fueron ordenadas de acuerdo al eluyente de separación. En la **tabla 22** se observa el peso de las muestras.

El rendimiento de las fracciones obtenidas en la separación del extracto metanólico fueron diferentes con respecto a su polaridad, es decir las fracciones 1 y 2 (de menor polaridad) fueron las que presentaron el menor rendimiento y las fracciones 3 y 4 (de mayor polaridad) fueron las más abundantes. De esta forma, podemos inferir que la constitución del extracto es principalmente de compuestos de mayor polaridad.

Fracción	Peso (g)
1	1.22
2	1
3	10.4
4	8.63

Tabla 22. Fracciones y pesos obtenidos del extracto metanólico.

Perfil cromatográfico de las fracciones.

La cromatografía en capa fina de las cuatro fracciones junto con los flavonoides estándares (quercitina y rutina) se muestran en la **figura 14**.

El mejor sistema de elución en el que se observaron mayor número de bandas en las fracciones 1 y 2 fue AcOEt (**Figura 14 a**), mostrando ser muy similares en el número de componentes con ligeras diferencias en la intensidad de las bandas. Para las fracciones 3 y 4 el sistema de elución utilizado fue AcOEt: MeOH (7:3). Ambas placas fueron reveladas con RPN (Revelador de Productos Naturales: 2-aminoetil difenilborato) y se observaron bajo luz UV a $\lambda=365$ nm. Ambas placas presentaron nuevas bandas, de color amarillo fluorescente (**Figura 14 b y c, flechas blancas**), que no se observaron bajo luz ultravioleta ($\lambda=365$ nm) antes de ser reveladas. Ninguna de estas bandas fluorescentes que se presentaron al ser reveladas las placas, mostraron el mismo patrón de referencia que la quercitina y la rutina.

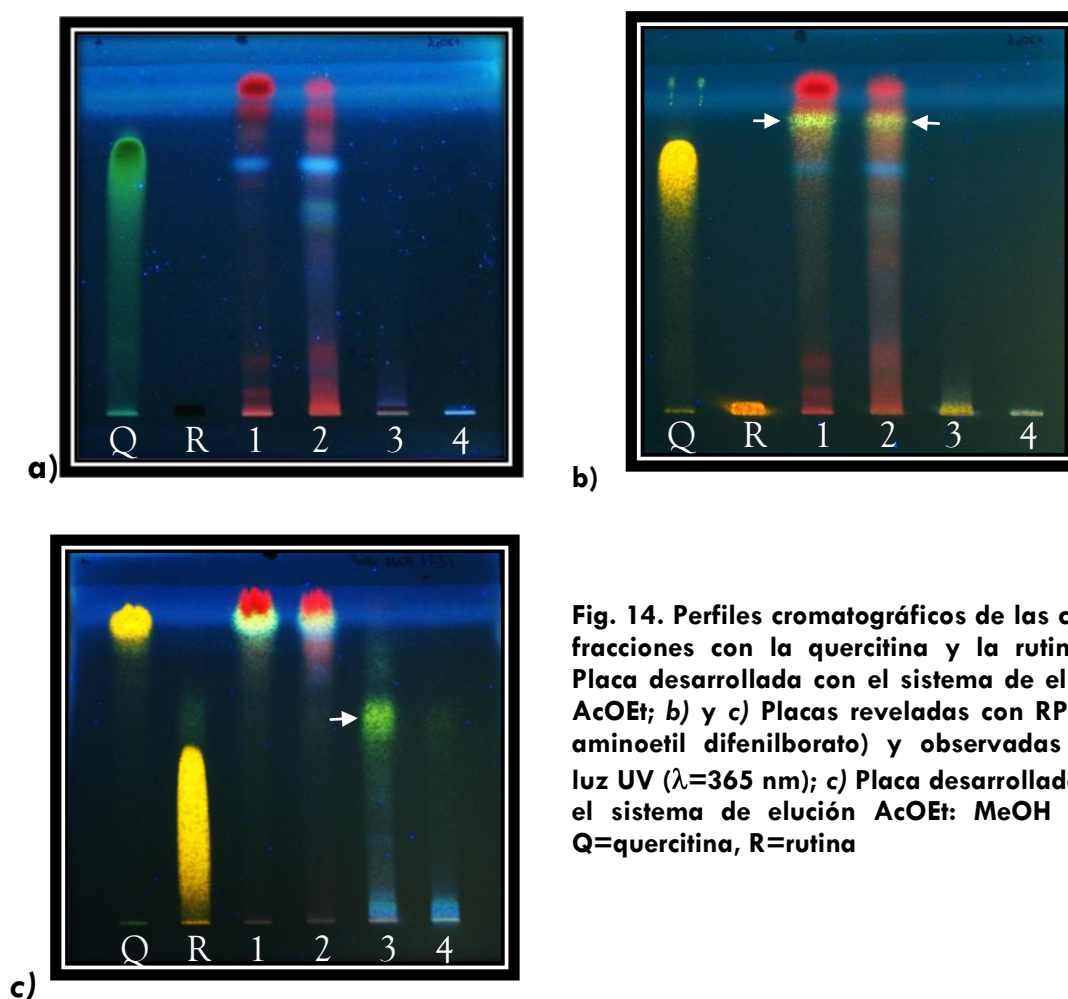


Fig. 14. Perfiles cromatográficos de las cuatro fracciones con la quercitina y la rutina. **a)** Placa desarrollada con el sistema de elución AcOEt; **b)** y **c)** Placas reveladas con RPN (2-aminoetil difenilborato) y observadas bajo luz UV ($\lambda=365$ nm); **c)** Placa desarrollada con el sistema de elución AcOEt: MeOH (7:3). Q=quercitina, R=rutina

La diferencia de polaridad entre las fracciones es importante. Se observó en la fracción 1 los compuestos menos polares y en la fracción 4 los más polares. En el perfil cromatográfico de la **figura 14** se observa una similitud entre las fracciones 1 y 2 y, en la fracción 3, al ser revelada se observó la presencia de un compuesto (flecha blanca) que no se encuentra en las demás fracciones. En la fracción 4 no se observó una distribución de bandas debido a que el sistema de elución probado no era lo suficientemente polar. Se aplicaron dos flavonoides estándares, la quercitina y la rutina, para evidenciar si en alguna de las fracciones se encontraba presente alguno de estos flavonoides pero no fue así.

Detección de grupos de metabolitos secundarios.

En todas las fracciones (**Tabla 23**) se muestra la presencia de flavonoides y terpenos-esteroides. En la fracción 3 y 4 se observó una intensidad baja para este último grupo. Para el caso de los glucósidos la reacción fue negativa en las fracciones 1 y 2, pero en las fracciones 3 y 4 hubo presencia de estos compuestos.

Tabla 23. Resultados de las pruebas realizadas en las fracciones del extracto metanólico para detección de flavonoides, glucósidos, terpenos y esteroides.

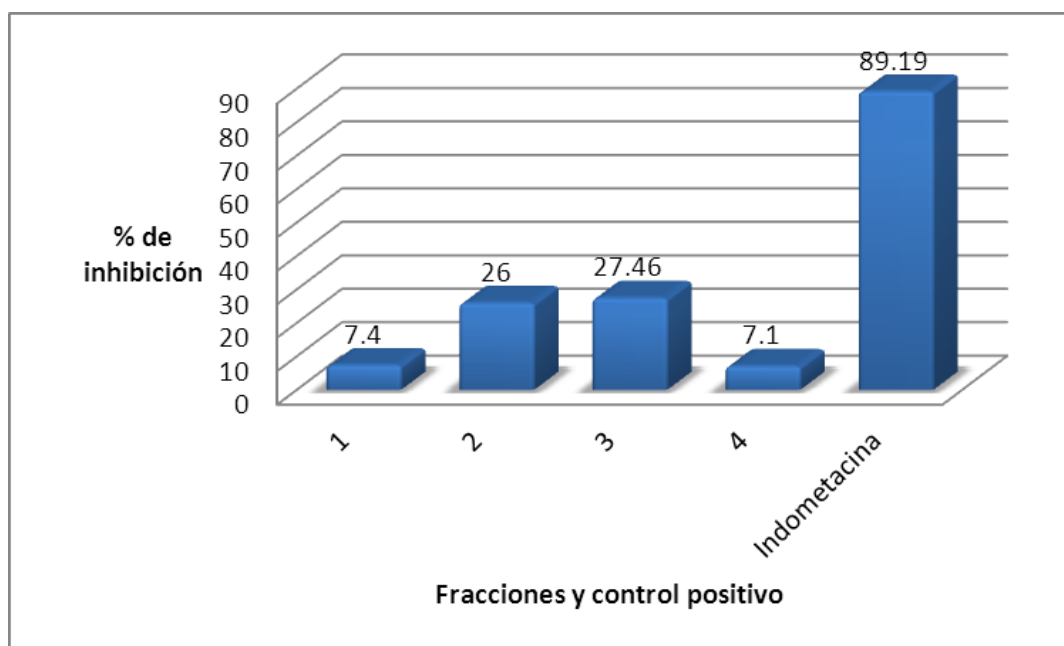
	Fracciones			
	1	2	3	4
Flavonoides	+++ Morado-rosado	++ Morado-rosado	+++ Anaranjado	++ Anaranjado
Terpenos-esteroides	+++ Azul oscuro	++ Verde	+ Amarillo	+ Anaranjado claro
Glucósidos	-	-	+++	++

Nota: El signo + representa la intensidad de la reacción: +25%, ++50%, +++75%, ++++100%; (-) cantidad de compuesto insuficiente para su caracterización.

Actividad biológica.

En la **gráfica 4** se muestra el resultado de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA, expresado como porcentaje de inhibición de la inflamación a una concentración de 1 mg extracto/oreja. Las fracciones 1 y 4 mostraron una actividad baja y las dos presentaron un porcentaje de inhibición muy parecida del 7.40% y 7.10% respectivamente. En el caso de las fracciones 2 y 3 el porcentaje de inhibición fue de 26% y 27.46% respectivamente. Esto quiere decir, que

la actividad antiinflamatoria disminuyó al ser fraccionado el extracto el cual presentó un porcentaje de inhibición del 75.16%.



Gráfica 4. Efecto de las fracciones del extracto metanólico sobre la inflamación inducida con TPA en oreja de ratón.

Los resultados de la actividad antioxidante (**Tabla 24**) mostraron que las fracciones con actividad alta, con respecto al α -tocoferol, son: la 2 y la 3 con un porcentaje de reducción del 95.04% y 93.18%, respectivamente, a una concentración de 1000 ppm; es importante notar que la fracción 3 presentó, a 100 ppm, una actividad del 78.40%. La fracción 4, obtuvo un 73.94% de reducción a 1000 ppm y la fracción 1 tuvo un 49.69% de reducción a una concentración de 1000 ppm. Para el caso de las fracciones 1, 2 y 4 a 100 ppm, el porcentaje de inhibición fue baja en comparación con el α -tocoferol a la misma concentración.

Aunque se observó similitud en el perfil cromatográfico en las fracciones 1 y 2, no se detectó esta misma en los resultados de la actividad antiinflamatoria, la fracción 1 al igual que la fracción 4 mostraron los porcentajes más bajos, mientras que la fracción 2 y 3 mostraron un mayor porcentaje de inhibición. En este caso no se encontró un patrón que relacionara la actividad biológica (actividad antiinflamatoria) con la presencia de grupos de metabolitos secundarios. La fracción más activa (3) presentó flavonoides, terpenos-esteroides y glucósidos, sin embargo, estos mismos grupos los presentó la fracción 4 que tuvo una actividad menor. Es necesario puntualizar que aunque existieron

diferencias entre las fracciones, la actividad antiinflamatoria no fue mayor al 27.46%, lo que nos lleva a suponer que los compuestos con esta actividad no se encontraron en este extracto. Sin embargo, encontramos una actividad antioxidante (**Tabla 24**) importante en las fracciones 2, 3 y 4 del mismo extracto, en este caso se puede atribuir esta actividad a la presencia de glucósidos que tengan como agluconas flavonoides, esto incrementaría la concentración de flavonoides dentro de las fracciones. Para corroborar esta hipótesis se tendría que realizar una hidrólisis de la fracción para romper el enlace glucosídico, liberar las agluconas y volver a realizar el perfil cromatográfico así como también la detección de metabolitos secundarios.

Tabla 24. Actividad antioxidante por el método de captura de radicales libres mediante DPPH en las fracciones del extracto metanólico.

Muestra	Concentración (ppm)	D.O. 515 nm	% de reducción del DPPH
DPPH (100μM)	-	0.807	-
Fracción 1	100	0.749	7.19
	1000	0.406	49.69
Fracción 2	100	0.533	33.91
	1000	0.040	95.04
Fracción 3	100	0.174	78.40
	1000	0.055	93.18
Fracción 4	100	0.492	39.03
	1000	0.071	73.94
α-tocoferol	100	0.073	90.91
	1000	0.071	91.16

Los resultados de la actividad citotóxica mostraron una relación de mortandad en *A. salina* con respecto a las concentraciones; es decir, que en la concentración de 1000 ppm, las fracciones 1, 2 y 4 presentaron un porcentaje de mortandad del 74%, 64% y 99%, respectivamente, esto es, a mayor concentración de la fracción aplicada mayor mortandad; mientras que la fracción 3 presentó un porcentaje de mortandad del 28%. En el resto de las concentraciones empleadas, la actividad se hizo evidente por debajo del 50%; de esta forma, a 100 ppm se obtuvo un porcentaje de mortandad entre 8% y 34% y para 10 ppm se obtuvo entre 2% y 26%.

Es interesante observar que este patrón es contrario al encontrado en la actividad antiinflamatoria, lo que indica que los compuestos que le confieren citotoxicidad en *A. salina* son diferentes a los responsables de la actividad antiinflamatoria y aunque se había mencionado que en este extracto no se encontraban compuestos con esta última actividad biológica, podemos concluir que sí.

El estudio químico y biológico realizado a los extractos de hoja de *Siparuna andina* permitió evaluar las propiedades medicinales que se le atribuyen y demostrar que esta especie presenta propiedades farmacológicas que validan su uso tradicional; de esta forma, en el presente trabajo se evidenció en forma novedosa el potencial antioxidante (extracto metanólico), antiinflamatorio (extracto hexánico) y citotóxico, lo cual podría ser de gran importancia en la búsqueda de sustancias activas contra patologías causadas por radicales libres y/o procesos inflamatorios; así como de procesos citotóxicos en líneas celulares. Los resultados obtenidos en el presente estudio hacen ver a estos extractos como fuente de futuras investigaciones que amplíen la evidencia de los compuestos activos, así como de las actividades biológicas empleadas a fin de vislumbrar posibles aplicaciones.

CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvieron tres extractos de diferente polaridad: el extracto hexánico, el extracto de AcOEt y el extracto metanólico, en este último se obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento (7.4%), esto se debe a que las hojas presentaron la mayor cantidad de compuestos polares.
- ✓ Los metabolitos secundarios detectados en los tres extractos fueron los terpenos-esteroides y flavonoides; además, en el extracto metanólico, se observó la presencia de glucósidos, esto puede deberse a que este tipo de compuestos, en su mayoría, para esta especie, son polares. Por el contrario, las pruebas no detectaron la presencia de alcaloides en ninguno de los extractos.
- ✓ Los perfiles cromatográficos de los tres extractos evidenciaron que aquellos de mayor polaridad presentaron un elevado número de componentes.
- ✓ El extracto con mayor actividad antiinflamatoria fue el de AcOEt con 78.32% de inhibición, el extracto MeOH y Hex presentaron el 75.16% y 56.38% de inhibición respectivamente. Esto puede deberse a la presencia y/o interacción (sinergismo o antagonismo) entre los compuestos detectados.
- ✓ La mayor actividad citotóxica en *A. salina* se presentó en el extracto Hex con una mortandad del 54% a 1000 ppm, el extracto de AcOEt y MeOH mostraron una mortandad del 40% a la misma concentración. Esto puede deberse a la interacción entre los compuestos detectados en cada extracto.
- ✓ De las 42 fracciones finales obtenidas por cromatografía en columna del extracto hexánico, solo 6 se tomaron para ser evaluadas debido a que mostraron mayor cantidad de muestra. Estas fueron: F33, F35, F36, F37, F40 y F41.
- ✓ Las seis fracciones seleccionadas confirmaron una alta intensidad en los terpenos-esteroides y una baja intensidad en los flavonoides, excepto en las fracciones F40 y F41 que mostraron una intensidad del 100% en este último grupo.
- ✓ En cuanto al análisis densitométrico del perfil cromatográfico de las seis fracciones, se encontró que la longitud máxima de absorción fue a los 550 nm, en la cual se observó mayor presencia de manchas.

- ✓ Las seis fracciones se consideraron como buenos candidatos para un estudio fitoquímico enfocado al aislamiento de compuestos antiinflamatorios, debido a que mostraron desde un 70% a un 96% de inhibición, inclusive en tres de estas fracciones [F37(96.07%), F33(93.61%) y F35(89.68%)] se observó un porcentaje de inhibición por arriba del control positivo (indometacina, 89.19%).
- ✓ En el presente estudio, las seis fracciones mostraron un porcentaje de reducción del DPPH bajo, que va desde el 29.37% hasta el 39.81%, en comparación con el control positivo (α -tocoferol, 91.16%).
- ✓ Podemos inferir que existe una relación entre la intensidad de los flavonoides y la actividad antioxidante; esto es, las fracciones que mostraron la mayor actividad antioxidante [F40(38.04) y F41(39.81)] son la que mostraron mayor intensidad y presencia en los flavonoides.
- ✓ La actividad citotóxica, en la F30 (cristales) a 10 ppm, presentó un porcentaje de mortandad del 70%.
- ✓ Las cuatro fracciones seleccionadas (B, C, D y E) del extracto de AcOEt presentaron compuestos similares en los perfiles cromatográficos, lo cual indicó que el fraccionamiento no fue eficiente.
- ✓ De las pruebas de detección de metabolitos secundarios, se concluye que se obtuvo una mayor intensidad para terpenos-esteroides y la intensidad de los flavonoides varió de una fracción a otra.
- ✓ Los resultados obtenidos en la actividad antiinflamatoria fueron similares con la intensidad los metabolitos secundarios presentes; es decir, las fracciones que mostraron el mayor porcentaje de inhibición [D(86.64%) y C(82.49%)] también presentaron la mayor intensidad en los terpenos-esteroides, de esta forma podemos inferir que estos compuestos le proporcionan esta actividad.
- ✓ En cuanto a la actividad antioxidante, las cuatro fracciones mostraron una actividad similar que va del 70.23 % al 79.43% de reducción del DPPH.
- ✓ Las cuatro fracciones obtenidas de la separación del extracto metanólico presentaron abundante cantidad de muestra para ser evaluadas, con esto se evidencio la presencia de abundantes compuestos polares en las hojas de esta especie.

- ✓ En el perfil cromatográfico de las cuatro fracciones se observó la diversidad de compuestos; es decir, las fracciones 1 y 2 mostraron compuestos de baja polaridad muy similares, por el contrario, las fracciones 3 y 4 presentaron compuestos de mayor polaridad.
- ✓ En el perfil cromatográfico no se detectaron, en ninguna de las fracciones, alguno de los 2 flavonoides estándares utilizados.
- ✓ Las cuatro fracciones evidenciaron la presencia de: terpenos-esteroides, en donde la fracción 1 mostró mayor intensidad, en la 3 y 4 disminuyó la intensidad y en la 2 la intensidad permaneció igual; en los flavonoides la intensidad aumentó en todas las fracciones; solo las fracciones 3 y 4 presentaron glucósidos, así como el aumento en la intensidad de éstos.
- ✓ La actividad antiinflamatoria mostró un porcentaje de inhibición del 7.10% al 27.46%. Esto quiere decir, que la actividad disminuyó cuando fue fraccionado el extracto (75.16%). No se encontró un patrón en ninguna de las fracciones que relacione la presencia de metabolitos secundarios con la actividad antiinflamatoria.
- ✓ Las fracciones presentaron compuestos con una alta actividad antioxidante que van del 49.69% hasta el 95.04% de reducción del DPPH, dos de estas fracciones [la 3(93.18%) y la 2(95.04%)] mostraron una actividad antioxidante por arriba del control positivo (α -tocoferol, 91.16%). La relación entre los metabolitos secundarios presentes y la actividad antioxidante sugiere que son los flavonoides y los glucósidos los responsables de dicha actividad, siendo la fracción 3 una de las más activas y una de las fracciones donde se detectaron glucósidos.
- ✓ La actividad citotóxica se relaciona con los grupos de metabolitos secundarios detectados en las fracciones, terpenos-esteroides y flavonoides, se presentaron compuestos con una alta actividad citotóxica, ya que tres (fracciones 1,2 y 4) de las cuatro fracciones presentaron altos porcentajes de mortandad (74%, 64% y 99% respectivamente).

SUGERENCIAS

El presente trabajo contribuye al conocimiento de los constituyentes químicos y de la actividad biológica de *Siparuna andina*. Debido a que es una especie que cuenta con diversas sinonimias, el uso de esta especie cambia de una a otra región y la gente de cada localidad ha encontrado un uso medicinal para diversos padecimientos, por lo consiguiente, se desprenden las siguientes sugerencias:

- * Debido a que no se tienen reportes documentados del uso medicinal de *S. andina* en nuestro país, es necesario realizar estudios etnobotánicos; así como ampliar los estudios químicos, farmacológicos, ecológicos y biológicos de esta especie.
- * Se recomienda que se continúe con la separación, a fin de aislar e identificar los compuestos activos, mediante técnicas de separación con mayor resolución como la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).
- * Si se pretende estudiar los compuestos activos con potencial antioxidante en esta especie, se recomienda partir de la preparación del extracto metanólico; por el contrario, si se pretende estudiar los compuestos activos con potencial antiinflamatorio, se recomienda partir del extracto hexánico.
- * El perfil cromatográfico de los flavonoides en cada una de las fracciones analizadas, sugiere la importancia de aislar y caracterizar dichos compuestos a fin de establecer su participación en la actividad antioxidante de las hojas de esta especie.
- * Debido a los resultados de los extractos y fracciones en la actividad citotóxica, se sugiere realizar estudios más detallados sobre líneas celulares.
- * Es conveniente que las sustancias que se aíslen sean evaluadas en mezclas tratando de demostrar un posible efecto sinérgico o antagónico.

BIBLIOGRAFÍA

- * **Agostini L., Morón M., Ramón A. y Ayala A.** 2004. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(1): 1-5.
- * **Aguirre MC., Delporte C., Backhouse N., Erazo S. y Negrete S.** 2003. Actividad antiinflamatoria tópica y antioxidante de las fracciones hexano y diclorometano de *Ugni molinae* Turcz. ("Murtilla", "Murta"). *Congreso Internacional Farmacéutico*.
- * **Anónimo.** 1995. La herbolaria y sus potencialidades. *Investigación y Desarrollo* 3: 8.
- * **Antonio TM.** 1983. Systematics and reproductive biology of *Siparuna* (Monimiaceae) in Panama. *The University of Oklahoma*. 127 p.
- * **Antonio TM., Waller GR. and Mussinan CJ.** 1984. Composition of essential oil from the leaves of *Siparuna guianensis* (Monimiaceae). *Chemistry and Industry* 16: 1187-1188.
- * **Aranda F. (ed).** 1996. Plantas del mundo a México. *Guía México Desconocido: Plantas que curan* 29: 18-69.
- * **Arnaz PC.** 2002. Análisis químico de los extractos de *Tagetes lucida* (Compositae). Distribución en la planta de compuestos fototóxicos. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Ciencias. UNAM. 32 p.
- * **Azcón-Bieto J. y Talón M.** 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. *Interamericana Mc Graw-Hill*. 555 p.
- * **Balunas MJ. and Kinghorn AD.** 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78: 431-441.
- * **Barbosa E., Calzada F. and Campos R.** 2007. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 552-554.
- * **Beyra A., León M., Iglesias E., Ferrándiz D., Herrera R., Volpato G., Godínez D., Guimaraes M. y Álvarez R.** 2004. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(2): 185-204.
- * **Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. and Gontier E.** 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.

- * **Bravo-Hollis H.** 1978. Las cactáceas de México. Vol. 1. *Universidad Nacional Autónoma de México*. 743 p.
- * **Braz-Filho R., Gabriel S., Gomes C., Gottlieb O., Bichara MD. and Maia J.** 1976. Oxoaporphine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna guianensis*. *Phytochemistry* 15: 1187-1188.
- * **Briskin DP.** 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology* 124: 507-514.
- * **Bye RAJr.** 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany* 40(1): 103-124.
- * **Carretero, ME.** 2000. Compuestos fenólicos: Sikinatos (II). *Panorama Actual del Medicamento* 24(233): 432-435.
- * **Chiu YC., Dobberstein RH., Fong HS. and Farnsworth NR.** 1982. Oxoaporphine alkaloids from *Siparuna gilgiana*. *Journal of Natural Products* 45(2): 229-230.
- * **Ciccio JF. and Gómez-Laurito J.** 2002. Volatile constituents of the leaves of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Turrialba, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 50(3/4): 963-967.
- * **Claros B., da Silva A., Vasconcellos M., de Brito AP. and Leitão G.** 2000. Chemical constituents of two *Mollinedia* species. *Phytochemistry* 55:859-862.
- * **Cole MD.** 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. *Biochemical Systematics and Ecology* 22(8):837-856.
- * **Cordell G.** 1995. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40: 1585-1612.
- * **Cottele N., Bernier JL., Catteau JP., Pommery P., Wallet JC. and Gaydou EM.** 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology & Medicine* 20: 35-43.
- * **Cronquist A.** 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York. 1262 p.
- * **Domínguez M., Nieto A., Marin JC., Keck AS., Jeffery E. and Céspedes CL.** 2005. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5889-5895.
- * **El-Seedi H., Ghia F. and Torsell K.** 1994. Candinane sesquiterpenes from *Siparuna macrotepala*. *Phytochemistry* 6: 1495-1497.

- * **Fischer DC., Gonçalves MI., Oliveira F. and Alvarenga MA.** 1999. Constituents from *Siparuna apiosyce*. *Fitoterapia* 70: 322-323.
- * **Fischer DC, Limberger RP, Henriques AT and Moreno PR.** 2005. Essential oils from fruits and leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from Southeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research* 17: 101-102.
- * **García DE.** 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes* 27(1): 1-12.
- * **Gerard R., MacLean D. and Antonio T.** 1986. Examination of three *Siparuna* species for alkaloid content. *Phytochemistry* 25(9): 2155-2156.
- * **González J.** 2006. Siparunaceae. *Flora digital de la selva*. 4 p.
- * **Hamburger M. and Hostettmann K.** 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* (30)12: 3864-3874.
- * **Harvey A.** 1999. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 196-198.
- * **Heilborn O.** 1931. Studies on the taxonomy, geographical distribution and embryology of the genus *Siparuna* Aubl. *Svensk Botanisk Tidskrift* 25: 202-228.
- * **Herrera J.** 2001. Estudio comparado de la producción de metabolitos secundarios de *Hippocratea excelsa* Kunth (Hippocrateaceae), en condiciones *in vivo* e *in vitro*. *Tesis Maestría*. Facultad de Ciencias. UNAM.
- * **Heywood VH.** 1985. Las plantas con flores. Reverté. 332 p.
- * **Huerta C.** 1997. La Herbolaria: mito o realidad. *Biodiversitas*. Año 3. No. 12. CONABIO.
- * **Jenett-Siems K., Kraft C., Siems K., Jakupovic J., Solis P., Gupta M. and Bienzle U.** 2003. Sipaucins A-C, sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*. *Phytochemistry* 63: 377-381.
- * **Jenett-Siems K., Mockenhaupt F., Bienzle U., Gupta M. and Eich E.** 1999. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Tropical Medicine and International Health* 4(9): 611-615.
- * **Jenett-Siems K., Siems K., Jakupovic J., Solis P., Gupta M., Mockenhaupt F., Bienzle U. and Eich E.** 2000. Sipandinolide: A butenolide including a novel type of Carbon Skeleton from *Siparuna andina*. *Planta Medica* 66: 384-385.
- * **Julsing MK., Koulman A., Woerdenbag H., Quax WJ. and Kayser O.** 2006. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering* 23: 265-279.

- * **Kato-Simas N., Valverde-Soares SS., Machado-Brito TB. and Leitão GG.** 1996. Estudo fitoquímico das espécies *Siparuna arianeae* e *Siparuna apiosyce*. XVIII RESEM eV Jornada de Iniciação Científica em Biodiversidade. Book of Abstracts. 139 p.
- * **Lagarto Parra A., Silva R., Guerra I. and Iglesias L.** 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5): 395-400.
- * **Laurance WF.** 1999. Reflections on the tropical deforestation crisis. *Biological Conservation* 91:109-117.
- * **Leitão G., Simas N., Soares S., De Brito AP., Claros B., Brito T. and Delle Monache F.** 1999. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 87-102.
- * **Leitão G., Soares S., Brito T. and Delle Monache F.** 2000. Kaempferol glycosides from *Siparuna apiosyce*. *Phytochemistry* 55: 679-682.
- * **Linares E. and Bye RAJr.** 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology* 19: 153-183.
- * **Lopes WB., Moroni FT., Brandeburgo MIH. and Hamaguchi A.** 2002. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. *Revista Eletrônica Horizonte Científico* 1: 1-11.
- * **López JA., Aly Y. and Schiff PL.** 1988. Alkaloids of *Siparuna pauciflora*. *Planta Medica* 54(6): 552-553.
- * **López JA., Laurito JG., Lin FT., Duah FK., Sharaf M., Aly Y., Won LK. and Schiff Jr. PL.** 1990. Alkaloids of *Siparuna tonduziana*. *Planta Medica* 56(5): 492.
- * **López JA., Laurito JG., Lin FT., Sharaf M., Wong LK. and Schiff Jr. PL.** 1993. Alkaloids of *Siparuna Griseo-flavescens*. *Planta Medica* 59(1):100.
- * **Lorence DH.** 1983. Systematics of the genus *Siparuna* (Monimiaceae, Siparunoideae) in Mexico, with descriptions of two new species. *Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie Botánica* 54: 159-172.
- * **Lovkova M., Buzuk G., Sokolova S. and Klimenteva N.** 2001. Chemical Features of Medicinal Plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 37(3): 229-237.
- * **Luximon-Ramma A., Bahorun T., Soobrattee MA. and Aruoma OI.** 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 5042-5047.

- * **Machado SM., Aduato-Ribeiro VAF., Militão JSLT., de Morais SM. and Machado MI.** 1998. Seasonal Variation of (E)-Nerolidol in *Siparuna guianensis* Aublet and ¹³C-NMR Spectral Assignments of (E)- and (Z)-Nerolidol. *Journal of Essential Oil Research* 10:708-710.
- * **Maldonado Y.** 2004. Cuantificación de caladenos e isocaladenos anti-inflamatorios de árnica (*Heterotheca inuloides* Cass) en plantas sometidas a fertilización y cortes sucesivos. *Tesis de Licenciatura*. Escuela de Químico-farmacobiología. UMSNH 142 p.
- * **Manjarrez A. and Mendoza V.** 1967. The volatile oil of the fruits of *Siparuna nicaraguensis* Heml. *Perfumery and Essential Oil Record* 58: 23-24.
- * **McLaughlin JL., Rogers LL. and Anderson JE.** 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* 32: 513-524.
- * **Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE. and McLaughlin JL.** 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45(5): 31-4.
- * **Mitscher LA, Leu RP, Bathala MS, Wu WN. and Beal JL.** 1971. Antibiotic agents from higher plants. I. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia* 35: 157-166.
- * **Montoro P., Braca A., Pizza C. and De Tommasi N.** 2005. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry* 92: 349-355.
- * **Mosquera O., Niño J., Correa Y. y Buitrago DC.** 2005. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica* 27: 231-234.
- * **Nelson AC. and Kursar TA.** 1999. Interactions among plant defense compounds: a method for analysis. *Chemoecology* 9(2): 81-92.
- * **Nugroho LH. and Verpoorte R.** 2002. Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 105-125.
- * **Paniagua-Pérez R., Madrigal-Bujaidar E, Molina-Jasso D, Reyes-Cadena S, Sánchez-Chapul L, Pérez-Gallaga J, Flores-Mondragon G, Perea-Paz JM, Hernández N., Velazco OF. y Uribe-Cabrera F.** 2006. Estudio del efecto antimutagenico, antioxidante e inmunoestimulante de pteropodina, componente derivado de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) *in vivo*. 2° Congreso Nacional de Química Médica. 8 p.

- * **Payá M., Ferrándiz ML., Erradi F., Terencio MC., Kijjoa A., Pinto MM. and Alcaraz MJ.** 1996. Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. *European Journal of Pharmacology* 312: 97-105.
- * **Pérez-Amador MC. y Romo de Vivar A.** 2006. Fitoquímica. En: Waizel Bucay J. (ed). *Las plantas medicinales y las ciencias: Una visión multidisciplinaria.* Instituto Politécnico Nacional. 587 p.
- * **Pérez-Castorena AL., Arciniegas A., Ramírez-Apan MT., Villaseñor JL. and Romo de Vivar A.** 2002. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of the Plastoquinone derivatives isolated from *Roldana barba-johannis*. *Planta Medica* 68: 645-647.
- * **Pérez M.** 1994. Plantas medicinales, etnobotánica y fitoquímica: importancia de la investigación interdisciplinaria. *Folium* 7: 2-3.
- * **Philipson WR.** 1993. Monimiaceae. In: Kubitzki K., Rohwer JG. and Bittrich V. (Eds). *The Families and Genera of Vascular Plants. Vol. II. Flowering Plants-Dicotyledons.* Springer-Verlag. pp: 426-437.
- * **Pieters L. and Vlietinck AJ.** 2005. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of ethnopharmacology* 100: 57-60.
- * **Pietta PG.** 2000. Flavonoids as antioxidant. *Journal of Natural Products* 63:1035-1049.
- * **Rates SMK.** 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- * **Rzedowski J.** 1978. La vegetación de México. *Limusa.* 432 p.
- * **Sánchez Marroquín A.** 1945. Introducción a la fisiología y bioquímica vegetales. pp: 70-73.
- * **Schijlen E., Ric de Vos C., Van Tunen A. and Bovy A.** 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65: 2631-2648.
- * **Schmeda-Hirschmann G. and Yesilada E.** 2005. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 61-66.
- * **Shi J., Gong J., Liu J., Wu X. and Zhang Y.** 2009. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *Food Science and Technology* 42: 477-482.
- * **Silva MM, Santos MR, Carogo G, Rocha R, Justino C. and Mira L.** 2002. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radical Research* 36(11): 1219-1227.

- * **Ślusarczyk S., Hajnos M., Skalicka-Woźniak K. and Matkowski A.** 2009. Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chemistry* 113: 134-138.
- * **Soberón JM. y Llorente JB.** 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 44: 3-17.
- * **Taylor J., Rabe T., McGaw L., Jäger A. and Van Staden J.** 2001. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regulatio.* 34: 23-37.
- * **Taylor L. and Grotewold E.** 2006. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 317-323.
- * **Toledo VM.** 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo XIV* (81):17-30.
- * **Valdés R. y Balbín MI.** 2000. Curso de fisiología y bioquímica vegetal. UNAH. 89 p.
- * **Valverde-Soares SS.** 1997. Estudo dos Constituintes Químicos de *Siparuna apiosyce* De Candolle. Tese de Mestrado (Msc. These) NPPN. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- * **Vásquez A., Cala M., Miranda I., Tafurt G., Martínez J. and Stashenko E.** 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montana ovalifolia*. *Scientia et Technica* 13(33): 205-207.
- * **Vega C.** 2002. Análisis de los extractos orgánicos de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis* (Phyllonomaceae) una especie empleada en la medicina tradicional. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 p.
- * **Venereo J.** 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista cubana de medicina militar* 31(2): 126-33.
- * **Vila R., Iglesias J., Canigual S., Santana Al., Solis PN. and Gupta MP.** 2002. Chemical composition and biological activity of the leaf oil of *Siparuna thecaphora* (Poepp. et Endl.) A.DC. *Journal of Essential Oil Research* 14(1): 66-67.
- * **Villatoro RA., Luna L. y González AR.** 2006. El cuaulote, recurso herbolario de Chiapas. *Ciencias: Revista de difusión de la facultad de ciencias de la UNAM* 83: 18-26.

- * **Williamson EM.** 2001. Sinergy: Interaction within Herbal Medicines. *The European Phytojournal*. Disponible en: www.escop.com/epj2pdfs/Williamson.pdf.
- * **Williamson EM., Okpako DT. and Evans FJ.** 1996. *Pharmacological Methods in Phytotherapy. Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*. John Wiley & Sons Ltd. 228 p.
- * **Zoghbi MDGB., Andrade EHA., Santos AS., Silva MHL. and Maia JGS.** 1998. Essential Oil of *Siparuna guianensis* Aubl. *Journal of Essential Oil Research* 10:543-546.
- * **Zuluaga G.** 2005. Conservación de la diversidad biológica y cultural en el Piedemonte Amazónico Colombiano: La herencia del Dr. Schultes. *Ethnobotany Research & Applications* 3:167-177.
- * **Página de internet:**
<http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/?spnumber=3578#spimages>

APÉNDICES

Apéndice 1

Pruebas para la detección de grupos de metabolitos secundarios.

Glucósidos: reactivo de Mölish

α -naftol al 5% en etanol

Ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4

Se agregó a la muestra dos gotas de α -naftol al 5% en etanol, posteriormente se agregó 1 ml de H_2SO_4 concentrado resbalando por las paredes del tubo de ensaye formándose dos fases. La presencia de un anillo violeta en la interfase indica la presencia de glucósidos, considerando así la prueba como positiva.

Terpenos y esteroides: reactivo de Liebermann-Burchard

Mezclar volúmenes iguales de anhídrido acético y cloroformo, se enfría la mezcla en una base de hielo, una vez fría la mezcla se agregan tantas gotas de ácido sulfúrico concentrado como mililitros de cloroformo haya contenidos en la mezcla.

Agregar 1 ml del reactivo a 1 ml del extracto. Se considera positiva la prueba si se observa un cambio de coloración al azul-verdoso, rosa, rojo, anaranjado o violeta.

Flavonoides: Zn/HCl

Limadura de zinc (Zn)

Ácido clorhídrico concentrado (HCl)

Se agregó a la muestra un pequeño trozo de limadura de zinc y dos gotas de HCl resbalando por las paredes; una coloración naranja la prueba se considera positiva.

Alcaloides: reactivo Dragendorff

Solución A: se disuelven 8 g de $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ en 20 ml de NH_4OH al 3%.

Solución B: se disuelven 27.2 g de KI en 100 ml de agua destilada.

Una vez que se han preparado ambas soluciones, se mezclan.

Se agregó a la muestra una gota de ácido clorhídrico concentrado y dos gotas del reactivo de Dragendorff, la prueba se consideró positiva si se presentaba un precipitado de color anaranjado-marrón.

Apéndice 2

Pruebas biológicas.

Actividad antiinflamatoria.

En el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, se realizó la prueba antiinflamatoria siguiendo el modelo de edema inducido por el acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón a todos los extractos y en algunas fracciones obtenidas.

Preparación de la muestra. Se pesaron 50 mg de cada extracto o fracción en tubos Eppendorff®.

Bioensayo. Se emplearon ratones machos de la cepa CD1 (25-30 g). Los animales se colocaron en cajas de acrílico transparente con un fotoperiodo luz/oscuridad 12hrs/12hrs, temperatura de 24-26 °C con libre acceso al agua y alimento.

Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (3.5 mg/kg vía intraperitoneal), en la oreja derecha se aplicaron 10 µL de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/ml). Diez minutos después, en la misma oreja se aplicaron 20 µL de la solución del compuesto (1 mg/20 µL). La oreja izquierda recibió solamente los vehículos (10 µL de etanol y 20 µL del vehículo). Cuatro horas después los animales se anestesiaron con éter, se sacrificaron por dislocación cervical y se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. La diferencia en peso entre la muestra de la oreja derecha y la izquierda, representa el edema para cada ratón. El porcentaje de inhibición del edema se calculó con la siguiente fórmula:

% de inhibición = $[(C - E)/C] * 100$ en donde:

C = edema del grupo tratado con TPA

E = edema del grupo tratado con TPA y extracto

Actividad Antioxidante.

En el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, se realizaron las pruebas de actividad antioxidante mediante el método de captura de radicales libres que utiliza el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) en las fracciones del extracto hexánico, acetato de etilo y metanólico.

Preparación de la muestra. Se pesaron 50 mg de cada fracción obtenida del extracto metanólico en tubos Eppendorff®.

Bioensayo. Cada fracción fue analizada con DPPH en microplacas de 96 pozos. Cada fracción (50 μ l) fue adicionada a 150 μ l de DPPH (100 μ M, concentración final) en etanol, se incubaron a 37°C por 30 minutos, y posteriormente se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas ELx808. Las mediciones se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición de cada fracción se determinó por comparación con una solución etanólica de DPPH (100 μ M) en blanco. Los valores de IC50 son la concentración de la muestra necesaria para recoger el 50% de los radicales libres (Cottele *et al.*, 1996; Pérez-Castorena *et al.*, 2002; Domínguez *et al.*, 2005).

Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* L.

Preparación de las muestras. Las muestras fueron preparadas disolviendo 60 mg, de cada extracto crudo y de las fracciones, en 60 ml de agua salina, se probaron tres concentraciones: 10 ppm, 100 ppm y 1000 ppm. Para el caso de los cristales, se pesaron 6 mg y se disolvieron en 6 ml de cloroformo probándose las siguientes concentraciones: 0.1 ppm, 1 ppm y 10 ppm. Se realizaron 5 repeticiones por cada concentración más un grupo control.

*Eclosión de las larvas de *Artemia salina* L.* 40 mg de huevecillos de *A. salina* se colocaron en un frasco ámbar que contenía 200 ml de agua de mar artificial previamente oxigenada por 1 hora. El frasco con los huevecillos se colocó en una incubadora a una temperatura de 25 ± 2 °C. Después de 48 horas se emplearon las larvas para el bioensayo.

Bioensayo. A los tubos de ensaye que contenían las muestras de mediana y baja polaridad se les agregaron 10 ml de agua de mar artificial y se agitó vigorosamente para disolver la muestra. Posteriormente, se adicionaron 10 larvas a cada tubo y se adicionaron dos gotas de levadura al 1% como alimento. Los tubos se colocaron en una incubadora a 25 ± 2 °C y las larvas sobrevivientes fueron registradas después de 24 horas para hacer la correspondencia del porcentaje de mortandad.