



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

“Análisis fitoquímico de *Ipomoea murucoides*”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

GRACIELA ELIZABETH RAMOS CASTRO

DIRECTOR:

DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO



Tlalnepantla de Baz, Estado de México

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi madre Graciela Castro Pineda que gracias a sus explicaciones sembró en mí la curiosidad y pasión por comprender los fenómenos de la vida. Y por enseñarme que nunca hay que darse por vencidos ni aún vencidos.

A mi padre Miguel Ángel Ramos Rosalino por su infinito apoyo y confianza en mí, gracias por ser mi ejemplo y por su manera tan positiva de ver la vida.

A mis hermanos Ana y Miguel por ser mis compañeros y mejores amigos de toda la vida.

A gran amigo Alan que siempre me ha brindado su apoyo y amistad incondicional.

A mi Fitosister que ha sido una gran compañera y apoyo en este proyecto.

A mis amigos y compañeros de la carrera que con su compañía, aportaciones y buenos momentos hicieron de esta etapa de mi vida una de las mejores.

A B., L. y G. por ser mis grandes amigos y parte de mi familia. Todos los días me hacen sonreír.

A este fenómeno que llamamos vida que siempre trataremos de explicar de mil formas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi casa de estudios y brindarme la posibilidad de tener la mejor educación y desarrollo.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por brindarme el lugar para descubrir y estudiar la carrera de Biología. Y además de convertirse en mi segundo hogar.

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación con la basta cantidad de conocimientos y experiencias brindadas dentro de esta institución.

Al doctor Guillermo Avila Acevedo por siempre contagiar su entusiasmo por la ciencia, por su paciencia y ser el asesor de este proyecto.

A la doctora Ana María García Bores por su apoyo en todo momento y por su meticulosa revisión en este proyecto.

Al profesor Luis Barbo por siempre tener un espacio para ayudarme con mis resultados y orientarme.

Al laboratorio de Fitoquímica.

La vida de cada hombre es un camino hacía sí mismo, el esbozo de un sendero.

Herman Hesse.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|--------|
| 1.0 Resumen | 1 |
| 2.0 Introducción | 2 |
| 3 Antecedentes | |
| 3.1 Familia Convolvulacea | 4 |
| 3.2 Género <i>Ipomoea</i> | 5 |
| 3.3 <i>I. murucoides</i> Roem&Schult | 6 |
| 3.4 Estudios fitoquímicos y actividad biológica de la especie. | 7 |
| 4.0 Justificación | 11 |
| 5.0 Hipótesis | 11 |
| 6.0 Objetivos | |
| 6.1 Objetivo General | 12 |
| 6.2 Objetivos Particulares | 12 |
| 7.0 Zonas de colecta | |
| 7.1 Sabanilla (Jerécuaro) e Irámuco (Acámbaro) Guanajuato | 12 |
| 7.2 Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. | 15 |
| 8.0 Estrategia metodológica | 16 |
| 8.1 Primera Etapa | |
| 8.1.1 Recolección de material vegetal | 18 |
| 8.1.2 Determinación taxonómica del material vegetal | 18 |
| 8.2 Segunda etapa | |
| 8.2.1 Extracción | 18 |
| 8.3 Tercera Etapa | 19 |
| 8.3.1 Determinación del espectro a absorción en el UV | 19 |
| 8.3.2 Cromatografía | 20 |
| A) Cromatografía de placa fina | 21 |
| B) Cromatografía de columna abierta | 22 |

| | |
|---|----|
| C) Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM) | 22 |
| D) Cromatografía de placa preparativa | 24 |
| E) Cromatografía de líquidos de alta resolución | 24 |
| 8.3.3 Identificación de alcaloides | 25 |
| A) Prueba colorida (Reactivo de Dragendorff) | |
| B) Extracción y cuantificación de alcaloides | |
| 8.3.4 Detección y cuantificación de fenoles | 26 |
| A) Folin-Ciocalteu | 26 |
| 8.4 Cuarta etapa: Pruebas biológicas | 26 |
| A) Actividad antioxidante: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) | 27 |
| B) Evaluación de la actividad antimicrobiana | 28 |
| 9.0 Resultados y discusión | 29 |
| Primera etapa | |
| 9.1 Recolección de material vegetal y características fenológicas de los ejemplares con su ambiente | 29 |
| 9.2 Determinación taxonómica de <i>I. murucoides</i> | 32 |
| Segunda etapa | 34 |
| 9.3 Obtención y rendimiento de los extractos | 34 |
| 1) Naturaleza polar de los metabolitos secundarios | 35 |
| 2) Respuesta al estrés | 36 |
| 3) Proceso reproductivos | 38 |
| Tercera etapa | |
| 9.4 Caracterización fitoquímica | 39 |
| 9.4.1 Obtención de los espectros de absorción de los extractos. | 39 |
| 9.4.2 Separación cromatográfica | 41 |
| A) Cromatografía en placa fina | 41 |
| Extractos hexánicos | 41 |
| Extractos diclorometano | 43 |
| Extractos metanólicos | 44 |
| B) Columna abierta | 46 |
| C) Cromatografía de gases acoplada a espectro de masas (CG/EM) | 47 |

| | |
|---|----|
| Extractos hexánicos | 47 |
| Extractos diclorometano | 54 |
| D) Cromatografía preparativa de los extractos metanólicos de <i>I. murucoides</i> . | 61 |
| E) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | 62 |
| 9.4.3 Identificación y cuantificación de alcaloides | 64 |
| Prueba colorida | 64 |
| Extracción y cuantificación de alcaloides (Shamsa, 2008) | 64 |
| 9.4.4 Cuantificación de fenoles (Folin-Ciocalteu) | 65 |
| Cuarta etapa: Pruebas biológicas | 65 |
| 9.5 Actividad antioxidante: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) | 65 |
| 9.5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana | 66 |
| 10 Conclusiones | 67 |
| 11 Perspectivas | 67 |
| Anexo 1 | 68 |
| Literatura Citada | 73 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Número | Nombre | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Estudios más representativos de la caracterización fitoquímica y usos en la medicina tradicional de <i>I. murucoides</i> | 8 |
| 2 | Maceración de las plantas de <i>I. murucoides</i> de diferentes localidades | 19 |
| 3 | Diferencias fenotípicas, climáticas y estacionales de <i>I. murucoides</i> de tres localidades. | 30 |
| 4 | Determinación taxonómica de <i>I. murucoides</i> . | 33 |
| 5 | Rendimientos de los extractos hexánicos, diclorometano y metanólicos de <i>I. murucoides</i> | 34 |
| 6 | Rangos de absorción UV entre 200 y 240 nm de familias de metabolitos secundarios. | 40 |
| 7 | Fraccionamiento del extracto hexánico de <i>I. murucoides</i> procedente de Irámuco, 2012 | 46 |
| 8 | Compuestos identificados por CG/EM en los extractos hexánicos de <i>I. murucoides</i> | 47 |
| 9 | Estructura de los compuestos mayoritarios de los extractos hexánicos de <i>I. murucoides</i> | 48 |
| 10 | Compuestos identificados por CG/EM en los extractos de diclorometano de <i>I. murucoides</i> . | 54 |
| 11 | Estructura de los compuestos mayoritarios en extractos de diclorometano de <i>I. murucoides</i> . | 55 |
| 12 | Valores R _f de los componentes de los extractos metanólicos | 61 |
| 13 | Resultados de la cromatografía líquida de alta resolución de los extractos metanólicos | 63 |
| 14 | Contenido de alcaloides de los extractos metanólicos de <i>I. murucoides</i> . Las concentraciones son el promedio \pm la desviación estándar de la curva patrón | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Número | Nombre | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Fotografías <i>I. murucoides</i> de la FES Iztacala | 7 |
| 2 | Mapa del Estado de Guanajuato | 14 |
| 3 | Mapa del Estado de México y fotografía del Jardín Botánico de la FES Iztacala | 16 |
| 4 | Diagrama de flujo de la estrategia metodológica. | 17 |
| 5 | Elución de compuestos en cromatografía de acuerdo a polaridad | 22 |
| 6 | Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante | 28 |
| 7 | Hojas de <i>I. murucoides</i> | 32 |
| 8 | Material vegetal de <i>I. murucoides</i> de la FES Iztacala 2014, 2379 IZTA | 33 |
| 9 | Rendimiento (%) de extractos de <i>I. murucoides</i> | 35 |
| 10 | Espectro de absorción UV (200 a 400 nm) de los extractos de <i>I. murucoides</i> 2012. | 39 |
| 11 | Cromatografía de placa fina de extractos hexánicos de <i>I. murucoides</i> 2012. | 42 |
| 12 | Cromatografía de placa fina de los extractos de polaridad intermedia (diclorometano) de <i>I. murucoides</i> de 2012. | 43 |
| 13 | Cromatografía de placa fina de los extractos metanólicos de <i>I. murucoides</i> de 2012. | 44 |
| 14 | Cromatografía de placa fina de los extractos metanólicos de <i>I. murucoides</i> de 2014. | 45 |
| 16 | Estructura genérica de los alcoholes grasos | 60 |
| 17 | Placas preparativas | 61 |
| 18 | Gráfico del porcentaje de decoloración de DPPH• en reacción con el extracto metanólico de <i>I. murucoides</i> de Sabanilla peso fresco 2012 | 65 |
| 19 | Modelo de placa DPPH | 70 |
| 20 | Modelo de placa Folin Cicalteau | 71 |

1.0 RESUMEN

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular, están implicados en la adaptación y sobrevivencia de los seres vivos. Las plantas generan una cantidad considerable de metabolitos secundarios y han sido modelo de estudio en la medicina, las industrias cosmética, farmacéutica y alimenticia. Por la gran biodiversidad y la cantidad de especies endémicas que posee México, la medicina herbolaria mexicana, es una de las más antiguas y vastas. La familia Convolvulácea predominantemente posee importancia medicinal y alucinógena, ya que los alcaloides son el marcador quimiotaxonómico del género *Ipomoea*. Este estudio está enfocado a la especie *I. murucoides*, la cual se conoce como cazahuate que significa “árbol de la roña” por el uso en afecciones de la piel, además se emplea como: antiinflamatorio, diurético y en picaduras de alacrán, por mencionar algunos. Como antecedentes, estudios anteriores han reportado: el aislamiento y evaluación biológica de algunos de sus componentes, sin embargo aún faltan más información sobre su composición química. El objetivo de este trabajo fue contribuir al conocimiento fitoquímico de la especie, reportando el perfil químico y determinando la actividad biológica (antimicrobiana y antioxidante) de los extractos hexánicos, diclorometano y metanólico de hojas y tallos de *I. murucoides* de tres regiones: Irámuco y Sabanilla, localidades del estado de Guanajuato y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala ubicada en el Estado de México. Se logró contribuir en la composición fitoquímica de la especie, demostrando que los extractos están constituidos por ácidos grasos, hidrocarburos saturados, compuestos fenólicos, sesquiterpenos oxigenados y alcoholes grasos. De acuerdo con la literatura poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antienvjecimiento y medicinal en tratamiento alternativo contra la diabetes. La cantidad máxima de alcaloides fue de 12.50 µg ECAT/100 g, lo cual no es considerado alto al igual que el potencial antioxidante de los extractos metanólico. Ninguno de los extractos de *I. murucoides* poseen actividad antimicrobiana.

2.0 INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que influyen directamente en la adaptación de los organismos para sobrevivir en un ecosistema en particular (Wink,2010). Han sido seleccionados por la evolución a lo largo de millones de años (Gutiérrez y cols., 2009). Se han agrupado en cuatro clases principales; a) Terpenos entre los que se encuentran: hormonas, pigmentos y aceites esenciales, b) Compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), c) Glicósidos (Saponinas, glicosidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) y d) Alcaloides (Ávalos y Pérez-Urria., 2009).

Dichos compuestos poseen un importante y significativo valor medicinal y económico, debido a su uso en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica, entre otras. Una gran cantidad de metabolitos secundarios que se han empleado desde la antigüedad como remedios, ahora se usan como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes y un sinnúmero de utilidades (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Debido a su gran uso e importancia, se han desarrollado diversas: técnicas de separación, enfoques espectroscópicos para elucidar su estructura y metodologías de estudio de la química orgánica (Buchanan y cols., 2000).

Los miembros del reino Plantae al ser organismos sésiles y no poseer un sistema inmune para protegerse de daños bióticos y abióticos. Se han adaptado para generar una gran variedad de metabolitos secundarios que les brinda múltiples beneficios para preservarse, por ejemplo, para atraer o repeler animales. Para ello destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y energía para su producción (Winky cols, 2010).

Sin embargo la síntesis de estos metabolitos es muy específica, ya sea a nivel de familia, género o incluso especie. A pesar de que las plantas representan un grupo de organismos importante para la extracción y estudio de metabolitos secundarios, sólo entre el 20 y 30% de las especies poseen una caracterización fitoquímica (Abreu y cols, 2008)

La biosíntesis en plantas, proviene básicamente de precursores de algunas rutas metabólicas como: glucólisis, ciclo de Krebs o la ruta del ácido shikimico. Dicha síntesis se da en sitios específicos como: el citosol y los cloroplastos, la regulación es dirigida a nivel celular mediante genes que van a transcribir los factores necesarios para su producción (Wink, 2010). En el cloroplasto se sintetiza el fitol y los carotenoides provenientes de la ruta piruvato/gliceraldehído fosfato. Los sesquiterpenos y esteroides son producidos en el retículo endoplásmico y algunos alcaloides, como la coniina, son sintetizados en la mitocondria (Wink y cols., 2010).

El reino Plantae representa el 15% total de las especies del planeta, aproximadamente son de 300,000 y 500,000 miembros. Los países con más especies son: Australia, Brasil, China, Colombia, Ecuador, India, Indonesia, Madagascar, México, Perú y Zaire. México es un país mega diverso, el cual cuenta con una gran variedad de plantas que desde la antigüedad se les ha dado un uso medicinal (Abreu y Cuéllar, 2008). Los antiguos pobladores de nuestro territorio con su gran conocimiento etnobotánico desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron (Ocegueda y cols, 2005).

Las familias de plantas más usadas en la medicina tradicional mexicana son; Leguminosae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Verbenaceae, Solanaceae, Lamiaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Rutaceae, Malvaceae y Myrtaceae (Magaña y cols, 2010). La familia Convolvulácea no es de las más representativas medicinalmente pero posee importancia económica, alucinógena y religiosa (Carranza, 2007).

El género más numeroso dentro de las Convolvuláceas es *Ipomoea*, con alrededor de 500 a 600 especies y predominan más en regiones áridas. Muchas de las especies de *Ipomoea* se usan en todo el mundo desde tiempos ancestrales para combatir diferentes enfermedades y padecimientos. La relevancia del estudio de este género ha tenido muchas aportaciones dentro del ámbito farmacológico y de estudios fitoquímicos (Meira y cols., 2012). Los usos que tiene son diversos y en la

medicina tradicional se emplean para: problemas de inflamación, como diurética, en afecciones en la piel y contra la picadura de alacrán. De *I. murucoides* se han logrado aislar algunos de sus componentes y evaluado su actividad biológica, sin embargo faltan más estudios que contribuyan al conocimiento fitoquímico de la planta (Carranza, 2007).

3. ANTECEDENTES

3.1 FAMILIA Convolvulácea.

La familia Convolvulácea cuenta con aproximadamente 40 géneros, dentro de los cuales se enlistan 1500 especies. Tienen una distribución casi cosmopolita, aunque alcanza su mayor diversificación en latitudes intertropicales, particularmente en regiones que presentan ambientes secos, por lo general prefiere suelos bien drenados, como laderas de lomas, arenas, rocas o zonas kársticas (Carranza, 2007).

Los miembros de esta familia pueden ser árboles, arbustos, lianas o muy frecuentemente enredaderas que en ocasiones son parásitas de otros vegetales. Las hojas son alternas, las inflorescencias generalmente en forma de monocasios y/o dicasios axilares, la corola es gamopétala. El fruto es en forma de cápsula, puede ser dehiscente o indehiscente. Más de la mitad de las especies tienen potencial hortícola ornamental (Carranza, 2007).

De acuerdo con McDonald, 1991 la familia cuenta con quince géneros y aproximadamente 217 especies dentro de la República Mexicana. En su estudio menciona que el origen de este género data desde la desintegración de Gondwana (100 m.a) por el grado de diversidad de los elementos primitivos y avanzados como en África, Sudamérica, Malasia y Australia.

Las especies de esta familia poseen células que secretan resinas glicosídicas en las hojas y raíces, lo cual le atribuye la propiedad purgante. Esto puede considerarse como un marcador quimitaxonómico característico de las Convolvuláceas (Meira y cols., 2012).

3.2 Género *Ipomoea*

Ipomoea es el género más grande de la familia Convolvulaceae con un aproximado de 500 a 600 especies que crecen con mayor abundancia en zonas áridas. El uso etnobotánico de este género va desde; nutricional, medicinal y fitotóxico, ya que la mayoría de las especies son malezas y algunas poseen alcaloides del tipo ergolina que provocan alucinaciones. Muchas de las especies son empleadas en todo el mundo para tratar enfermedades, especialmente las raíces que se usan para la constipación (Meira y cols, 2012).

Antiguamente se pensaba que el marcador quimiotaxonómico de las convolvuláceas eran los alcaloides del tipo ergolina, sin embargo Amor-Prats en 1993 hizo la evaluación por cromatografía en capa bidimensional de 43 semillas de *Ipomoea* encontrando que solo el 18% de las 43 especies tienen alcaloides de este tipo.

De acuerdo con la revisión hecha por Meira y cols en 2012, desde 1950 hasta 2012 se han determinado las propiedades; antimicrobianas, analgésicas, espasmolíticas, espasmogénicas, hipotensivas, psicóticas y anticancerígenas del género *Ipomoea*. Además los metabolitos secundarios aislados e identificados son; alcaloides tipo ergolina, indol y nortropano, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianos, glicolípidos, lignanos, triterpenos, cumarinas, isoprenoides, diterpenos, isocumarinas y benzenoides. Rosas-Ramírez y cols en 2011 reportan que varias especies de este género poseen una importante actividad antioxidante, como *I. batatas*.

3.3 *Ipomoea murucoides* Roem & Schult.

La clasificación taxonómica se describe a continuación, así como sus características diacríticas y usos en la medicina tradicional mexicana.

Clasificación taxonómica:

| | |
|----------|---------------------------|
| Reino | Vegetal |
| División | Anthophyta |
| Clase | Dicotyledoneae |
| Grupo | Sympetalea |
| Orden | Tubiflorae |
| Familia | Convolvulaceae |
| Género | <i>Ipomoea</i> |
| Especie | <i>Ipomoea murucoides</i> |

I. murucoides es una planta originaria de México (Alcántara, 1980). Es conocida como casahuate” en el Estado de México, Oaxaca, Morelos, Querétaro, “cazahuate” en Guerrero y existen quince formas más para nombrarla en las distintas lenguas o dialectos mexicanos. El nombre de Cazahuate viene del Náhuatl “Quauzeahuatl” que significa árbol de la roña (Quauh=árbol, zahuatl, cahuatl=roña o tiña). Se caracteriza por crecer en matorral xerófilo. Su distribución va de Jalisco, Guanajuato y Querétaro hasta Guatemala (Carranza, 2007; Chérigo, 2007)

Las características botánicas de *I. murucoides* son: árbol de 2 a 8 metros de altura, de madera blanda, con presencia de látex, muy pubescente, con hojas oblongo-elípticas de 8 a 17 cm de largo y de 3 a 5 cm de ancho y su flor es de color blanco en forma de campana de 7 a 7.5 cm de diámetro y 6 a 6.8 cm de longitud. Florece de los meses de octubre a marzo (Chérigo, 2007).

Algunas de las estructuras características de *I. murucoides* se muestran en la figura 1.

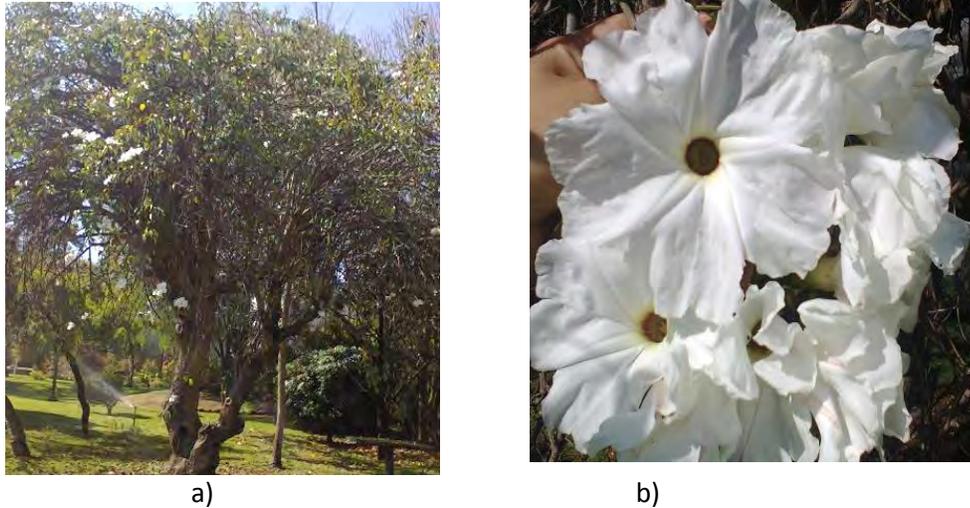


Figura 1. *I. murucoides* de la FES Iztacala (a) árbol y b) flor de *I. murucoides*.

Los usos que tiene *I. murucoides* en la medicina tradicional mexicana son para tratar problemas de la piel, como la caída del pelo y salpullido. Se usa la flor, hoja, tallo y corteza, administrado en forma externa para dolor e inflamación por golpes y reumas, es administrado vía oral en caso de picaduras de alacrán. En problemas de parálisis, se hierven las hojas para baños calientes, otros padecimientos que ataca son el dolor de muelas, tos, hidropesía y oído reventado. Además es auxiliar en procesos inflamatorios de vientre, ovarios y pies, así como para controlar los nervios y como diurético (Corona, 2008).

3.4 Estudios fitoquímicos y actividad biológica de la especie.

En el siguiente cuadro se enlistan los estudios y aportaciones más representativos de la caracterización fitoquímica y actividad de los metabolitos secundarios de *I. murucoides*.

Cuadro 1. Estudios más representativos de la caracterización fitoquímica de *I. murucoides*.

| AUTOR Y AÑO | TÍTULO | APORTACIÓN |
|-----------------|--|--|
| Mila, 2013 | Identificación de dos spp de <i>Ipomoea</i> y evaluación <i>in vitro</i> del extracto metanólico como problema de intoxicación en cabras | Obtuvo extractos de polaridad ascendente de hojas (hexano, diclorometano y metanol), en los que identifica la presencia de flavonoides, taninos, terpenos y alcaloides. Además realiza pruebas de toxicidad en nauplios reportándolos con una alta toxicidad. |
| Paz, 2012 | Alcaloides totales actividad antioxidante de extractos de hojas de <i>I. murucoides</i> . | Elaboró extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos, probando la actividad insecticida y la presencia de alcaloides a los que les atribuye disminución en actividad antioxidante. |
| Corona, 2007 | Aislamiento y purificación de un glicolípido mayoritario de las hojas de <i>I. murucoides</i> . | Aisló y purificó por HPLC la murucoidina XII, un glicolípido novedoso presente en la jalapina de las hojas. Aisló e identificó el núcleo pentasacárido constitutivo de la murucoidina XI |
| Tecanhuey, 2005 | Estudio fitoquímico de <i>I. murucoides</i> | Obtuvo extractos de hojas y tallos en los que aplicó pruebas colorimétricas para detectar metabolitos secundarios. En los extractos de hojas reportó la presencia de alcaloides, taninos, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas. En tallo detectó alcaloides, saponinas, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas. |

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| Corona y cols, 2013. | Modulators of antibiotic activity from <i>I. murucoides</i> . | Probó las resinas glicosídicas en la resistencia bacterial y antibiótica, concluyendo que si se usan, las bacterias y agentes patógenos son susceptibles a los inhibidores, siendo más efectivos que la reserpina (alcaloide) |
| Figuroa-González y cols, 2012. | Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. | Usaron las resinas glicosídicas de algunas especies de <i>Ipomoea</i> , entre ellas <i>I. murucoides</i> en línea celular de cáncer de mama, para la resistencia a la vinblastina. Potenciando así el efecto de la vinblastina en la terapia contra el cáncer |
| Corona, 2008 | Un nuevo lipopentasacárido del ácido simónico B de las resinas glicosídicas del Cazahuate (<i>I. murucoides</i>), una planta medicinal Mexicana. | Aisló y purificó por HPLC a la murucoidina XIX (glicolípido). Aisló e identificó dos núcleos pentasacáridos constitutivos de las murucoidinas III, V y XIX, caracterizados por técnicas espectroscópicas |
| Chérigo y cols, 2008 | Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of <i>I. murucoides</i> . | A partir de las resinas glicósidos del extracto clorofórmico de las flores aíslan seis nuevos pentasacáridos acilados del ácido jalapinolico, murucoidinas (VI-XI) y algunos de los ácidos grasos comúnmente identificados en plantas. Además hace pruebas antimicrobianas en <i>Staphylococcus aureus</i> , reportando |

que dicha actividad se debe a las lactonas macrocíclicas.

| | | |
|----------------------|---|---|
| Chérigo y cols, 2008 | Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from <i>I. murucoides</i> . | Elaboraron extracto cloroformico de flores, reportaron que las murucoidinas tienen un efecto potenciador de la norfloxacin (fármaco para infecciones) para experimentos antibacteriales. |
| Chérigo, 2007 | Resinas glicosídicas de las flores de <i>I. murucoides</i> . | Aisló 21 glicolípidos a partir de extractos clorofórmicos y metanólicos; de los cuales 18 de ellos son novedosos, de igual manera aisló las murucoidinas I-XVII a las cuales no las reporta con actividad citotóxica. Reporta la presencia de flavonoides, glicósidos de tipo kaemferol y la identificación de núcleo de los ácidos operculínico A y simónicos A y B, así como los ácidos operculínicos C y E (tetrasacáridos). |
| León y cols, 2005 | Pentasacharides Glycosydes from the Roots of <i>I. murucoides</i> | A partir de un extracto de diclorometano de las raíces, separó un material resinoso por cromatografía de columna abierta de silica gel. Reportan cinco glicósidos pentasácaridos y las murucinas de la 1 a la 5. De igual manera realizaron pruebas en una línea celular de cáncer, reportando citotoxicidad. |

4.0 JUSTIFICACIÓN

Existen muchos motivos para estudiar la composición fitoquímica de una planta, ya sea por su pigmentación, olor y más importante; sus propiedades medicinales u otras actividades biológicas. *I. murucoides* está clasificada como una planta medicina, además se le ha reportado actividad contra depredadores. Es por ello que ha surgido interés sobre la composición de sus metabolitos secundarios.

Es necesario determinar cualitativa y cuantitativamente la variación de los metabolitos secundarios en ejemplares de dos zonas y estacionalidades diferentes. Por lo tanto las preguntas científicas son:

¿Existe diferencia en la composición química de *I. murucoides* de diferentes localidades?

¿Existe diferencia en la composición química de *I. murucoides* por la temporalidad?

¿Los metabolitos secundarios de *I. murucoides* colectadas en zonas diferentes poseen actividad antifúngica, antibacteriana y antioxidante?

5.0 HIPÓTESIS

La composición y cantidad de metabolitos secundarios de las especies varía respecto a la ubicación geográfica, temporalidad y condiciones climáticas. Los individuos de *I. murucoides* deben sintetizar metabolitos en cantidades y variedades distintas respecto a su ubicación y temporalidad, ya que las condiciones climáticas en las que se desarrolla esta especie suelen caracterizarse por altas temperaturas, alta incidencia de luz y poca humedad. Además algunos de estos metabolitos deben poseer actividades antimicrobianas y antioxidantes para protección contra patógenos u otros agentes nocivos asociados a la especie. Dicha composición química resultará interesante para la caracterización de la especie y los posibles usos en la medicina.

6.0 OBJETIVOS

6.1 General

Analizar la composición de metabolitos secundarios y algunas propiedades biológicas de extractos de diferentes polaridades de hoja y tallo de *I. murucoides* de distintas localidades y temporadas.

6.2 Particulares

- Obtener extractos de diferente polaridad de hojas y tallos de *I. murucoides* de diferentes localidades y temporadas
- Determinar la capacidad de absorción en la región UV del espectro electromagnético de los extractos obtenidos.
- Analizar el perfil fitoquímico de los diferentes extractos de *I. murucoides* mediante técnicas cromatográficas (placa fina , columna, CG y HPLC)
- Reportar la acción de los metabolitos secundarios revelados en las diferentes cromatografías, de acuerdo con la literatura.
- Determinar cualitativamente y cuantitativamente la presencia de alcaloides en ejemplares de *I. murucoides* de diferentes localidades y temporalidades.
- Determinar el potencial antioxidante de los extractos metanólicos mediante la prueba DPHH del material vegetal colectado en diferentes localidades y temporadas.
- Evaluar si *I. murucoides* posee actividad antimicrobiana.

7.0 ZONAS DE COLECTA

En esta sección se describen las características ambientales de cada una de las áreas donde se colecto el material vegetal de *I. murucoides*.

7.1 Sabanilla (Jerécuaro) e Irámuco (Acámbaro) Guanajuato.

El Estado de Guanajuato está ubicado en el centro de la República Mexicana. Las condiciones ambientales naturales son altamente diversas y han estado sometidas a grandes presiones demográficas, dando como resultado una serie de paisajes

totalmente alterados, quedando sólo pequeñas porciones sin cambios relevantes (Carranza, 2001).

Cuando el bosque tropical caducifolio es sometido a perturbaciones periódicas y constantes, ya sea por influencia de las prácticas agrícolas o por la ganadería, y se deja temporalmente en reposo, se desarrolla un matorral secundario que fue denominado matorral subtropical por Rzedowski y McVaugh (1966). Esta comunidad dominada principalmente por especies arbustivas de hasta 5 metros de alto, entre la que crecen algunos árboles aislados. Las especies más características de este matorral son cazahuate o palo bobo (*I. murucoides*), los huizaches o tepames (*Acacia farnesiana* y *Acacia pennatula*), los nopales (*Opuntia* spp.), el palo dulce (*Eysenhartia polystachya*), el acebuche (*Forestiera phillyreoides*) y el palo prieto o tepehuaje (*Lysiloma microphyllum*) (CONABIO vol 2, 2012).

Guanajuato forma parte de la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico Transversal, el cual es de una gran extensión. El estado de Guanajuato se divide en cinco subprovincias y es la subprovincia del bajío Guanajuatense en que se localizan los municipios de Jerécuaro y Acámbaro. Los cuales se encuentran en las Sierras Volcánicas del Sureste Guanajuatense, tienen colindancia con el estado de Michoacán y Querétaro. La altitud va desde los 1800 a los 2000 msnm. El principal tipo rocas son ígneas del tipo basáltico de color negro, seguidos de aluviones que han llenado valles y llanuras (CONABIO vol 1, 2012).

El tipo de suelo de los dos municipios es vertisol que tienen texturas arcillosas, las cuales por su naturaleza física aunada a la mayor profundidad poseen una mayor capacidad de retención de humedad, aunque su contenido de materia orgánica generalmente es considerado bajo, ya que es menos al 2%. En cuanto a los cuerpos de agua cercanos al municipio de Acámbaro se encuentran el Río Lerma (394,360 m) y la Presa Solís (Carranza, 2005).

El cuerpo de agua que colinda con el municipio de Acámbaro es la cuenca del Lago Cuitzeo que pertenece al estado de Michoacán. Este cuerpo de agua ha

sufrido grandes cambios a lo largo del tiempo debido al crecimiento en los asentamientos humanos, uno de esos cambios es, la contaminación ya que se han identificado sedimentos que son productos de la erosión del suelo, agroquímicos, aguas negras de origen urbano y algunos productos industriales (Bravo-Espinosa y cols, 2008).

El tipo de clima en el municipio de Acámbaro es templado subhúmedo (el más seco) con una temperatura medio anual de 12 a 18° C y el del municipio de Jerécuaro es templado subhúmedo el cual es intermedio en cuanto humedad, con una temperatura media anual de 12 a 18° C. Ambos con lluvias en verano. En la región determinada El Bajío, predomina la agricultura tanto de riego como de temporal, con cultivos de maíz, sorgo, trigo, cebada, alfalfa y hortalizas, mientras que entre la vegetación silvestre todavía se puede encontrar en pequeños manchones aislados cactáceas, bosque de pino-encino y en menos superficie, pastizales y chaparral (CONABIO vol 1, 2012).

El siguiente mapa que muestra la ubicación que tienen los municipios de Jerécuaro y Acámbaro, en donde se realizaron las colectas de *I. murucoides*.



Figura 2. Mapa del Estado de Guanajuato, las flechas en color rojo indican a los municipios de Acámbaro (Irámuco) y Jerécuaro (Sabanilla).

7.2 Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

El Estado de México posee un área de 21,355 km² y ocupa el 25° lugar en superficie con respecto a las otras entidades de México. Se localiza en la parte más alta de la Altiplanicie Mexicana, su territorio está caracterizado por sistemas montañosos abruptos y escarpados valles intermontanos, lomeríos y llanuras (Ceballos y cols, 2009). El clima y la vegetación varían desde cálido húmedo con selva baja caducifolia en la cuenca del río Balsas en el sur, hasta templado con bosque de pino encino y pastizales en el norte y centro. La FES Iztacala, esta en el municipio de Tlalnepantla, se ubica en la provincia del Eje Volcánico Transversal. Se encuentra a 2251 metros sobre el nivel del mar, con un área de 12 ha con jardines amplios, rodeada de casas habitación y complejos industriales (DeSucre-Medrano y cols, 2010).

La FES Iztacala tiene una precipitación anual de 640.8 mm; siendo el período de lluvias de junio a septiembre y de sequía de diciembre a marzo. La temperatura media anual es de 15 a 18 °C. La humedad atmosférica relativa es de 61 a 70 %. El clima es Cw (templado con estación seca en invierno) según el sistema de Köppen (http://biologia.iztacala.unam.mx/bio_jardin.php, 24/04/2016).

En la figura 3 se observa el mapa de del Estado de México, en el que se resalta el municipio de Tlalnepantla. La flecha en color azul indica la ubicación que tiene la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Al igual se muestra una fotografía del Jardín Botánico.

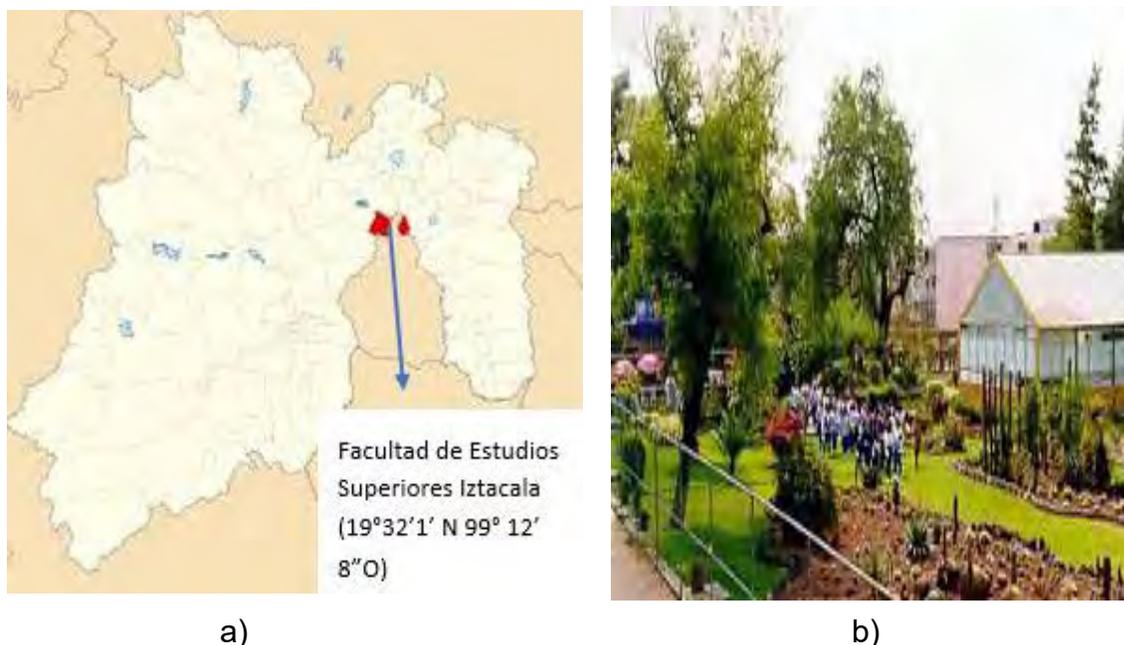


Figura 3. a) Mapa del Estado de México, en rojo se muestra el Municipio de Tlalnepantla y b) Fotografía del Jardín Botánico de la FES Iztacala.

8.0 ESTRATEGÍA METODOLÓGICA

La fase experimental se dividió en cuatro etapas que se desglosan en el siguiente diagrama de flujo. La primera etapa corresponde a la obtención e identificación del material vegetal; la segunda a la preparación de extractos con solventes de polaridad ascendente; la tercera; separación de compuestos y análisis fitoquímico (técnicas cromatográficas, espectroscópicas y pruebas coloridas); la cuarta y última parte corresponde a las pruebas biológicas de los extractos obtenidos en 2012 para determinar si poseían alguna actividad antimicrobiana o actividad antioxidante.

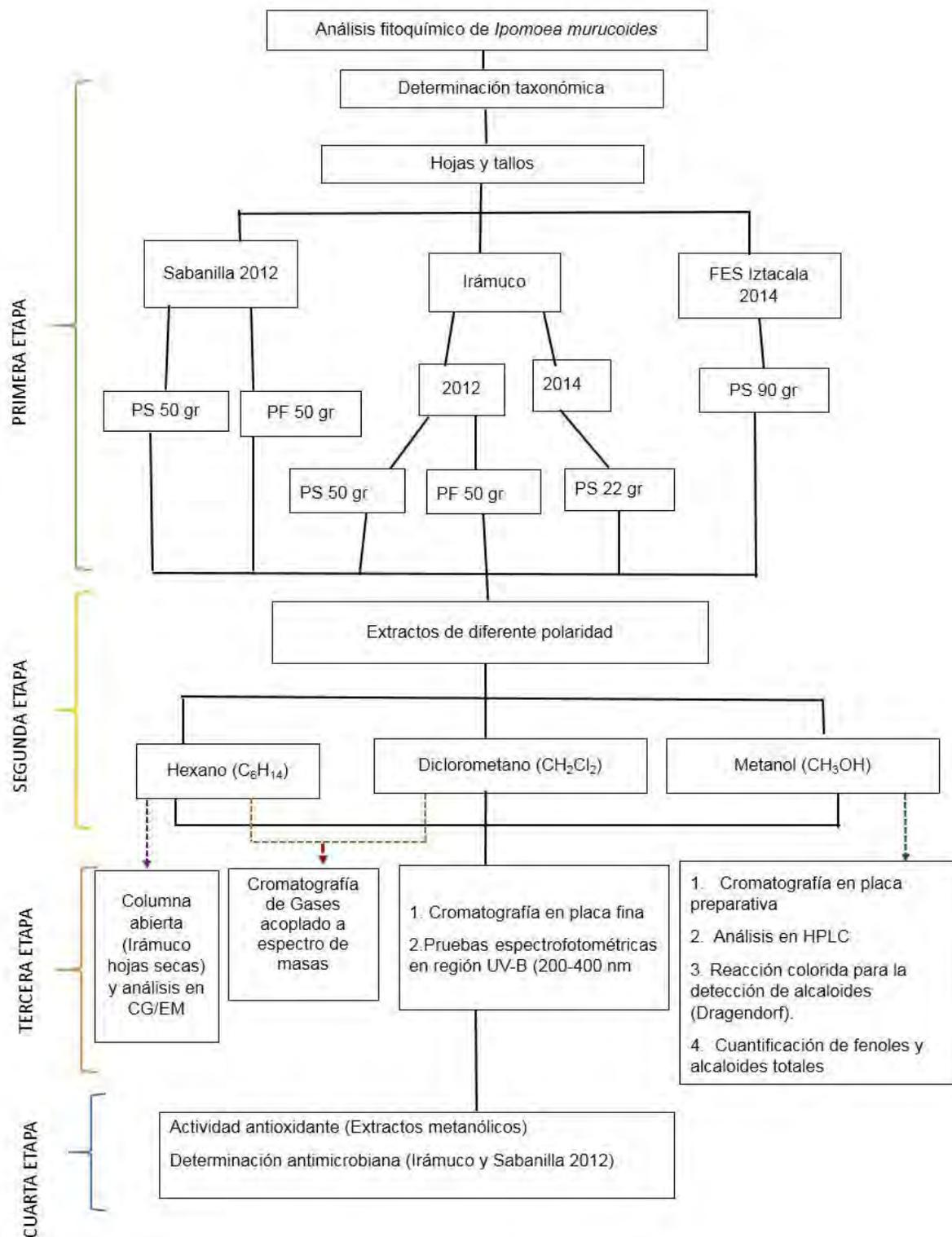


Figura 4. Diagrama de flujo de la estrategia metodológica. PS: Peso seco y PF: Peso fresco.

8.1 PRIMERA ETAPA.

8.1.1. Recolección de material vegetal

Las hojas y tallos de *I. murucoides* se recolectaron en dos años diferentes. La primera fue recolectada en el mes de Septiembre de 2012 en las localidades de Irámuco y Sabanilla. Las hojas y tallos de esa colecta fueron divididos de acuerdo a dos criterios; localidad y consistencia (fresco y seco), teniendo cuatro grupos; Sabanilla hojas verdes, Sabanilla hojas secas, Irámuco hojas verdes e Irámuco hojas secas.

La segunda recolecta fue en Enero de 2014 en dos localidades diferentes: en el municipio de Acámabaro en la localidad de Irámuco y la segunda en el Jardín Botánico de la FES Iztacala en el municipio de Tlalnepantla. El material de ambos grupos se dejó secar a temperatura ambiente durante ocho días.

8.1.2 Determinación taxonómica del material vegetal

El material vegetal recolectado se determinó en el herbario de la FES Iztacala por la profesora Ma. Edith López Villafranco.

8.2 SEGUNDA ETAPA

8.2.1 Extracción

El material vegetal de *I. murucoides* se pesó, se trituró y se colocó en matraces Erlenmeyer por separado para el proceso de maceración. Los solventes utilizados fueron: hexano, diclorometano y metanol en relación 1:10 por peso de hojas y tallos. El orden del uso de los solventes fue de acuerdo a su polaridad, comenzando con baja polaridad (hexano), polaridad intermedia (diclorometano) y polaridad alta (metanol). En el cuadro 2 se muestran cada uno de los grupos de *I. murucoides*, su peso en gramos y la cantidad de solvente (ml) utilizado para su maceración.

Cuadro 2. M Maceración de las plantas de *I. murucoides* de diferentes localidades.

| Año y Lugar de recolecta | Material vegetal (gr) | Solvente (ml) |
|---------------------------------|------------------------------|----------------------|
| 2012 Irámuco Peso Seco | 50 | 500 |
| 2012 Irámuco Peso Fresco | 50 | 500 |
| 2012 Sabanilla Peso Seco | 50 | 500 |
| 2012 Sabanilla Peso Seco | 50 | 500 |
| 2014 Irámuco Peso Seco | 22 | 220 |
| 2014 FES- I Peso Seco | 90 | 900 |

Cada uno de los extractos se dejó a macerar por una semana, posteriormente se filtraron y concentraron a sequedad a presión reducida en rotavapor Heipolph modelo Laborota 4000. Se concentraron a sequedad y después se colocaron en recipientes para pesarse y obtener el rendimiento de cada uno de ellos. El rendimiento se calculó de la siguiente forma:

Rendimiento (%)= (peso del extracto)(100)/peso del material vegetal

8.3 TERCERA ETAPA

En esta sección se describen los estudios y las técnicas utilizadas para obtener la caracterización fitoquímica de los extractos. La descripción comenzará con la obtención del espectro de absorción en la región UV, seguido de las técnicas cromatográficas (placa fina, columna abierta, de gases acoplada a espectro de masas, placa preparativa y HPLC), pruebas para la detección de alcaloides; cualitativa (reactivo de Dragendorf) y cuantitativa (Shamsa, 2008) , identificación y cuantificación de fenoles totales (Guerrero, 2012).

8.3.1 DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN EL UV.

Es una técnica que se usa para determinar la longitud de onda e intensidad a las cuales una sustancia puede absorber la luz, lo cual provoca que los electrones se exciten y pasen a niveles más altos de energía. La sustancia libera rápidamente la energía sobrante y vuelve al estado inicial que es más estable. El tipo de luz que

se usa es la visible y UV (ultravioleta) (Arenas y López, 2004). El proceso en el que suceden dichos eventos se explica a continuación:

Una molécula o sustancia presenta dos estados energéticos; 1) estado inicial o estado fundamental y 2) el estado más energético denominado estado excitado. La absorción de radiación produce un paso del estado fundamental al *excitado* (excitación) y en el proceso contrario (llamado relajación) hay una liberación de energía. La espectrofotometría de absorción se usa con moléculas disueltas en un solvente transparente. La absorbancia de un soluto depende linealmente de la concentración, de la naturaleza química y el ambiente molecular en donde se encuentra el cromóforo (Arenas y López, 2004).

A los extractos de 2012 (hexánico, diclorometano y metanólico) se les hizo la prueba espectrofotométrica para determinar la absorción en la región UV (200-400 nm), con la finalidad de verificar si *I. murucoides* poseía compuestos con picos de absorción altos en la región UV-B, que son de interés para estudios de cáncer de piel. Además se prepararon dos extractos acuosos; uno correspondiente a Sabanilla y el segundo a Irámuco. Las concentraciones de cada uno de los extractos fueron de 500, 250, 100 y 50 ppm. Como blanco se usaron los solventes correspondientes a cada extracto (hexano, diclorometano, metanol y agua). El equipo que se utilizó fue un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 25.

8.3.2 CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía es una técnica de separación de los compuestos químicos que conforman una mezcla. Fue descubierta por primera vez en 1906 por el botánico ruso M. Tswett al colocar un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio de carbonato de calcio (CaCO_3). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades (Facultad de Química, 2007).

La cromatografía está conformada por una fase móvil y una fase estacionaria, la fase móvil es la que se desplaza, mientras que la otra permanece fija dentro del

sistema. La velocidad de la separación depende de la afinidad relativa que la mezcla que se desee separar tenga con ambas fases (equilibrio de distribución) (Facultad de Química, 2007).

A) Cromatografía de Placa fina.

Esta técnica fue utilizada para determinar la fase móvil adecuada para separar de manera óptima los compuestos de cada uno de los extractos y así obtener los valores Rf de cada una de las marcas reveladas (factor de referencia). Los cromatofolios utilizados son de aluminio cubiertos de gel sílice 60 F₂₅₄ (Merck 0.2mm de espesor) y como agentes cromogénicos se emplearon; 1) revelado de luz UV a 254 y 366 nm (Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet. Spectroline Mod CX-20), 2) Solución sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado y para observar el desarrollo del color se calentaron las placas en una parrilla a 110°C por dos minutos.

Además de la primer técnica descrita anteriormente, se utilizó otra, de acuerdo con el atlas de Wagner y cols, 1984 en la que se comparan los valores Rf y el comportamiento cromogénico de los compuestos revelados en las cromatografías, y de acuerdo a estas dos características se identificó la presencia de compuestos específicos. En dicha técnica únicamente se utilizó como agente revelador una solución de vainillina-ácido sulfúrico (1%-5%). Los extractos a los que se les realizó esta técnica fueron hexánicos de la recolecta de 2012.

Los valores Rf (factor de referencia) de las cromatografías de placa fina y preparativa, se calcularon con la siguiente expresión:

Rf: distancia recorrida por el compuesto (X) / distancia recorrida por el eluyente (Y). De acuerdo a la naturaleza de compuesto (X) el corrimiento sobre la fase estacionaria (silica gel) será como lo ejemplifica en la figura 5.

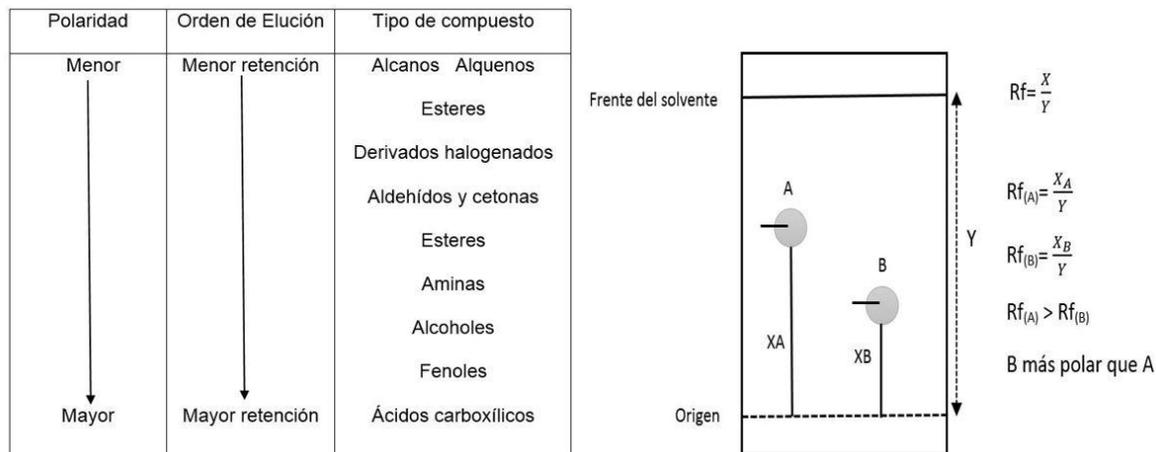


Figura 5. Elución de compuestos en cromatografía de acuerdo a polaridad.

B) Cromatografía de columna abierta.

A partir del gramo obtenido del extracto hexánico de *I. murucoides* de la región de Irámuco (2012) en peso seco, se preparó una cromatografía de columna abierta para fraccionar los compuestos de dicho extracto. La cromatografía de adsorción en columna abierta tenía como fase estacionaria gel sílice 60 F₂₅₄ (tamaño de partícula 0.063-0.200 nm, Merck malla 70-230 ASTM) y como fase móvil una solución de tolueno-acetato de etilo, en diferentes proporciones para tener mezclas de polaridad ascendente. Para observar el comportamiento de las alícuotas obtenidas se realizaron cromatografías de placa fina y de acuerdo a este comportamiento se reunieron las diferentes fracciones. Algunas fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

C) Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).

La cromatografía de gases es una de las técnicas de separación que ofrece alta sensibilidad y eficacia para analizar compuestos volátiles. Con presión de vapor alta las mezclas que se analizan son fraccionadas en fase gaseosa, lo cual establece ciertos límites en su utilización que están marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos. Por lo general, la utilización de la cromatografía de gases está restringida a compuestos de peso molecular menor a

1000, a una temperatura máxima de trabajo aproximadamente de 400°C (Facultad de Química, 2007).

La cromatografía de gases se basa en la distribución de la muestra en dos fases, la fase estacionaria es de extensa superficie empacada aparentemente dentro de una columna, la fase móvil consiste en un gas inerte que percola sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma. La separación se basa en los puntos de ebullición y la temperatura de la columna (Facultad de Química, 2007).

Para la separación se inyecta una pequeña cantidad de la muestra en en una columna capilar que tiene como fase móvil un gas inerte a elevada temperatura. En el proceso de corrimiento por la coluna se separan los compuestos de la mezcla por medio de un mecanismo de partición, en este caso de adsorción (cromatografía gas sólidos). Los compuestos separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado. El sistema CG/EM se constituye de: cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas y sistema de cómputo. El acoplamiento de estos sistemas brinda muchas ventajas cómo; detector universal para CG, alta sensibilidad, especificidad para la identificación de compuestos desconocidos o su confirmación, proporciona información acerca del peso y la estructura molecular. Los picos son identificados al comparar su espectro de masa con los de una biblioteca o se puede determinar su estructura por los patrones de fragmentación que presentan (Méndez, 2004)

Los extractos analizados con esta técnica, fueron los de baja polaridad es decir; hexánicos, las alícuotas de la columna preparativa y diclorometano de ambas recolectas. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Agilent technologies modelo 6850, con columna HP-5MS (Agilent technologies) con medidas de 30m de largo, 0.25 mm de diámetro y película de 0.25 µm que a su vez esta acoplada a un espectrómetro de masas (Agilent technologies mod. HP-5MS). El gas utilizado cómo fase móvil fue helio (He). El tipo de inyección fue Split o manual. La cantidad de muestra que se inyectó fue de 1µl. El tiempo total del análisis fue de 40 minutos para cada una de las muestras y la identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST, versión 8.0.

Las condiciones del equipo eran las siguientes: temperatura inicial del horno fue de 70° C durante dos minutos y la rampa de calentamiento con una temperatura de 290° C. El inyector tenía una temperatura inicial de 250 °C, presión de 7.52 psi, la columna era de fenil metil siloxano (5%) y el flujo unicial de 0.9 ml/min, el rango menor de masas fue de 35 y el mayor de 600. La fuente de ionización fue de 230 °C y el cuadrupolo de 150 °C, la energía de ionización fue de 70 eV y el partimiento fue por impacto electrónico.

D) Cromatografía de placa preparativa.

Esta técnica fue usada para fraccionar los extractos metanólicos de *I. murucoides* de 2012. La cromatografía preparativa se realizó en placas de gel sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio de 20 cm por 20 cm. En la superficie del adsorbente (gel sílice), mediante un capilar se trazó una línea continua de muestra disuelta de extracto metanólico (80 mg) a 1.5 cm de distancia del borde inferior de la placa. La placa se introdujo en posición vertical en una cubeta de vidrio que durante la elución permaneció tapada para evitar la evaporación de la fase móvil, que era una solución de metanol-hexano (8:2).

Una vez terminado el corrimiento, las placas se colocaron en un lugar fresco, seco y sin luz para su secado. Posteriormente se revelaron en luz UV a 254 y 366 nm (Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet. Spectroline Mod CX-20), se marcaron las áreas de cada una de las bandas separadas y se calculó el valor R_f de cada una de ellas. Finalmente cada banda fue raspada y filtrada para su análisis en cromatografía de placa fina y así obtener las distintas fracciones que se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución.

E) Cromatografía de líquidos de alta resolución.

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de alta eficacia analítica y de separación. Esto se debe a su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles. La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es una columna que puede ser de acero inoxidable (Ruiz, 2004).

El cromatógrafo de líquidos está constituido por: un reservorio que alimenta al sistema con la fase móvil, un sistema que permite la introducción de la muestra (inyector), a una bomba para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna, un detector de monitoreo de la solución que emerge de la columna y un sistema de registro de los datos provenientes del detector (Ruiz, 2004).

Las fracciones de extractos metanólicos obtenidos de placas preparativas fueron analizadas en un equipo Hewlett-Packard modelo 1100 con una columna C18 allsphere ODS-1, con longitud de 250 mm y diámetro interno de 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm. El flujo era de 1 ml por minuto en modo isocrático, la fase móvil estaba compuesta por metanol, acetonitrilo, agua (25:25:50), el detector de arreglo de diodos estaba a un rango de 200 a 750 nm, la detección fue a 254 nm.

8.3.3 IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES.

Las técnicas de reconocimiento de alcaloides se basan en la capacidad que poseen estos compuestos, de reaccionar con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno formando precipitados. En esta sección se describirán las dos pruebas que se aplicaron a los extractos para determinar la presencia y cantidad de alcaloides en los extractos metanólicos.

A) Prueba colorida (Reactivo de Dragendorff)

Esta prueba cualitativa ayuda para identificar la presencia de alcaloides que ocasionalmente se encuentran como sales de ácidos en plantas (cloruros oxalatos). Cuando la prueba es positiva se forma un precipitado color rojizo al fondo. El reactivo de Dragendorff que se usó estaba compuesto de dos soluciones:

- Solución A: 0.85 g de subnitrito de bismuto disueltos en una mezcla de 10 ml de ácido acético y 40 ml de agua.
- Solución B: 8 g de yoduro de potasio disueltos en 20 ml de agua.

Se mezclaron 5 ml de solución A con 5 ml de solución B y 20 ml de ácido acético para completarlo a 100 ml con agua (Arango, 2002).

Los extractos a los que se les aplicó esta prueba fueron metanólicos de la recolecta de 2012 con una concentración de 0.2 g/mL.

B) Extracción y cuantificación de alcaloides.

La extracción y cuantificación de alcaloides se realizó de acuerdo con la modificación del método colorimétrico de Shamsa y cols, 2008, (ver anexo 1). Es un método espectrofotométrico que consiste en la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol color amarillo, el complejo obtenido es muy estable y es nula o escasa la interferencia por otros compuestos.

8.3.4 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES.

Folin-Ciocalteu

Esta técnica ayuda a determinar la presencia de fenoles. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con restos fenólicos y en compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Jiménez y Girbés, 2013).

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes antioxidantes, es una reacción óxido-reducción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu (se reduce) y los fenoles de la muestra (se oxidan). El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico de óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez y cols, 2008).

La prueba se llevó a cabo de acuerdo con Guerrero, 2012 (ver anexo 1).

8.4 CUARTA ETAPA: PRUEBAS BIOLÓGICAS.

En esta sección se describe el fundamento de las dos pruebas biológicas aplicadas a los extractos de *I. murucoides*.

Actividad antioxidante: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Este método fue propuesto por Blois en 1958, demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre muy estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como el caso de la mayoría de los radicales libres (Tovar, 2013)

Este es un método para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, esta actividad se mide de acuerdo a la capacidad atrapadora de radicales libres de los antioxidantes. La reducción y estabilización del DPPH por los antioxidantes da lugar a la decoloración de éste, produciendo una disminución de la absorbancia a 517 nm y se expresa como porcentaje de decoloración de la solución radicalaria a una concentración dada (Palomo y cols 2009).

El DPPH posee una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción en solución etanólica a 520 nm. Cuando una solución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie de radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color, por lo tanto la pérdida de la absorbancia. El parámetro IC₅₀, que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usada para la interpretación de este método (Gutiérrez y cols, 2008)

En su forma de radical libre, el DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación y figura:



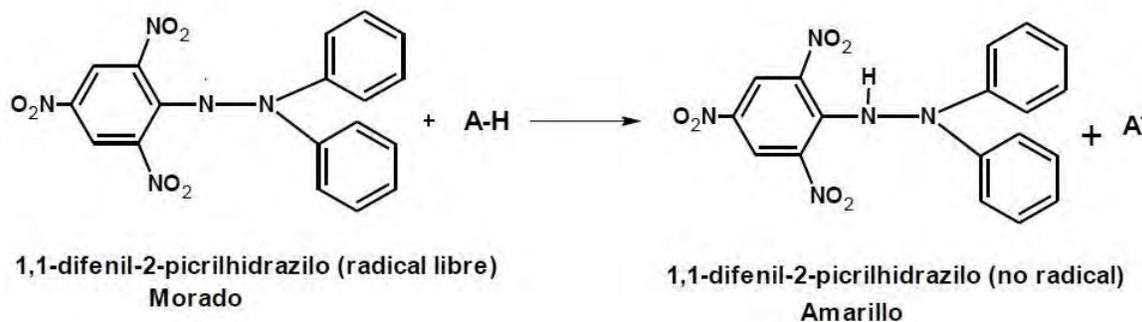


Figura 6. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Tovar, 2013).

Donde AH es un antioxidante que actúa donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena. El nuevo radical formado ($A\bullet$) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo (Martínez, 2007).

La prueba de DPPH se realizó como se muestra en el anexo 1.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos, diclorometano y metanol de la recolecta de 2012. Las pruebas fueron aplicadas en los siguiente modelos de estudio: *Escherichia coli* 53228 (gram negativa), *Staphylococcus aureus* 83MR (gram positiva), *Candida albicans* 14065 (levadura) y *Aspergillus niger* (hongo filamentoso). Las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Farmacognosia de la UBIPRO (ver anexo 1).

9.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se muestran, describen y discuten los resultados de cada uno de los puntos de la fase experimental.

PRIMERA ETAPA.

9.1 Recolección de material vegetal y características fenológicas de los ejemplares relacionadas con su ambiente.

Al momento de hacer la recolecta del material vegetal se observaron diferencias entre los ejemplares de cada una de las regiones. El cuadro 3 muestra las diferentes características fenotípicas de la especie respecto a: ubicación geográfica, clima y estación del año.

El fenotipo de *I. murucoides* de Irámuco se caracteriza por la presencia de abundante pubescencia, hojas y pocos botones florales pequeños, lo cual es contrario a *I. murucoides* de la FES Iztacala que se caracteriza por poseer hojas largas con muy poca o nula pubescencia, botones florales grandes y en abundancia. Cuando existe heterogeneidad en el ambiente en el que desarrolla una especie, un proceso de adaptación muy común es la denominada plasticidad fenotípica. Los cambios o diferencias fenotípicos tienen la función de asegurar éxito, ya sea para mayor obtención de nutrientes, mayor captación de agua, adaptaciones contra sequía, temperaturas extremas y altas incidencias de luz o ataques de otros organismos (Pedroso y cols, 2010).

La presencia de abundante pubescencia en los ejemplares de Irámuco se explica por el ambiente hostil en el que se desarrolla la planta. La pubescencia es una extensión de la epidermis, entre sus funciones están las de proporcionar mayor economía hídrica, mejorar la difusión de los gases, la síntesis de algunos aceites y atenuar las altas incidencias de luz, temperatura y efecto abrasivo contra el viento (Molina-Montenegro, 2008)

Cuadro 3. Diferencias fenotípicas, climáticas y estacionales de *I. murucoides* de tres localidades.

| Localidad | Mes y año de colecta | Clima | Tipo de Suelo | Diferencias fenológicas |
|--------------|----------------------|---|--|---|
| Irámuco | Septiembre 2012 | Lluvias en verano | Tepetate, llanuras, roca ígnea, materia orgánica 2% | Tenía una plaga que al parecer era un ácaro. Sin evidencia de botones florales. |
| Sabanilla | Septiembre 2012 | Lluvias en verano con temperatura de 12 a 18 °C | Arena-limo, colectada junto a un lago. | Presentó una coloración parda durante el secado a temperatura ambiente. Presentaba algunos botones florales |
| FES Iztacala | Enero 2014 | Junio a Septiembre con lluvias, 640.8 msnm, 15 a 18 ° C. Templado de 61 a 70 % de humedad. El riego es constante durante todo el año. | | La floración estaba por terminar y la planta tenía muy pocas hojas. |
| Irámuco | Enero 2014 | Lluvias en verano | Tepetate, llanuras, roca ígnea. Materia orgánica 2%. | Comenzaba la floración. |

Las condiciones de desarrollo de *I. murucoides* de FES Iztacala se caracterizan por tener riegos constantes durante el año, por ello, las temporadas de secas y lluvias no son tan marcadas, por esta razón la planta no genera demasiada pubescencia (estructura) o inclusive estrategias a nivel de síntesis de metabolitos para su protección. Hemmerlin y cols en 2012 mencionan que la energía y compuestos que no son usados para generar estructuras o estrategias de protección, son dirigidos a procesos de reproducción y crecimiento. De esta manera se puede explicar la gran cantidad de botones florales y poca o nula pubescencia de los ejemplares de esta especie que crece en la FES-I.

Dichos cambios fenotípicos entre los ejemplares de *I. murucoides* provenientes de Guanajuato y de la FES Iztacala hicieron pensar que se trataban de dos especies diferentes, sin embargo después de análisis taxonómico exhaustivo se comprobó que pertenecían a la misma especie. Los ciclos de vida de dichos organismos son diferentes por la ubicación geográfica de cada uno de ellos. Dicha ubicación trae consigo una serie de factores bióticos y abióticos que dan como resultado el medio ambiente en donde se desarrollan los ejemplares de este estudio.

El ciclo de vida de las plantas está directamente sincronizado con los cambios estacionales. Por lo tanto los factores que afectan el crecimiento y desarrollo son; el complejo de factores climáticos, edáficos y bióticos. La temperatura, la luz y la humedad son tal vez los aspectos más importantes en la adaptación, desarrollo y supervivencia (Pedroso y cols, 2010).

La temperatura está directamente relacionada con la floración. Lo cual parece ser clave en la supervivencia en periodos de tiempo no favorables para un crecimiento y desarrollo normal (Sánchez, 2008). Este fenómeno se observa en los ejemplares de FES Iztacala e Irámuco de 2014, puesto que a pesar de ser recolectados en la misma temporada, la floración sólo estaba presente en *I. murucoides* de la FES Iztacala.

La poca humedad puede limitar el crecimiento y productividad, consecuencia de esto son las modificaciones morfológicas y fisiológicas. Dichas modificaciones son

apreciables en los organismos de Irámuco y Sabanilla. Por último el exceso de luz daña el proceso fotosintético, en específico el fotosistema II (Sánchez, 2008).

Los organismos de Irámuco presentaban daños provocados por una plaga que al parecer era provocada por un acaro. El tipo de respuesta que la planta generó fue local ya que presentaba cambios en la vecindad del tejido dañado. Este tipo de respuesta es innata ya que genera un reconocimiento y/o generación de señales internas en la planta para la generación de estructuras de defensa como lo son, los tricomas y la acumulación de proteínas estructurales, enzimas o metabolitos (Alcántar, 2005)

Otra de las diferencias notables fue entre el material vegetal de Irámuco y Sabanilla de 2012, se pueden observar en la figura 7; que material vegetal de Sabanilla presentó una coloración café a pocos días del secado. Este hecho indico una posible oxidación que se relaciona con actividad antioxidante. Las hojas de *I. murucoides* de Irámuco presentaban unos gránulos color amarillo que se supuso era una plaga y en algunas partes de las hojas poseían coloraciones oscuras.



Figura 7. Hojas de *I. murucoides*: Lado izquierdo material vegetal de Sabanilla con coloración café y lado derecho material vegetal de Irámuco con plaga y coloraciones oscuras.

9.2 Determinación taxonómica de *I. murucoides*

El material vegetal de ambas de Irámuco 2014 y FES Iztacala 2014, fueron determinados por la profesora Ma. Edith López Villafranco en el herbario de la FES Iztacala (IZTA). El material vegetal fue integrado en la Colección Etnobotánica del Herbario Iztacala, con los siguientes números de registro.

Cuadro 4. Determinación taxonómica de *I. murucoides*.

| Nombre científico | Familia Botánica | Nombre Popular | No. de Registro | Procedencia |
|--|------------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| <i>I. murucoides</i> <i>Roem & Schult</i> | Convolvulaceae | “Cazahuate, palo bobo, casahuate” | 2379 IZTA | Irámuco, Guanajuato |
| <i>I. murucoides</i> <i>Roem & Schult</i> | Convolvulaceae | “Cazahuate, palo bobo, casahuate” | 2380 IZTA | FES Iztacala, Estado de México |

En la siguiente imagen se muestra el material vegetal que fue determinado e integrado a la Colección Etnobotánica de del Herbario Iztacala.



Figura 8. Material vegetal de *I. murucoides* de la FES Iztacala 2014, 2379 IZTA.

El material vegetal de Irámuco que se logró obtener estaba muy deteriorado y no se logró prensar pero la determinación fue exitosa.

La importancia de hacer la determinación taxonómica y tener un registro botánico, es: de validar la investigación y colaborar con la información sobre la diversidad biológica del área de estudio.

SEGUNDA ETAPA.

9.3 Obtención y rendimiento de los extractos

En esta sección se describirán las características y se discutirán los rendimientos de cada uno de los extractos. Todos eran de color verde oscuro de alta densidad.

El cuadro 5 muestra los rendimientos en porcentajes, el peso en gramos de los extractos y el peso del material vegetal que se utilizó.

Cuadro 5. Rendimiento de los extractos hexánicos, diclorometano y metanólicos de *I. murucoides*

| Grupos | Material vegetal (g) | Hexánico | | Diclorometano | | Metanólico | |
|-------------------|----------------------|----------|------|---------------|-----|------------|------|
| | | (g) | % | (g) | % | (g) | % |
| Sabanilla PF 2012 | 50 | 1.00 | 2.00 | 1.2 | 2.4 | 3.50 | 7.00 |
| Sabanilla PS 2012 | 50 | 0.76 | 1.5 | 0.74 | 1.5 | 4.45 | 8.9 |
| Irámucu PF 2012 | 50 | 0.19 | 0.4 | 4.9 | 9.8 | 3.37 | 6.74 |
| Irámucu PS 2012 | 50 | 1.19 | 2.4 | 2.71 | 5.4 | 5.10 | 10.2 |
| Irámucu 2014 | 22 | 0.85 | 3.9 | 1.03 | 4.7 | 7.85 | 15.7 |
| FES Iztacala 2014 | 90 | 2.07 | 2.3 | 1.68 | 1.9 | 11.30 | 22.6 |

En el cuadro se puede observar que la cantidad de gramos obtenidos en los extractos están relacionados con el tipo de solvente. A mayor polaridad, mayor cantidad de extracto. En la figura 9 se observa un patrón de crecimiento del porcentaje de los extractos, los más bajos en rendimiento son los extractos hexánicos, seguido de los de diclorometano (excepto Irámucu PF 2012) y finalmente los extractos metanólicos. En general, se puede observar que cuanto más polar es el solvente que se usó en la extracción, mayor es el rendimiento de los extractos. Este comportamiento se debe a múltiples factores, el principal es la naturaleza polar de los metabolitos secundarios.

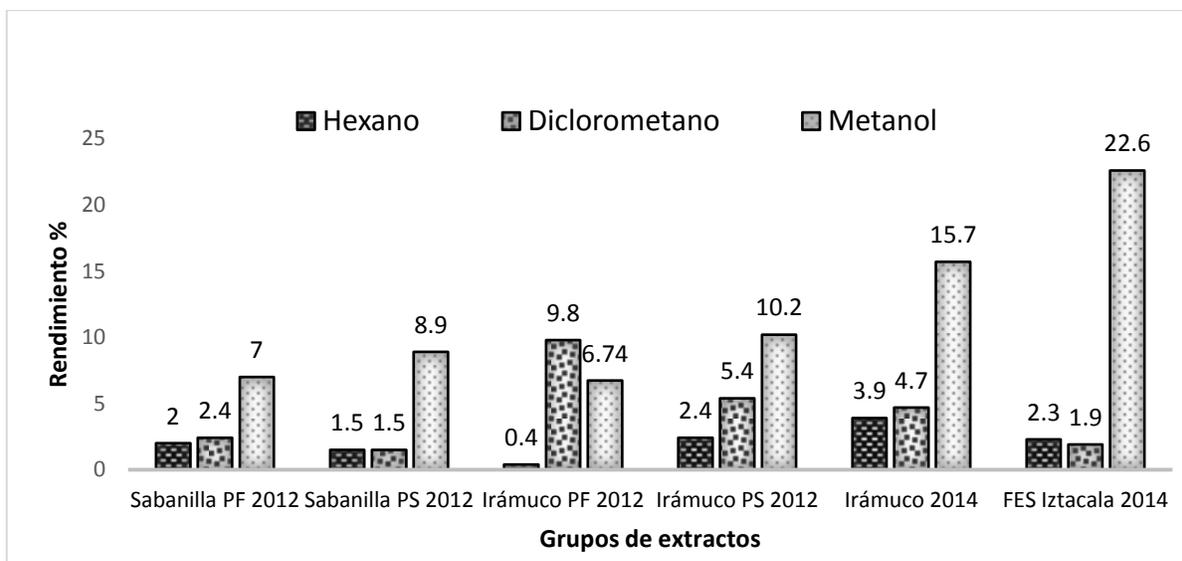


Figura 9. Rendimiento (%) de extractos de *I. murucoides*. En el eje X se muestran los grupos de extractos y en el eje Y se muestra el % de rendimiento.

Otros factores particulares del rendimiento para este trabajo son: respuesta al estrés y procesos reproductivos en los que algunos de los organismos se encontraban. A continuación se discutirán cada uno de estos aspectos.

1) Naturaleza polar de los metabolitos secundarios.

Los compuestos de una mezcla tienden a disolverse con solventes que son similares en su polaridad. Los solventes se clasifican en polares y no polares. Los primeros se establecen al interaccionar dos átomos de electronegatividad muy distinta y tienen un momento dipolar neto y los segundos poseen fuerzas débiles de unión, tipo dipolo inducido. De acuerdo con esto el tipo de compuestos que se obtuvo en los extractos corresponde con la polaridad de los solventes utilizados. Santizo en 2004 hizo la identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerífera* los extractos de acuerdo a su polaridad tendrán los siguientes metabolitos:

- Baja polaridad (hexano): Aceites esenciales, triterpenos, esteroides, carotenoides, ácidos grasos, alcaloides, agliconas flavonoides, cumarinas y emoides.

- Polaridad intermedia (diclorometano): terpenoides y fenoles metoxilados.
- Alta polaridad (etanol): Taninos hidrolizables, taninos condensados, alcaloides, aminas cuaternarias, antiocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracénoides, flavonoides, chalconas, lactonas insaturadas y antraquinonas.

La diferencia en la abundancia y diversidad de metabolitos polares o no polares radica en que la mayoría de los compuestos de los seres vivos son de naturaleza polar, ya que todos los seres vivos dependemos de una molécula que es polar, el agua. El agua no solamente constituye del 70 al 90 % del peso de la mayor de las formas vivas sino que representa la fase continua de los organismos (Solomon y cols, 2013). Por esta razón la mayor cantidad de los compuestos que se obtienen en extractos son de naturaleza polar.

El rendimiento entre los extractos hexánicos de Irámuco 2012 poseen diferencias entre peso fresco (PF) y peso seco (PS). Esto se debe a que el hexano es inmiscible con el agua, por esa razón el extracto de *I. murucoides* en peso fresco tiene menor rendimiento, ya que las hojas y tallos contienen una gran cantidad de agua. En cambio el extracto con hojas y tallos en peso seco posee un rendimiento mayor ya que el material vegetal no contenía mucha agua, esto hace posible una mejor extracción de compuestos (Sharapi, 2000).

Sin embargo el rendimiento de los extractos de polaridad intermedia (diclorometano) de ese mismo grupo tiene diferencias. El extracto de Irámuco peso fresco (PF) 2012 tiene mayor rendimiento que en peso seco. Al aumentar la polaridad en el proceso de extracción, existen mayores rendimientos de los extractos, debido a la afinidad que estos tienen con los solventes (Generaro, 2003)

2) Respuesta al estrés.

Las dos zonas de colecta de 2012 (Irámuco y Sabanilla) presentaron los porcentajes de rendimiento más bajos de todos los grupos, probablemente porque tenían factores de disturbio. Irámuco se encuentra aledaño con la Cuenca del Lago Cuitzeo, un cuerpo de agua muy contaminado por sedimentos, agroquímicos, aguas negras y residuos industriales (Bravo-Espinosa y cols, 2008).

Además *I. murucoides* de esta región presentaba una plaga, lo cual genera condiciones de estrés para los individuos. Por otro lado en Sabanilla la mayor parte de su territorio predomina la agricultura intensiva, las temperaturas son altas y la cantidad de agua disponible es muy poca. En general el hábitat de *I. murucoides* en estas regiones presentan modificaciones severas en factores bióticos y abióticos.

El ambiente en donde se desarrollan las plantas es muy complejo y de ello depende la producción de metabolitos primarios y secundarios. Se relaciona directamente con las condiciones meteorológicas, el tipo de suelo, los nutrientes disponibles, la competencia, herbivorismo y parasitismo. El factor que tal vez sea el más importante es la luz, debido a que esta estrechamente relacionado con la temperatura.

De la temperatura depende la actividad de las las isoenzimas, que son responsables de la correcta funcionalidad de las plantas, dichas isoenzimas tienen rangos de temperatura óptima a las que realizan una gran cantidad de reacciones (Duarte y cols, 2007). De acuerdo a lo anterior, podemos argumentar que los bajos rendimientos de los extractos de *I. murucoides* de Sabanilla son causados por el ambiente en donde se desarrolla, ya que se caracteriza por la alta incidencia de luz y temperatura.

Para el caso del material vegetal de Irámuco de ambas colectas (2012 y 2014), se puede apreciar que los rendimientos entre cada uno es muy distinto. En 2012 *I. murucoides* presentaba una plaga y de acuerdo con Wheeler y Ordnung en 2005 se ha visto que en muchas especies de plantas la síntesis de metabolitos secundarios aumenta cuando existen ataques de insectos u otros organismos. Sin embargo por el deterioro del ambiente en donde se desarrollan provocan que las plantas se encuentren sumamente estresadas y mucho más susceptibles a herbívoros o patógenos, teniendo así una disfunción generalizada.

Además la modificación del hábitat original conlleva la pérdida de nutrientes, que provoca poco desenvolvimiento y crecimiento en la parte aérea. Los procesos

fisiológicos actúan a diferentes ritmos dictados por los factores de competencia. Por ende la síntesis de metabolitos secundarios de *I. murucoides* de Sabanilla (2012) es baja comparada con los rendimientos de la recolecta de 2014.

El extracto de Irámuco PS 2012 de polaridad intermedia (diclorometano) tiene mayor porcentaje de rendimiento que el extracto metanólico del mismo grupo ya que existen una gran cantidad de compuestos de defensa que se caracterizan por tener esa polaridad. La producción de estos agentes de defensa se da en diferentes vías metabólicas como; los compuestos indólicos derivados de la ruta del ácido shikímico, mono y sesquiterpenos de la vía de isoprenoides, varios aldehídos y jasmonatos derivados de la vía de lipooxigenasa. Muchos de ellos son volátiles, poseen función antiherbívora y contra patógenos microbianos, son muy comunes en las partes aéreas (Srivastava, 2002).

Con respecto a los rendimientos de la FES Iztacala de 2014, que fueron los más altos. Se puede argumentar que se debe al ambiente en que el se desarrolla, que es menos hostil comparado con el de *I. murucoides* de Irámuco y Sabanilla

3) Procesos reproductivos.

Los ejemplares de Sabanilla 2012, Irámuco 2014 presentaban inicios de floración y FES Iztacala 2014 presento floración. La floración es un proceso que demanda energía, síntesis de compuestos y la activación de múltiples complejos para llevarla a cabo. La biosíntesis de compuestos se encuentran la hormonas que tienen una diversa composición química, van desde compuestos indol, terpenos, derivados de adenina, esteroides, hidrocarburos alifáticos, derivados de carotenoides y ácidos grasos (Srivastava, 2002).

Sin embargo de todos los ejemplares, los que presentaban el desarrollo completo de las estructuras florales eran los de la FES Iztacala. Como ya se ha mencionado, en el proceso reproductivo las plantas generan una mayor cantidad de metabolitos secundarios con la función atraer polinizadores y coloración de las flores. Los pigmentos y compuesto aromáticos de las flores poseen una diversa estructura química, localización celular y regulación genética. Durante la

polinización hay una gran emisión de terpenos volátiles. Las hormonas vegetales o llamadas fitohormonas no son producidas en glándulas especializadas pero sí en muchas partes de las plantas. Algunas de estas estructuras son las hojas y tallos (Jones y cols, 2013). Esta es otra de las posibles razones del porqué *I. murucoides* de FES Iztacala 2014, posee los porcentajes de rendimiento más altos.

TERCERA ETAPA.

9.4 Caracterización fitoquímica.

En esta sección se describirán y discutirán los resultados obtenidos en la tercera etapa que corresponde a todas las pruebas realizadas para la caracterización fitoquímica.

9.4.1 Obtención de los espectros de absorción de los extractos.

A los extractos hexánicos, diclorometano, metanol y acuoso de la colecta del 2012 de Irámuco y Sabanilla se les determinó su espectro de absorción en la región UV de 200 a 400 nm. Los resultados indicaron que tenían un comportamiento similar. En la siguiente figura se observa un gráfico y los máximos de absorción de los cromóforos presentes en los extractos de *I. murucoides* 2012.

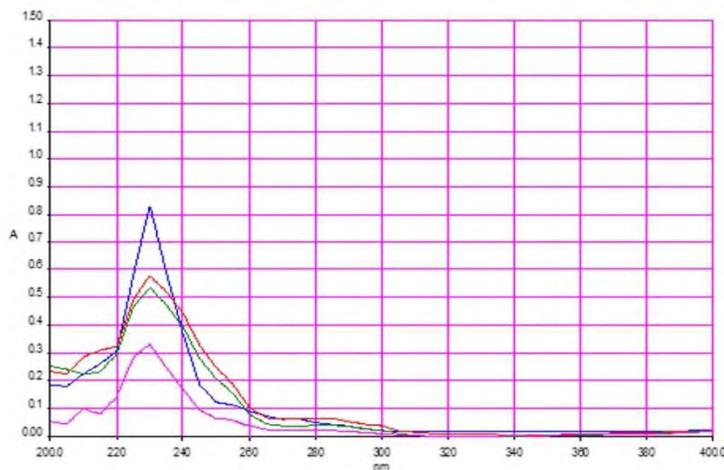


Figura 10. Espectro de absorción UV (200 a 400 nm) de los extractos de *I. murucoides* 2012.

Los picos de absorción de los extractos, van de los 200 a 240 nm, sin embargo aproximadamente a los 230 nm se encuentra el pico máximo de absorción. De acuerdo con Robinson en 1991, los compuestos orgánicos que absorben a esta

longitud de onda son: compuestos cíclicos con dobles ligaduras y algunos ácidos grasos insaturados.

Dependiendo de cada una de las familias o tipos de metabolitos secundarios tendrán un rango de absorción máxima. En el cuadro 6 se muestran los rangos de absorción UV, la familia de metabolitos secundarios que absorben a dichas longitudes de onda y la parte de la molécula que logra la absorción (Xu y cols, 2012)

Cuadro 6. Rangos de absorción UV entre 200 y 240 nm de familias de metabolitos secundarios (Xu y cols, 2012).

| Familias de Metabolitos Secundarios | λ max (nm) | Parte de la molécula que logra la absorción |
|--|--------------------|---|
| Lactonas sesquiterpénicas | 200-220 | Anillo de lactona |
| Flavonoides y fenilpropanoides. | 240-280 | |
| Glicósidos cardiatónicos | 220 | α , β - insaturado anillo de γ -lactona |
| Cromonas. | 240-250 | |
| Furanocumarinas. | 205-225 y 240-255 | |
| Agliconas insaturadas o Saponinas esteroidales insaturadas | 205-225 nm | No presentan absorción entre los 200 y 400 nm pero la introducción de un doble anillo en los grupos carbonilos, α , β -cetonas insaturadas |
| Lignanos; específicamente los dibenzilbutanos y benzofluranos. | 230 | Anillo de aromático |

Los resultados de absorción UV nos muestran dos aspectos, el primero; el tipo de familias de metabolitos secundarios que posiblemente forman la composición fitoquímica de *I. murucoides* y el segundo, que posee muy pocos compuestos capaces de absorber en la radiación de tipo UVB (280 a 315).

El tipo de compuestos que presenta en abundancia *I. murucoides* son los que absorben en la región de la luz UVC (200 a 280 nm). La estructura de un compuesto que absorbe en la longitud UVC básicamente posee pocos dobles enlaces conjugados. Este tipo de radiación cuando es absorbida a nivel molecular en los organismos trae una serie de consecuencias que va desde daños al ADN, los lípidos y las proteínas de todos los seres vivos. Los compuestos que absorben en esta longitud de onda, en plantas tienen la función de funcionar como un filtro para sólo hacer pasar la luz visible, que sirve para la fotosíntesis (García, 2010).

9.4.2 Separación cromatográfica

En esta sección se describen y discuten los resultados de cada una de las cromatografías empleadas para la caracterización fitoquímica de *I. murucoides*. Las cromatografías serán discutidas respecto al corrimiento de los compuestos dependiendo a su polaridad.

A) Cromatografía en Placa fina.

Extractos hexánicos.

En la figura 11 se observa una cromatografía de placa fina con los compuestos revelados (circulados) con solución sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado de los extractos de 2012 y los valores Rf correspondientes a cada uno.

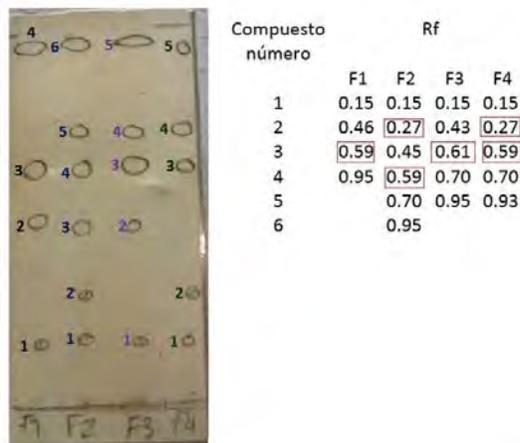


Figura 11. Cromatografía de placa fina de extractos hexánicos de *I. murucoides* 2012. F1: Sabanilla peso seco, F2: Sabanilla peso fresco, F3: Irámuco peso seco y F4: Irámuco peso fresco.

La fase móvil que mostró mejor resolución de separación fue tolueno-acetato de etilo (7:3). La placa se reveló con vainillina y ácido sulfúrico, de acuerdo con Wagner y Cols 1984. Los extractos hexánicos de *I. murucoides* de 2012, poseen compuestos de varias polaridades.

Los compuestos con valores Rf cercanos a 0.6 y 0.27, que se encuentran en casillas de color rojo, pueden corresponder a citronellal y linalool respectivamente, ambos compuestos son monoterpenos (Wagner y cols, 1984). El citronellal se encuentra dos aceites esenciales; el aceite de las hojas de *Eucalyptus citriodora* o en el aceite de *Java citronella*. El valor máximo de absorción UV es la los 285 nm (Krishnaswamy, 2012).

Este tipo de pruebas no es tan exacta como las automatizadas, para llegar a saber con certeza que compuestos son los que están presentes en los extractos, sin embargo pueden brindar información de la composición de los extractos.

Extractos diclorometano.

La siguiente figura muestra una cromatografía de placa fina de los extractos de la colecta de 2012, con las manchas reveladas circuladas.

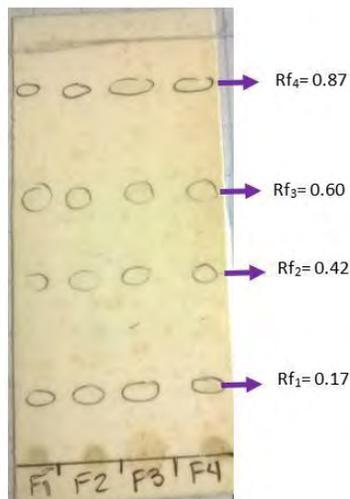


Figura 12. Cromatografía de placa fina de los extractos de polaridad intermedia (diclorometano) de *I. murucoides* de 2012. F1: Sabanilla peso seco, F2: Sabanilla peso fresco, F3: Irámuco peso seco y F4: Irámuco peso fresco.

La fase móvil ideal para los extractos de 2012 fue hexano-acetato de etilo (8:2). Se puede observar que existe una uniformidad en el número y posición de los compuestos revelados de los extractos provenientes de localidades diferentes. Con esta prueba se puede interpretar que la composición de metabolitos secundarios de polaridad intermedia de *I. murucoides* de 2012 es muy similar.

Extractos metanólicos.

La siguiente figura muestra una cromatografía de placa fina de los extractos metanólicos de *I. murucoides* de 2012.

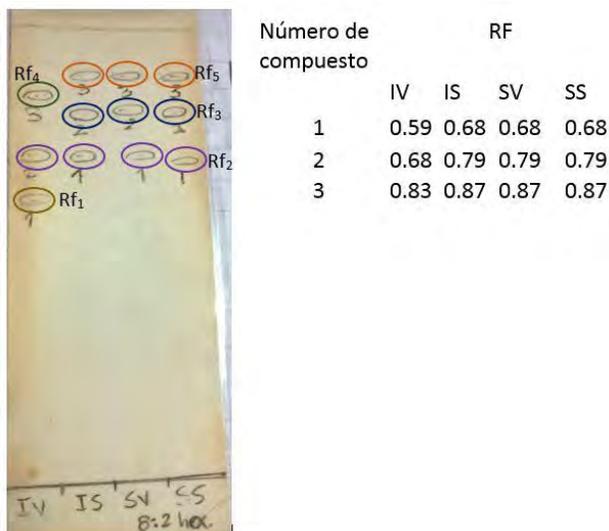


Figura 13. Cromatografía de placa fina de los extractos metanólicos de *I. murucoides* de 2012. IV: Irámuco peso fresco, IS: Irámuco peso seco, SV Sabanilla peso fresco, SS Sabanilla peso seco.

La fase móvil ideal fue una mezcla de metanol-hexano (8:2), se puede observar que los extractos que presentan una similitud entre los compuestos revelados son los de Irámuco peso seco, Sabanilla peso fresco y Sabanilla peso seco. El único extracto que presenta una composición diferente es el de Irámuco peso fresco. En estos extractos cabe resaltar que los compuestos revelados son de polaridad intermedia.

La figura 15 muestra una cromatografía de placa fina de los extractos obtenidos en 2014.

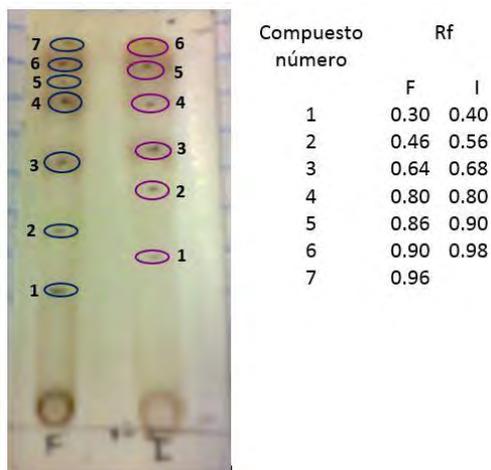


Figura 14. Cromatografía de placa fina de los extractos metanólicos de *I. murucoides* de 2014. F: FES

Iztacala, I: Irámuco.

La fase móvil ideal para el corrimiento de los extractos metanólicos de 2014 fue una mezcla de acetato de etilo-metanol (1:9). Se pueden observar que existen diferencias entre la composición de los extractos de FES Iztacala e Irámuco. La composición de los extractos metanólicos de 2014 respecto a sus valores R_f son de polaridad intermedia y alta. El único valor R_f (0.80) que es igual entre ambas muestras es el número 4, parece que es el único compuesto que ambos extractos tienen en común.

Este tipo de cromatografía ha permitido; determinar número de compuestos revelados en los extractos de las diferentes localidades y temporadas. Se ha reportado que gracias a la naturaleza del gel sílice, separa sustancias como alcoholes, aminas y ácido carboxílicos. La retención y la selectividad en la separación depende de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar y están en función de: la polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes y naturaleza del disolvente (Facultad de Química, 2007).

B) Columna abierta.

De la cromatografía de columna abierta de *I. murucoides* en peso seco de Irámuco (2012, se recolectaron 99 alícuotas de 25 ml, las cuales se destilaron a presión reducida y se analizaron por ccf. De acuerdo a su patrón cromatográfico se reunieron 12 fracciones, el cuadro 7 muestran los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes.

Cuadro 7. Fraccionamiento del extracto hexánico de *I. murucoides* procedente de Irámuco, 2012.

| Eluyente | Proporción | Alícuotas recolectadas | Fracciones combinadas | Clave de la fracción |
|---|------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 95:05 | 1 – 10 | 1 – 11 | A |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 90:10 | 11 – 20 | 12 – 20 | B |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 80:20 | 21 – 30 | 21 – 26 | C |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 70:30 | 31 – 40 | 27 – 34 | D |
| | | | 35 – 40 | E |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 60:40 | 41 – 50 | 41 – 53 | F |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 50:50 | 51 – 60 | 54 – 66 | G |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 40:60 | 61 – 70 | 67 – 73 | H |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 30:70 | 71 – 80 | 74 – 82 | I |
| C ₆ H ₁₄ - C ₄ H ₈ O ₂ | 20:80 | 81 – 90 | 83 – 90 | J |
| C ₄ H ₈ O ₂ | 100 | 91 - 96 | 91 – 96 | K |
| CH ₃ OH | 100 | 97 - 99 | 97 - 99 | L |

Las fracciones A, E, G, I y L se analizaron en cromatografía de gases acoplada a espectro de masas (CG/EM), ya que eran las que mostraban mejor resolución en cromatografía de placa fina. Debido a los bajos rendimientos de las demás fracciones, estas no fueron analizadas.

C) Cromatografía de Gases acoplada a Espectro de Masas (CG/EM)

Los extractos y fracciones que se analizaron con esta técnica fueron:

- Fracciones A, E, G, I y L del extracto hexánico de Irámuco peso Seco de 2012.
- Hexánicos de 2012 (IF, SF y SS)
- Hexánicos de 2014 (Irámuco y FES Iztacala)
- Diclorometano de 2012 (IS, SF y SF)
- Diclorometano de 2014 (Irámuco y FES Iztacala)

EXTRACTOS HEXÁNICOS

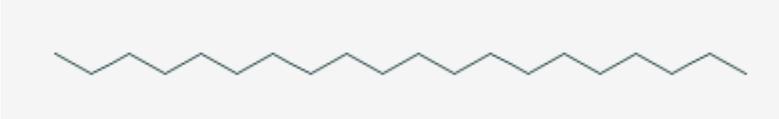
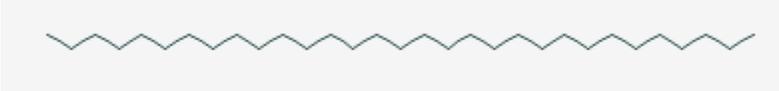
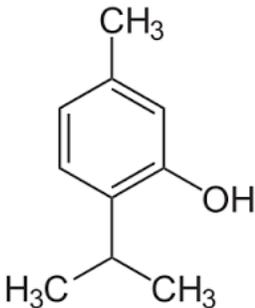
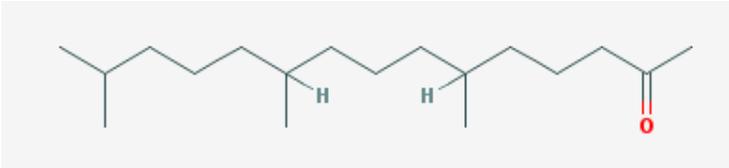
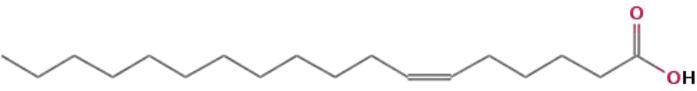
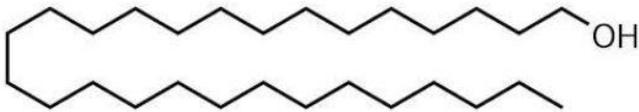
El cuadro 8 se observan los compuestos que presentaron la mayor cantidad relativa (%) de los extractos hexánicos de *I. murucoides*.

Cuadro 8. Compuestos identificados por CG/EM en los extractos hexánicos de *I. murucoides*.

| Procedencia | Porcentaje (%) | Compuesto |
|-----------------------|----------------|----------------------------------|
| Fracción G | 85.78 | Eicosano |
| Fracción I | 51.62 | Hentriacontano |
| Fracción L | 40.88 | Timol |
| Sabanilla peso Fresco | 35.60 | 6,10,14 trimetil-2 pentadecanona |
| Sabanilla peso Seco | 29.05 | Ácido 6-octadecanoico |
| Fracción E | 19.22 | 1-octacosanol |
| Fracción G | 14.22 | Heptadecano |

Cabe mencionar que se seleccionaron los compuestos que fueron detectados en cada uno de las fracciones que se analizó por CG/EM. Los criterios para hacer la selección fueron; porcentaje relativo de la muestra, probabilidad de detección exitosa y en búsqueda bibliográfica se buscó que no fueran agentes contaminantes de los solventes, sino productos naturales. En el cuadro 9 se ilustran las estructuras de cada uno de los compuestos mayoritados de los extractos hexánicos.

Cuadro 9. Estructura de los compuestos mayoritarios de los extractos hexánicos de *I. murucoides*

| Compuesto | Tiempo de retención | Estructura |
|----------------------------------|---------------------|--|
| Eicosano | 16.54 |  |
| Hentriacontano | 16.59 |  |
| Timol | 8.04 |  |
| 6,10,14 trimetil-2 pentadecanona | 12.64 |  |
| Ácido 6-octadecanoico | 18.55 |  |
| 1-octacosanol | 13.22 |  |
| Heptadecano | 14.00 |  |

- **Eicosano**

Es un alcano de 20 carbonos que se ha encontrado en el aceite esencial del extracto orgánico *Cestrum nocturnum*. También se ha encontrado en las flores de *Allium atrovioleaceum*, contribuye a la actividad antimicrobiana del extracto. El eicosano y fitol han sido reportados por ser constituyentes en el extracto de *Aloe vera*, con alta actividad antimicrobiana contra patógenos clínicos (Yogeswari, 2012).

En 2012 Fred-Jaiyesimi y cols, en su estudio del extracto hexánico de *B. coriacea* han encontrado que la mezcla de heptadecanos, tetradecanos y eicosanos exhiben una fuerte actividad antimicrobiana.

- **Hentriacontano**

El n-hentriacontano es probablemente un compuesto antitumoral, es un hidrocarburo saturado de 31 carbonos que aparentemente es responsable de la susceptibilidad de las plantas a las enfermedades. Se ha demostrado que ayuda en la absorción de agua del suelo por la planta y estar involucrado en la estimulación de la germinación de las esporas de hongos (Atolani y Olatunji, 2010).

Serrato y cols en 2015 han reportado que la organogelación de la cera de candelilla es un método prometedor para proporcionar estructura a los alimentos sólidos, como base de grasa, cosméticos y sistemas de administración de fármacos. El componente principal es el n-hentriacontano el cual mantiene constante su temperatura de fusión independientemente de la mezcla de ceras y otros lípidos que existen en el extracto de candelilla.

Además Tessmann y Dianese en 2002 han reportado que el extracto de las hojas de *Syzygium jambos* que fue fraccionado en una columna y probado en un bioensayo de la germinación de las urediniosporas de *Puccinia psidii* (hongo) para determinar si inhibía el proceso de infección. Descubrieron que la fracción que tuvo más actividad sobre la germinación fue la que contenía hentriacontano. Este resultado contribuye al mejor entendimiento del proceso de infección del moho.

También se ha encontrado hentriacontano en el estudio de Mahmoud y cols 2014, en la partición con éter del extracto etanolico de *Chorisia insignis* que es conocida con actividad antimicrobiana. El resultado del análisis fue que 50 compuestos constituyen el 95.81% del total del área total de los picos. El n-Hentriacontano representó el 21.45%, siendo el mayor constituyente.

En la fracción L del extracto hexánico de *I. murucoides* de Iramuco PS de 2012 se encontró que el hentriacontano tiene un 51.62%. Al ser este compuesto un agente de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades en plantas provocas por hongos, hace que *I. murucoides* de esta región sea muy vulnerable para ser atacada por estos organismos.

- **Timol**

El timol, conocido igual como isopropilmetacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol. Es un agente antimicrobiano (retarda el crecimiento o causa la muerte de los microorganismos). El timol es un compuesto que ha sido probado contra diferentes microorganismos de importancia alimenticia. Se ha evaluado su actividad antimicrobiana y posee los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos. En bacterias Gram negativas, el timol desintegra la membrana externa, permitiendo la salida de liposacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. En *S. aureus* une las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno, cambiando las características de permeabilidad de la misma (García y cols 2008).

Se ha demostrado que el timol tiene mejor actividad en sinergia con el carvacrol. Este tipo de compuestos pueden ser usados como tratamiento en Alzheimer. Las especies de plantas que contienen niveles elevados de timol son *Citrus limón*, *Trachyspermum ammi*, *Mondarda punctata*, *Thymus vulgaris* y *Pycnanthemum nudum*. También se ha detectado como un compuesto antiinflamatorio (Cseke y cols, 2006).

El porcentaje identificado en la fracción L del extracto hexánico de *I. murucoides* de la región de Irámuco fue del 40.88 %.

- **6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona**

La 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona está clasificada como un sesquiterpeno oxigenado. En un estudio sobre la composición aromática de tés negros chinos se ha encontrado este compuesto con porcentajes de 2.36 y 7.92%. Se ha concluido que cada uno de los compuestos encontrados en infusiones posee un papel crucial en el olor y su calidad (Lv y cols, 2014).

En la caracterización química y evaluación de actividad antimicrobiana de los compuestos volátiles de *Minuartia meyeri* (Caryophyllaceae). Se detectó que el 5% fue de 6,10,14- Trimetil-2-pentadecanona (Yatli y cols, 2006).

Terminalia catappa es usada en la medicina tradicional de Taiwan, se afirma que posee efectos terapéuticos en enfermedades relacionadas con el hígado, la forma en que se usa es como bebida. Además se ha reportado que los aceites esenciales de esta especie tienen actividad biológica, incluidas la antimicrobiana y propiedades antioxidantes. El porcentaje de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona en los extractos de las hojas color verde es 28.35%, en hojas color amarillo oscuro es 11.98% y para las hojas de color rojo es de 15.03%. En este estudio se clasifica a 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona como una cetona que presentaba un aroma ligeramente graso (Maua y cols, 2003).

Mahmoud en 2013 hizo la caracterización química de los botones florales de *Lupinus varius* que se clasifica en la familia Leguminosae o Fabaceae. El mayor componente del aceite esencial es 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona con el 20.5%, en este estudio lo clasifican como un sesquiterpeno oxigenado.

Ogunwande y cols en 2011 detectaron 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona en la especie *Ficus elastica* (Moraceae), con un 25.9% de rendimiento. Esta especie no es característica de producir mucho color o fragancia en sus flores para atraer otros polinizadores. Este compuesto se ha encontrado en otras especies de la misma familia.

El rendimiento de 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona en el extracto hexánico de *I. murucoides* de Sabanilla 2012, es mayor a lo reportado en la literatura sobre la

composición química de otras especies. Este compuesto por lo que se ha encontrado, atribuye a esta especie su olor característico y algunas actividades biológicas importantes como, la antimicrobiana y antifúngica.

- **Ácido-6-octadecanoico**

El ácido-6-octadecanoico es conocido como ácido petroselínico ($C_{18}H_{34}O_2$), es un ácido graso libre, puede ser un éster de ceras ó mono, di o triglicéridos. Su uso es el de proporcionar buenas propiedades de textura a la comida, mientras que no elevan los niveles del LDL-colesterol en el suero sanguíneo. Se ha documentado que ciertos ácidos grasos se pueden usar como agentes antiinflamatorios, entre ellos se encuentra el ácido petroselínico (Unilever, 2006).

También tiene efecto antienvjecimiento y se puede incrementar de modo sinérgico usando el derivado del ácido petroselínico en combinación con uno o más antioxidantes. Se han hecho composiciones comestibles que contiene ácido petroselínico, se usa como un componente antienvjecimiento que estimula los niveles de decorina con un impacto positivo en afecciones cutáneas. Ayuda a prevenir notablemente los signos visibles de la piel arrugada y/o foto dañada (Unilever, 2006).

El perejil es una hierba aromática de la familia Apiaceae, entre su caracterización química, presenta el ácido petroselínico o ácido 6 octadecanoico. El ácido petroselínico es un isómero del ácido oleico. Existen muchas investigaciones orientadas en la búsqueda de agentes antienvjecimiento y se ha encontrado que es posible el uso de derivados del ácido petroselínico, ya que estimula dos proteínas estructurales de la piel: colágeno y decorina (Reyes-Munguía, 2012).

VijisaraI y Arumugam en 2014 han reportado en *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae) conocida como añil, con el 18.47% de ácido-6-octadecanoico. En la medicina tradicional es usada para tratar la fiebre, dolor de cabeza, hemorragias, tos aguda y parásitos de la piel.

Entre la composición fitoquímica de *I.murucoides* el ácido-6-octadecanoico representa un alto porcentaje comparado con *I. suffruticosa*. Se podría mejorar el método de extracción para hacer uso potencial de este ácido en las diferentes

industrias en donde ya ha sido reportado y patentado. La estructura de este ácido graso insaturado es la siguiente.

- **1-Octacosanol**

1-octacosanol también conocido como n-octacosanol, alcohol octadecilo, alcohol cetílico, alcohol Montany. Es una cadena lineal alifática con un alcohol primario de 28-carbonos que es común en las ceras epicuticulares de plantas, incluidas las hojas de muchas especies de *Eucalyptus*, de la mayoría de hierbas forrajeras y de cereales, de *Acacia*, *Trifolium*, *Pisum* y muchos otros géneros de leguminosas entre muchos otros, a veces como el principal constituyente de cera. El octacosanol también está presente en el germen de trigo (Shaji y cols, 2015).

El policosanol, que es una mezcla de 1-octacosanol, tricostanol y otros alcoholes de ácidos grasos de cadena larga han sido usados en el tratamiento de la hiperlipidemia, es un desajuste metabólico que consiste en tener niveles elevados de los lípidos en la sangre. En los estudios más recientes se ha demostrado que el 1-octacosanol posee actividad proapoptótica y antiangiogénica (Shaji y cols, 2015)

Oliveira y cols en 2012 aislaron al 1-octacosanol de la fracción hexánica del extracto etanólico de las hojas de *Sabiecea grisea* (Rubiaceae), que es una planta endémica de Brasil. Se determinó que el octacosanol posee efectos antiinflamatorios y anticonceptivos. Entre otras actividades biológicas importantes, se incluye la antioxidante, ergogénicas (recuperación de energía) y anti párkinson (Wang y cols, 2010).

Al ser este compuesto usado en diferentes padecimientos y aplicaciones es conveniente mejorar el método de extracción en *I. murucoides* para un mayor rendimiento, ya que se ha obtenido el 19.22% en la fracción hexánica proveniente de Irámuco 2012.

- **Heptadecano**

El heptadecano es un compuesto volátil, se ha encontrado en el extracto acuoso de las hojas de *Lepidagathis cristata* (Acanthaceae) se aislaron compuestos con potencial antifúngico contra *Colletotrichum fulcatum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata* y *Microsporum canis*. Esta planta es usada

en pequeños tónicos en fiebres, neumonía, gripe, infecciones bucales, eczema, psoriasis y otras infecciones de la piel. De los compuestos con mayor actividad se encuentra el heptadecano (Abubacker & Devi, 2015).

En 1998 Gary y Dustan estudiaron la variedad de los compuesto volátiles de *Microsistis aeruginosa* en condiciones de irradiación de hierro. Detectaron que el heptadecano es el hidrocarburo alifático más abundante en los diferentes tratamientos de radiación. La producción de compuestos volátiles tóxicos en esta cianobacteria es para inhibir los efectos de la fotoxidación por la radiación. Llegaron a la conclusión que el heptadecano es un compuesto alelopático.

De acuerdo con lo reportado en anteriores estudios el heptadecano tiene múltiples usos en la medicina tradicional y uso en otros padecimientos, es un compuesto de gran importancia médica. En este estudio *I. murucoides* presenta el 14.22% en la fracción del extracto hexánico de Irámuco 2012, lo cual la hace una especie interesante para obtener este compuesto.

EXTRACTOS DICLOROMETANO

Ahora se presentaran los resultados obtenidos del análisis por CG/EM de los extractos de polaridad intermedia (diclorometano).

Cuadro 10. Compuestos identificados por CG/EM en los extractos de diclorometano de *I. murucoides*.

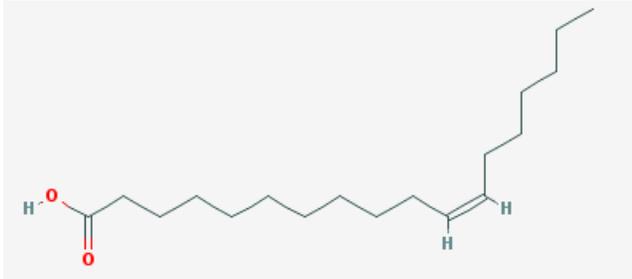
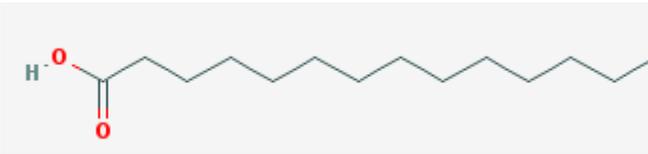
| Procedencia | Porcentaje (%) | Compuesto |
|------------------------|----------------|---|
| Irámuco peso Seco 2012 | 16.72 | Tricosano |
| Irámuco 2014 | 14.72 | Ácido 11-octadecenoico |
| Irámuco 2014 | 7.35 | Ácido hexadecanoico |
| FES Iztacala 2014 | 5.48 | 1-Docosano |
| Irámuco 2014 | 5.48 | 9-cis metil, 11-trans octadeca dienoato |
| FES Iztacala 2014 | 4.94 | 1-Eicosanol |
| FES Iztacala 2014 | 4.87 | 5-Eicosano |

Como se puede observar los rendimientos (cuadro 10) de los compuestos identificados por CG/EM en los extractos de diclorometano son menores comparados con los compuestos de los extractos hexánicos. Además en los extractos de diclorometano se lograron identificar compuestos de todas las muestras, a diferencia de los compuestos hexánicos en los que sólo en los extractos de 2012 se identificaron metabolitos secundarios. A continuación el

cuadro 11 muestra las estructuras de los principales compuestos de de los extracto de diclorometano.

Podemos observar que el compuesto identificado con mayor rendimiento es el tricosano (16.72%) y el compuesto con menor rendimiento es el 5-eicosano (4.87%).

Cuadro 11. Estructura de los compuestos mayoritarios en extractos de diclorometano de *I. murucoides*.

| Compuesto | Tiempo de retención | Estructura |
|------------------------|---------------------|--|
| Tricosano | 29.77 y 31.39 |  |
| Ácido 11-octadecenoico | 22.16 |  |
| Ácido hexadecanoico | 20.02 |  |
| 1-Docoseno | 23.12 |  |
| 1-Eicosanol | 22.09 |  |
| 5-Eicosano | 20.80 |  |

- **Tricosano**

El tricosano es un hidrocarburo de fórmula molecular $C_{23}H_{48}$. Este compuesto representa entre el 26.5 y 32.4% de los compuesto volátiles característicos del olor de algunos híbridos de *O.lupercalis* y *O.iricolor*, especies que pertenecen al género de las orquídeas. La composición volátil de estos híbridos es muy importante para atraer sus polinizadores específicos, que son abejas. La atracción se basa en la imitación de la feromona sexual femenina de estas abejas. Los cambios en el aroma floral pueden conducir a la hibridación, introgresión y posiblemente la especiación. Este estudio demostró que el olor puede ser el primer paso para especiación y al mismo tiempo provocar el desplazamiento de una especie (Stökl y cols, 2008).

Otro estudio relacionado con la selectividad de polinizadores es del Miraldia y cols en 2011. En donde se encuentra que el tricosano constituye el 22.9% del aceite esencial de flores de *Spartium junceum*. Ellos concluyen que los hidrocarburos constituyen un aspecto importante que regula la sensibilidad de los insectos en la selección de la planta huésped.

Fitsioua y cols en 2011 reportan que en las flores de *Tilia tomentosa* y *Tulia cordata*, uno de los componentes principales es el tricosano, varía del 21.5% al 31.3% de los componentes volátiles de estas flores. Así mismo en 2007, Ariza y cols reportan que *Posoqueria latifolia* (Rubiácea) presenta un olor perfumado muy agradable que se intensifica en las horas de la noche. De los compuesto mayoritarios del absoluto se encuentra el tricosano con el 5.9%.

Como se puede observar este hidrocarburo representa una parte muy importante del olor en diferentes especies y su función principal es atraer a polinizadores para lograr la reproducción y así la subsistencia de la especie. En todos los estudios ya citados se presenta este compuesto en las flores, sin embargo en este estudio, *I. murucoides* el tricosano representa el 16.72% del extracto de hojas, proveniente de Irámuco 2012 en peso seco, a pesar de que en ese momento no se detectaron flores en la planta.

- **Ácido 11 octadecenoico**

El ácido-11-octadecenoico es un ácido graso. En 1960 Chisholm and Hopkins Examinaron la composición del aceite de semilla de *Asclepias syriaca* (Asclepidaceae), entre los mayores constituyentes de ácidos grasos, se encuentra el ácido 11-octadecenoico o también llamado ácido asclepico. Este ácido graso forma un 15% de la composición total de ácidos grasos del aceite.

En 2002 Martínez-Force y cols reportaron la composición de ácidos grasos modificada. Esta invención se basó en el aceite de girasol y los contenidos de los diferentes ácidos grasos para hacer un producto competente para industria alimenticia, ya que requieren una alta termoestabilidad o grasas plásticas. Las grasas animales han sido sustituidas en los últimos años por grasas vegetales hidrogenadas que no contiene colesterol.

Sin embargo dichas grasas hidrogenadas presentan otro problema derivado de la hidrogenación. Ya que en dicho proceso tiene lugar a la isomerización de posición (desplazamiento de los dobles enlaces) y las transformaciones estereoquímicas (formación de isómeros *trans*). Se producen isómeros en una cantidad de hasta 30-50% del total de ácidos grasos. Estos isómeros no son muy saludables desde el punto de vista nutricional, por lo que en la industria alimentaria deben evitarse. El ácido asclepico (isómero de n-7 del ácido oleico) es menor al 4% en la composición del aceite de girasol (Martínez-Force, 2002).

La medicina tradicional de la India ha usado a *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae), una hierba para tratamiento de la diabetes en adultos. La acción hipocluémica de las hojas fue descrita por primera vez en 1930, las cuales elevan los niveles de insulina, esto posiblemente por la regeneración de las células β en el páncreas. Las hojas de *G. sylvestre* ayudan a disminuir el colesterol sérico y los triglicéridos (Joffe, 2001).

La industria alemana Traditional Ayurveda Health Care (https://www.apimanu.com/pdf/produkte/products_spanish/diabgymna.pdf), ha

desarrollado un complejo alimenticio del extracto de *Gymnea sylvestre*. El componente antidiabético activo es el ácido gimneico (ácido asclepico). En ayunas disminuye: la glucosa, la necesidad de la insulina, HbA1c y del contenido proteico del plasma, no se han observado efectos secundarios. Por lo tanto puede favorecer y apoyar la producción endógena de insulina en diabetes mellitus tipo 2..

Este ácido graso compone el 14.72% del extracto de diclorometano de *I. murucoides* proveniente de Irámuco 2014. Lo cual la hace una especie referente para la obtención de este ácido graso que tiene interés en la industria alimenticia, cosmética y médica.

- **Ácido hexadecanoico**

Uno de los ácidos grasos más común en plantas es el ácido hexadecanoico o conocido como ácido palmítico. El ácido palmítico tiene una cadena de hidrocarburos saturada. Se encuentra en componentes de los aceites y las ceras de las plantas (Cseke y cols, 2006).

Hérrnandez-Aro y cols s/a, reportaron que en la fracción de menor polaridad del extracto de *I. batatas* se identificaron ácidos grasos; los más abundantes fueron el ácido palmítico y ácido linoléico. En este estudio el ácido hexadecanoico representa el 7.35% de la composición del extracto de diclorometano de *I. murucoides* de Iramuco 2014.

- **1-Docoseno**

El 1-docoseno es un ácido graso con fórmula molecular $C_{22}H_{44}$. Girme y colaboradores en 2014 reportaron que es uno de los componentes de *Sarcostemma viminale* (Asclepiadaceae). Esta planta se conoce como “soma” en la India. Esta investigación revela actividad antibacteriana moderada de la planta.

Koelmeyera coriacea (Clusiaceae) es una planta medicinal de Brasil, usada en tratamiento de parásitos, infecciones bacterianas y fúngicas (Alves y cols, 2000). Se ha reportado la acción del extracto clorofórmico en melanoma de una línea celular de roedores, además muestra una fuerte actividad citotóxica, ya que inhibe

un factor de crecimiento y la migración de tumores. Por otra parte reduce el número de melanomas metastásicos. Entre los componentes de mayor porcentaje del extracto clorofórmico se encuentra el 1-docoseno con 16.59 % y el 1-eicosanol con el 18.46% (Figuerido y cols, 2014).

Gurnania y cols en 2015 estudiaron el potencial antimicrobiano y antioxidante del extracto de las semillas del chile (*Capsicum frutescens*). Los extractos que se elaboraron, fueron hexánico y clorofórmico. Se demostró *in vitro* que los extractos de las semillas previenen el crecimiento de muchos de los patógenos empleados, ya que inhiben de forma significativa las zonas de crecimiento. La actividad inhibitoria fue especialmente contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, uno de los componentes de estos extractos es el 1-docoseno.

El porcentaje obtenido de 1-docoseno en el extracto de diclorometano de *I. murucoides* de la FES Iztacala 2014 es del 5.48%. De acuerdo con lo reportado en otros estudios, este compuesto puede brindar protección contra algunos microorganismos.

- **1-Eicosanol**

El 1-eicosano es un alcohol graso. Un alcohol graso se define como; una serie de hidrocarburos alifáticos que contienen un grupo hidroxilo, por lo general en la posición terminal, poseen un número mayor de 8 a 10 átomos de carbono. La síntesis de los alcoholes grasos por organismos vivos, está íntimamente ligada con la producción de ácidos grasos. Los alcoholes grasos están asociados principalmente con ceras y lípidos de almacenamiento. Se usan en las industrias farmacéutica, de detergentes y plásticos (Mugde, 2005). En la figura 16 se observa la estructura genérica de los alcoholes grasos.



Figura 16 . Estructura genérica de los alcoholes grasos.

Las ceras son abundantes en las plantas, ya que recubren sus superficies, están compuestas de alcoholes de cadena larga unidos a través de un puente éster de ácidos grasos y tienen la propiedad de ser sólidos a temperatura ambiente y líquidos a temperaturas más altas. Las ceras tienen varias funciones biológicas esenciales, incluyendo la pérdida de agua evitando, a la abrasión y la infección (Mudge, 2005).

Kether y cols en 2012 estudiaron la composición química de las partes aéreas de *Cotula coronopifolia*, entre los compuestos más importantes de las hojas, detectaron al 1-eicosanol con mayor abundancia en tallos (17.1%) y raíces (14.6%). También probaron la actividad antifúngica de la composición volátil de *C. coronopifolia*, detectando efectos de inhibición fúngica. Esta actividad tal vez es atribuida a la presencia de 1-eicosanol, hexacosano y heptacosano, encontrados en el aceite esencial.

El 1-eicosanol representa el 4.94% de la composición del extracto de diclorometano de *I. murucoides* de FES Iztacala 2014, el cual forma parte de las ceras de la cubierta de los tallos y hojas, brindándole a la planta funciones de protección e inhibición de crecimiento de agentes patógenos.

- **5-Eicosano**

El 5-eicosano representa el 4.87% de la constitución del extracto de diclorometano de *I. murucoides* de FES Iztacala 2014. Fred-Jaiyesimi en 2012, hace un estudio de la composición del extracto hexánicos de las semillas *Bucchozia coriácea*, conocido como almizcle, reportando el 0.77% de este compuesto.

D) Cromatografía preparativa de los extractos metanólicos de *I. murucoides*.

En la figura 17 se muestran las imágenes de dos de las placas preparativas de los extractos metanólicos de *I. murucoides* de Irámuco peso seco 2012 y FES Iztacala 2012 con y sin luz UV. Como se puede observar ambas poseen patrones de corrimiento diferentes entre si.

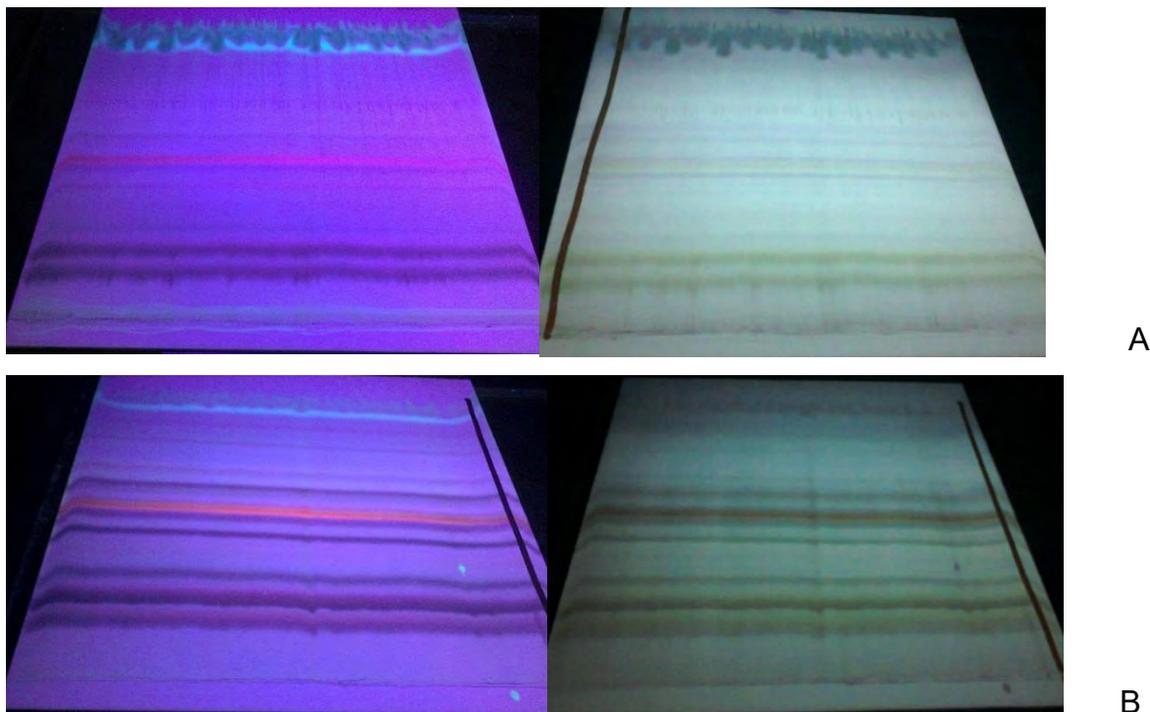


Figura 17. Placas preparativas. Izquierda revelada con luz UV y derecha sin luz UV. A) IS 2012 B) FES Iztacala 2014

Los valores Rf de los extractos metanólicos de 2012 se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Valores Rf de los componentes de los extractos metanólicos. IF Irámuco peso fresco, IS Irámuco peso seco, SF Sabanilla peso fresco, SS Sabanilla peso Seco.

| Extracto | Valores RF | | | | | |
|----------|------------|------|------|------|------|------|
| IF | 0.38 | 0.47 | 0.52 | 0.75 | 0.83 | |
| IS | 0.33 | 0.77 | 0.81 | 0.86 | 0.91 | 0.94 |
| SF | 0.36 | 0.44 | 0.69 | 0.75 | 0.82 | 0.91 |
| SS | 0.36 | 0.75 | 0.8 | 0.86 | 0.91 | |

E) Cromatografía líquida de alta resolución HPLC de las fracciones de los extractos metanólicos

En esta sección se discuten los resultados obtenidos en la cromatografía líquida de alta resolución de las fracciones de mayor rendimiento (g) obtenidas de las placas preparativas de los extractos metanólicos. Al no tener un patrón, los picos de absorción máximos se compararon con el compendio de Waksmundzka-Hajnos y Sherma 2010, de acuerdo con el método y el tipo de columna que se utilizaron para el análisis.

Los resultados que se muestran, son aproximaciones al tipo de compuestos que probablemente se obtuvieron, esto, de acuerdo con el tipo método de extracción, método analítico en HPLC y el pico de absorción de los picos. Recordemos que el detector que se utilizó fue de arreglo de diodos con un rango de 200 a 750 nm con detección a 254 nm. En el cuadro 13 se muestran los compuestos que posrían encontrarse en *I. murucoides*.

Cuadro 13. Resultados de la cromatografía líquida de alta resolución de los extractos metanólicos

| Muestra | λ max | Probables compuestos con base en la literatura | Función | Referencia |
|-------------------|---------------|--|---|-------------------------|
| FI 2014 | 210 | Glicolípido en hojas de <i>Ipomoea batatas</i> | | Napolitano y cols, 2007 |
| IS 2012 y FI 2014 | 254 | Compuestos fenolicos en <i>T. mongolicium</i> | Como tratamiento contra procesos inflamatorios e infecciosos. | Shi y cols, 2008 |
| | | Ácidos fenólicos de plantas medicinales | | Wen y cols, 2005 |
| | | Giberelinas y citokininas | Hormonas involucradas en la floración y germinación | Huntley y cols, 2002. |

Como se puede observar los compuestos encontrados corresponden a lípidos, compuestos fenólicos y hormonas implicadas en la floración. Esto concuerda con las características de los ejemplares de *I. murucoides*. Con respecto al método de análisis cromatográfico, es oportuno resaltar que no fue muy específico, ya que no existía un patrón para una mejor identificación. El tipo de columna que se utilizó permite una amplia selección de compuestos, esto por el tamaño de partícula (5 μ m) y la sílica que componía la fase móvil (Agilent Technologies, 2007).

9.4.3 Identificación y cuantificación de alcaloides

En esta sección se describirán y discutirán los resultados obtenidos de la pruebas para la identificación y cuantificación de alcaloides.

Prueba colorida

Los extractos metanólicos de 2012 y 2014 al reaccionar con el reactivo de Dragendorff no presentaron el precipitado color rojo característico de la presencia de alcaloides. Sin embargo este método sólo es una aproximación a la identificación de alcaloides. La razón de hacer prueba de identificación de alcaloides es que son característicos de la familia Ipomoea.

Extracción y cuantificación de alcaloides (Shamsa, 2008).

Los resultados de la cuantificación de alcaloides de los extractos metanólicos de *I. murucoides* de 2012 y 2014 se muestran en el cuadro 14.

Cuadro 14. Contenido de alcaloides de los extractos metanólicos de *I. murucoides*. Las concentraciones son el promedio \pm la desviación estándar de la curva patrón. ECAT, equivalentes de atropina.

| Muestra | Alcaloides totales (μ moles ECAT/100 g) |
|----------------|--|
| Irámuco 2012 | 1.25 |
| Sabanilla 2012 | 5.00 |
| Irámuco 2014 | 2.50 |
| FESI 2014 | 12.50 |

La técnica que se uso en este estudio fue la Oropeza, 2012 que emplea un patrón de cinconina a una longitud de onda de 420 nm, esta técnica es una modificación de la Shamsa y cols, 2008. La cual utiliza como patrón a la atropina y una longitud de onda de 470 nm. Para la cuantificación de los alcaloides de *I. murucoides* se uso como patrón la atropina y una longitud de onda de 420 nm.

En todos los extractos de hoja la cantidad de alcaloides es menor a los 25 μ g equivalentes de cinconina (ECCn)/100 g que reporta Oropeza en 2012. Sí se hubieran empleado los 470 nm como lo marcaba la técnica original de Shamsa y cols, 2008, los resultados tal vez los resultados serían distintos.

9.4.4 Cuantificación de fenoles (Folin-Ciocalteu)

La cantidad de fenoles fue muy baja ya que las cantidades se encuentran entre 5.725 y 7.953 mg. La cantidad de compuesto fenólicos obtenidos de los extractos metanólicos no presenta grandes variaciones entre cada uno de los ejemplares de *I. murucoides*. A pesar de que los compuesto fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, son secretados como mecanismos de defensa en condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros (Ávalos y Pérez-Urria, 2009), en *I. murucoides* se encontraron en bajas cantidades.

CUARTA ETAPA

9.5 Actividad antioxidante: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

La capacidad antioxidante media (IC_{50}), que indica la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% al radical DPPH•. De acuerdo con los resultados del ANOVA los extractos metanólicos de *I. murucoides* no poseen actividad antioxidante relevante. Ya que indican que IC_{50} se presenta con cantidades superiores a las 128 ppm de extracto. El porcentaje de decoloración se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de decoloración} = 1 - (\text{absorbancia del problema} / \text{absorbancia del blanco}) \times 100$$

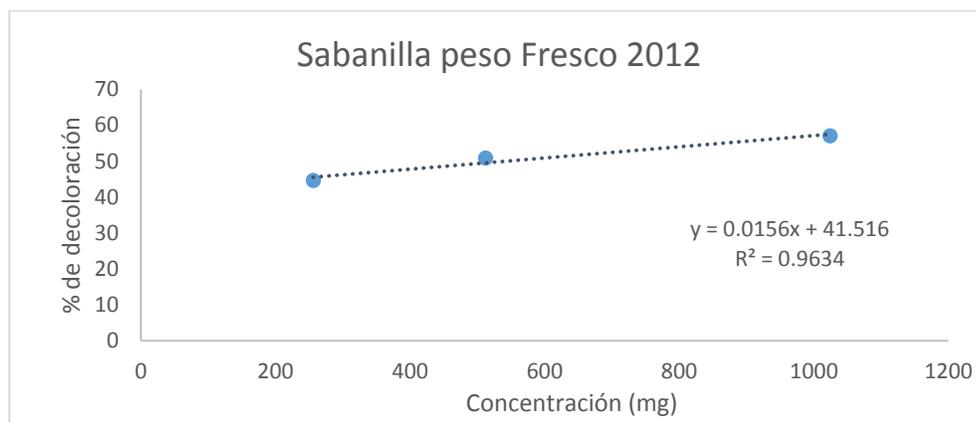


Figura 18. Gráfico del porcentaje de decoloración de DPPH• en reacción con el extracto metanólico de *I. murucoides* de Sabanilla peso fresco 2012.

Cabe mencionar que en la mayoría de los extractos se observó un comportamiento similar de las gráficas, en donde la IC_{50} se presenta en concentraciones mayores a las 512 ppm de extracto. Los resultados no muestran actividad antioxidante relevante.

9.5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Las prueba de difusión de disco en agar de los extractos de *I. murucoides* de 2012 fue negativa ya que no presentó en ninguno de los caso halos de inhibición. Estos resultados indican que los extractos de *I. murucoides* no presenta sustancias antimicrobianas. A pesar de que en en la fracción L del extracto hexánico de Irámuco PS de 2012 tiene el 51.62% de timol no es suficiente para que el extracto posea antidad antimicrobiana.

10 CONCLUSIONES

- Se obtuvieron extractos de hoja y tallo de distinta polaridad de *I. murucoides*.
- Los extractos hexánico, diclorometano, metanólico y acuoso de *I. murucoides* de 2012 absorben en la región de la radiación UV-C de espectro electromagnético.
- Los extractos hexánicos y diclorometano están constituidos por; ácidos grasos, hidrocarburos saturados, hidrocarburos alifáticos, compuestos fenólicos, sesquiterpenos oxigenados y alcoholes grasos.
- Los extractos metanólicos parecen tener compuestos alcaloideos y hormonales.
- Los compuestos de *I. murucoides* con respecto a la literatura reportan tener actividad biológica. Van desde ser antimicrobianos, antiinflamatorios, antioxidantes, antienvjecimiento, ecológico y como tratamiento para la diabetes.
- La cantidad máxima de alcaloides en extractos metanólicos de *I. murucoides* cuantificada fue de 12.50 μ moles ECAT/100 g.
- El potencial antioxidante de los extractos metanólicos no se considera relevante.
- Los extractos de *I. murucoides* no poseen actividad antibacterial y antifúngica.

11 PERPECTIVAS

- Realizar purificación de compuestos de interés medicinal y cosmético de *I. murucoides*.
- Emplear otras técnicas de separación e identificación de compuestos de *I. murucoides* utilizando distintas partes de la planta.
- Probar la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de *I. murucoides*.

ANEXO 1

TÉCNICAS

Extracción y cuantificación de Alcaloides (shamsa, 2008).

Esta técnica se realizó mediante la siguiente secuencia:

A) Obtención de Alcaloides

- 1) Realizar extracto metanólico: Se pesaron 100 gramos de hojas y tallos, se molieron y se les agregó 60 ml de metanol dejando macerar durante 3 días. El extracto se filtró y se evaporó en rota vapor al vacío a 40 °C.
- 2) Remoción de clorofilas: Al extracto metanólico evaporado se le adicionaron 15 ml de agua y HCl 1M hasta alcanzar un pH de 2. Se adiciono hexano en un embudo de separación, se agito y se hizo la separación líquido-líquido.
- 3) Separación de alcaloides de compuestos fenólicos: La base acuosa libre de clorofilas se le adicionó NaOH hasta obtener un pH de 12. La solución se colocó en un embudo de separación, se agregó cloroformo y se agito. Los extractos clorofórmicos se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y evaporaron en rota vapor.

Cuantificación de alcaloides

Preparación de la Curva Patrón:

- 1) Ácido cítrico 0.2 M: Pesar 840 mg de ácido cítrico y aforar a 50 ml.
- 2) Buffer de fosfato (p/v): Pesar 7.16 g de Na₂HPO₄ (fosfato disódico) y aforar a 100 ml con agua destilada. *Ajustar pH a 4.7.
- 3) NaOH 1N 400 mg de NaOH aforar con 10 ml de agua destilada.
- 4) Verde de bromocresol (p/v/v): Pesar 34.9 mg de bromocresol, agregar 0.25 ml de agua y 0.15 ml de NaOH 1N. Disolver en agua y aforar a 50ml.
- 5) Estándares de atropina: 2, 4, 6, 8 y 10 ppm.

CUANTIFICACIÓN:

En un embudo de separación a la partición clorofórmica se le agregaron 5ml de buffer de fosfatos, 5ml de verde de bromocresol y 2ml de cloroformo. Se agitó y se separó la fase clorofórmica en un matraz. A la fase acuosa se le agregaron 2ml de cloroformo y se agitó para extraer la mayor cantidad de alcaloides, este paso se repitió 5 veces.

La fase orgánica se secó con NaSO_4 , se filtró y se evaporó para pesar el total de alcaloides obtenidos. Las muestras se leyeron a 420 nm por medio de un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 25. Como patrón de referencia se usó atropina, como blanco cloroformo y como muestra problema el extracto libre de clorofilas.

Determinación de potencial antioxidante de los extractos metanólicos.

La actividad antioxidante de los extractos se determinó usando la prueba de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$). La técnica se realizó de la siguiente manera:

DISOLUCIONES:

- 1) Soluciones de extractos metanólicos con concentración de 1024 ppm: Se pesaron 0.049 g de cada uno de los extractos metanólicos de 2012 y se diluyeron con 10 ml de metanol.
- 2) Metanol.
- 3) Solución de DPPH a 0.5nM: Se pesaron 0.0394 g de DPPH y se disolvieron con 200ml de metanol
- 4) Se prepararon diluciones con concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 1024 ppm.

CUANTIFICACIÓN

La cuantificación se realizó de acuerdo a la siguiente secuencia:

- 1) Blanco: 200 μl de metanol
- 2) DPPH: 200 μl

- 3) Extractos con DPPH: 150 µl de solución de extracto y 50 µl de DPPH (del pocillo 3 al 12)

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente, en microplacas de 96 pocillos protegidas de la luz. Después se midió la absorbancia a 520 nm.

Figura 19. Modelo de placa DPPH

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| B | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| C | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| D | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| E | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| F | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| G | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

| | |
|---|-----------------|
| ○ | Metanol |
| ○ | DPPH |
| ○ | Extracto + DPPH |

Cuantificación de Fenoles Totales

DISOLUCIONES

- 1) Metanol al 90%.
- 2) Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 0.5% (p/v): Se pesaron 50 mg de Na_2CO_3 y se aforo a 10 ml de agua
- 3) Reactivo de Folin-Cicalteau 0.1 M: 0.5 ml de Reactivo de Folin-Ciocalteu 2M y aforar a 10 ml de agua sin la presencia de luz.
- 4) Ácido gálico 100 ppm: Se peso 1mg de ácido gálico y se aforo a 10 ml de Metanol al 90%. A partir de esta solución se realizaron los siguiente patrones para al curva patrón; 5, 10, 15, 20 y 25 ppm.
- 5) Extractos: Se pesaron 10 mg de extracto metanólico de Irámuco hojas secas 2012, Irámuco 2014 y FES Iztacala 2014, cada uno de los extractos se aforo a 10 ml de Metanol. Para realizar las diferentes alícuotas; 50 y 20 ppm cada uno.

CUANTIFICACIÓN

La cuantificación se realizó de acuerdo a la siguiente secuencia:

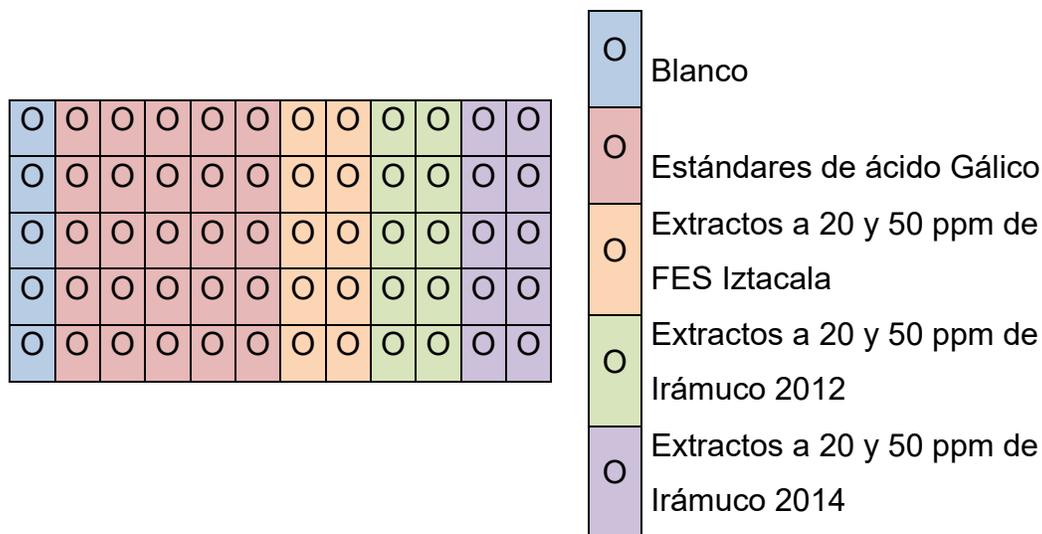
- 1) Blanco: 40 µl de agua, 40 µl de reactivo de Folin Cicalteau y 40 µl de Na₂CO₃.
- 2) Estándares de ácido gálico: 40 µl de ácido gálico, 40 µl de reactivo de Folin Cicalteau y 40 µl de Na₂CO₃.
- 3) Extractos FES Iztacala, Irámuco 2012 e Irámuco 2014: 40 µl de extracto, 40 µl de reactivo de Folin Cicalteau y 40 µl de Na₂CO₃.

Antes de agregar el Na₂CO₃ se dejó en reposo a temperatura ambiente por 6 minutos y se agito a baja velocidad por 15 segundos.

Después de agregar el Na₂CO₃ se dejó reposar por 30 minutos a 40°C y se agito por un minuto para leer a 620 nm.

En una microplaca la técnica se realizó como se explica en el siguiente esquema:

Figura 20. Modelo de placa Folin-Cicalteau



Pruebas biológicas

Se realizó prueba de sensibilidad antimicrobiana de los extractos hexánico, diclorometano y metanólico en: *Escherichia coli* 53228 (gram negativa), *Staphylococcus aureus* 83MR (gram positiva), *Candida albicans* 14065 (levadura) y *Aspergillus niger* (hongo filamentoso). Las sepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Farmacognosia de la UBIPRO.

Sensidiscos

Se impregnaron sensidiscos de papel watman 40 de 5 mm de diámetro con concentraciones de 2mg y 4mg de cada uno de los extractos de polaridad ascendente de los cuatro grupos; Sabanilla pesos seco, Sabanilla peso fresco, Irámucu peso fresco e Irámucu peso seco.

LITERATURA CITADA

Abreu G. O. y Cuéllar C. A. 2008. Estrategias en la selección de plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 13(3), 2016-03-24.

Abubacker M. N. and Devi P. K. 2015. In vitro Antifungal Potentials of Bioactive Compounds Heptadecane, 9- hexyl and Ethyl iso-allocholate isolated from *Lepidagathis cristata* Willd. (Acanthaceae) leaf. *British Biomedical Buletin*. 3(3):336-343

Agilent Technologies, Guía de selección de columnas Agilent ZORBAX para HPLC, 2007, Alemania, 5989-5992ES, 116 pp

Alcántar A. F. C. 2005. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México. 149 p

Alcántara R. S. 1980. Contenido de ácidos grasos entre semillas de *Ipomoea murucoides* (Familia *Convolvulaceae*) de diferentes localidades en la República Mexicana. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 86 p

Alves T.M., Fonseca S. A, Brandao M., Mesquita G. T. S., Smania E. F., Smania J. A. y Leomar Z. 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95(3):367-73 pp

Amor-Prats D. and Harbone J. B. 1993. New Sources of Ergoline Alkaloids within the Genus *Ipomoea*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 21(4):455-462

Arenas S. I. y López S. J. 2004. Espectrofotometría de absorción, Métodos de Laboratorio. Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 41 pp

Atolani O. y Olatunji A. G. 2010. Epicuticular wax and volátiles of *Kigelia pinnata* leaf extract. *Ethnobotanical Leaflets*. 14:797-806

Ávalos G. A. y Pérez-Urria C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3):119-145

Bravo- Espinosa M., García-Oliva F., Ríos-Patrón E., Mendoza-Cantú M., Barrera-Camacho G., López-Granados E., Serrato-Barajas B. y Sáenz-Reyes T. 2008. La cuenca del Lago Cuitzeo: Problemática, Perspectivas y Retos Hacia su Desarrollo Sostenible. Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Michoacán. Morelia, Michoacán México. 32p

Buchanan B., Gruissem W. and Jones R. 2000. *Biochemistry & molecular Biology of Plants*. American Society of Plants. 1250-1315

Carranza E. 2007. Familia Convolvulaceae. Flora de Bajío y Regiones Adyacentes. Instituto de Ecología, A. C. Fascículo 151. 131 p

Carranza G. E. 2001. Contribución al conocimiento de la plantas del género *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) en el Estado de Guanajuato, México. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Fascículo complementario XVIII, 74 p

Carranza G. E. 2005. Conocimiento actual de la flora y de la diversidad vegetal del Estado de Guanajuato, México. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Fascículo complementario XXI. 23 p

Ceballos G., Rurik L., Garduño G., López C. R., Muñozcano Q. M. J., Collado E. y San R. J. E. 2009. Diversidad biológica del Estado de México. Estudio de Estado. Colección Mayor. Biblioteca del Bicentenario. 73 p

Chérigo L., Pereda-Miranda R. and Gibbons S. 2009. Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *I. murucoides*. *Revista Phytochemistry*. 70:222-227 p

Chérigo L., Pereda-Miranda R., Fragoso-Serrano M., Jacobo-Herrera N., Kaatz G. and Gibbons. 2008. Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *I. murucoides*. *Journal of Natural Products*.71:1037-145

Chérigo R. L. Y. 2007. Resinas glicosídicas de las flores de *I. murucoides*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 174 p

Chisholm M. J. and Hopkins C. Y. 1960. 11-Octadecenoic acid and other fatty acids of *Asclepias syriaca* seed oil. *Canadian Journal of Chemistry*. (38):805-812

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2012. La biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (conabio)/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEE). México. (I):449 p

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2012. La biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (conabio)/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEE). México. (II):524 p

Corona C. B. 2007. Aislamiento y purificación de un glicolípido mayoritario de las hojas de *I. murucoides*. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 44 p

Corona C. B. 2008. Un nuevo lipopentasacárido del ácido simónico B de las resinas glicosídicas del Cazahuate (*I. murucoides*), una planta medicinal Mexicana. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Posgrado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 75 p

Corona-Castañeda B., Chérigo L., Fragoso S., Gibbons S. and Pereda-Miranda R. 2013. Modulators of antibiotic activity from *I. murucoides*. *Phytochemistry*. 95:277-283

Cseke L. J., Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S. L., Duke J. A. and Briemann H. L. 2006. Natural products from plants. Taylor & Francis Group CRC. 2ª Edición. 587 p.

DeSucre-Medrano A. E., Ramírez-Bastida P., Varona-Graniel D. E., Opengo-Piña L. H. y Molán-Chahué Y. 2010. Dos registros nuevos de aves en el Estado de México: *Protonotaria citrea* y *Euthlys lachrymosa*. Huitzil. 1(1): 21-25 p

Duarte R. S., Cárdenas M. C., Carol Y., Martínez M. J., y Stashenko E. E. 2007. Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación-extracción con solvente simultánea, de la hojas de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae). Scientia Et Technica. 33(13):83-85

Facultad de Química. 2007. Técnicas cromatográficas. Química Analítica Instrumental II. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 132 pp

Figueiredo C.R. Leonardo M. A., Massaoka M. H., Girola N., Azevedo R. A., Rabaça A. N., Fernandes F. C., Valença P. F., Silva M. N., Pereira S. L., Rodrigues G. E., Guilardi L. J., Travassos L. y Gonçalves S. R. 2014. Antitumor Activity of Kielmeyera Coriacea Leaf Constituents in Experimental Melanoma, Tested in Vitro and in Vivo in Syngeneic Mice. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 429-436

Figuroa-González G., Jacobo-Herrera N. and Zentella-Denesa A. Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. Journal of Natural Products. 75:93-97

Fitsioua I., Tzakoua O., Hancianub M. and Antonia E. 2011. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller Oils. Journal of Essential Oil Research. 2(12):183-185

Fred-Jaiyesimi A. A. 2012. GC-MS Analysis of *Bucchozia coriácea* engle. International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences. 1(4): 524-528

García B. A. M. 2010. Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis que para obtener el grado académico de Doctora

en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 209 p

García-García R. M. y Palou-García E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. (2-2):41-51

Gennaro A. R. 2003. Remington Farmacia. Editorial Panamericana, 2° Edición. Buenos Aires. 1388 p

Girme A.S., Bhalke R. D., Nirmal S. A. and Chavan M.J. 2014. Chromatographic and chemical analysis of *Sarcostemma viminalis* R. Br. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. (3):279-284

Guerrero C. C .A. 2012. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en fibra dietética extraída de cultivos ancestrales andinos para su utilización como suplemento alimenticio. Trabajo estructurado de manera independiente para obtener el título de Ingeniero Bioquímico. Universidad técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos. Ecuador. 100 p

Gutiérrez A. D.M, Ortiz G. C. A. y Mendoza C. A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 5p

Gutiérrez R. Á. Y Estévez B. A. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. Madrid. 103 (2): 409-419

Hemmerlin A., Harwood J. and Bach T.2012. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Progress in Lipid Research* 51: 95-148 p

Hernández-Aro M., Pedrol N., Cianna M., Espinosa R., y Torres S. s/a. Potencial bioherbicida de extractos de *Ipomoea batatas* sobre *Portulaca oleracea* y *Amaranthus spinosus*.16 p

Huntley R. P. y cols. 2002. Cytokinins and gibberellins in sap exudate of the oil palm. *Phytochemistry*. (60):117-127

Jiménez L. P. y Girbés J. T. 2013. Determinación del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo de Folin-Ciocalteu. *Prácticas de Fundamentos de alimentación y Nutrición. Nutrición y Bromatología. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid*. 11 p

Joffe L. D. 2001. Effect of extended release *Gymnema sylvestre* leaf extract (Beta Fast GXR) alone or in combination with oral hypoglycemics or insulin regimens for type 1 and type 2 diabetes diabetes. In *Control Newslette*. 76(1): 30 p

Jones R., Ougham H., Thomas H. and Waaland S. 2013. *The molecular life of plants*. John Wiley & Sons, Ltd. Oxford. 713 p

Kether H. F. B., Mahjoub M. A., Mahjoub S. A., Salah K. B., Helal A. N. and Mighri Z. 2012. Chemical composition, in vitro antifungal and antioxidant activities of essential oil from *Cotula coronopifolia* L. growing in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research*. (6):4388-4395

Kim D. H., Park M. H., Choi Y. J., Chung W. K., Park C. H., Jang E. J., Am H. J., Yu B. P. and Chung H. Y. 2013. Molecular Study of Dietary Heptadecane for the Anti-Inflammatory Modulation of NF- κ B in the Aged Kidney. *Plos One*. 8:10

León I., Enríquez R., Nieto A., Alonso D., Reynoso F., Aranda E. and Villa J. 2005. Pentasaccharides Glycosides from the Roots of *I. murucoides*. *Journal of Natural Products*. 68(8):1141-1446

Ly. Shi-dong., Wu Yuan-shuang., Zhou Jiang-sheng., Lian M. and Meng Qing-xiong. 2014. Analysis of aroma components of dark teas from five different production regions by fully automatic headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6(1):246-253

Magaña A. M., Gama C. L. y Mariaca M. R. 2010. El uso de las plantas medicinales en las comunidades Mayachontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Rev. Polibotánica*. 29:213-262

Mahmoud A. Al-Qudah. 2013. Chemical composition of the essential oil from Jordanian *Lupinus varius* L. *Arabian Journal of Chemistry*. (6):225-227

Mahmoud S. A., Moawad M. D. and Ahmed E. A. 2014. Composition of the non-polar extracts and antimicrobial activity of *Chorisia insignis* HBK. Leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4(6):473-479

Matínez-Force E., Pérez-Vich B., Fernández-Martínez J. M. y Garcés R. 2002. Aceite de semillas con una composición de ácidos grasos modificada. España, ES 2 222 908 T3. 7p

Martínez V. J. B. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocharpus terebinthinaceus*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 68 p

Maua Jeng-Leun., Ko Pei-Tzu and Chyau Charng-Cherng. 2003. Aroma characterization and antioxidante activity of supercritical carbón dioxide extracts from *Terminlia catappa* leaves. *Food Research International*. (36): 97-104

McDonald A. 1991. Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Instituto. Biología. UNAM. Serie Botánica*, 62(1):65-82

Meira M. Pereira da Silva E., David J. M. and David P.V. 2012. Review of genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22(3): 682-713

Méndez. D. J. M. R. 2004. Análisis de pesticidas en espinaca por cromatografía de Gases/Espectrometría de masas. Tesis que para obtener el título de Química en Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 179 p

Mila A. R. 2013. Identificación de dos spp de *Ipomoea* y evaluación invitro del extracto metanólico como problema de intoxicación en cabras. Tesis para obtener el grado de Maestra en ciencias. Colegio de Postgraduados. Texcoco. 138 p

Miraldia E., Ferria S. and Giorgib G. 2011. Identification of volatile constituents from the flower oil of *Spartium junceum*. Journal of Essential Oil Research. 6(6):568-570

Molina-Montenegro M.A. 2008. Variación de la pubescencia foliar en plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales. Ecosistemas, Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente. 17(1):146-154 p

Mudge S.M. 2005. Fatty Alcohols – a review of their natural synthesis and environmental distribution. The Soap and Detergent Association. All Rights Reserved. 152 p

Napolitano A., Carbone V., Saggese P., Tkagalki K. and Pizza C. 2007. Novel galactolipids from the leaves of *Ipomoea batatas* L.: Characterization by liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. Journal and Agricultural Food Chemistry. 55(10):289-297

Ocegueda S., Moreno E. y Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversitas 62:12-15

Ogunwande I.A., Flamini G., Adefuye A.E., Lawal N.O. Moradeyo S. and Avoseh N.O. 2011. Chemical compositions of *Casuarina equisetifolia* L., *Eucalyptus toreliana* L. and *Ficus elástica* Roxb. Ex Hornem cultivated in Nigeria. South African of Botany. (77): 645-649

Oliveira A, M., Conserva L. M., de Souza Ferro J. N., de Almeida Brito. F., Lyra L. R.A., and Barreto E. 2012. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Octacosanol from the Leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in Mice. International Journal of Molecular Sciences.13: 1598-1611 pp.

Palomo G. I., Gutiérrez C. M., Astudillo S. L., Rivera S. C., Torres U. C., Guzmán J. L., Moore-Carrasco R., Carrasco S. G. y Alarcón L. M. 2009. Efecto antioxidante de frutas y hortalizas de la zona central de Chile. *Revista Chilena de Nutrición*. 2(36):152-158

Paz O. M. 2012. Alcaloides totales actividad antioxidante de extractos de hojas de *I. murucoides*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. Universidad Tecnológica Mixteca, Oaxaca. México. 78 p

Pedroso H. L., Rocha-Filho L. C. y Lomocano C. 2010. Variación fenotípica de plantas del Cerrado (Sabana brasileña) frente a la heterogeneidad ambiental. *Ecosistemas*, *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*. 19(1):24-36

Reyes-Munguía A., Zavala-Cuevas D., y Alonso-Martínez A. 2012. Perejil (*Petroselinum crispum*): compuestos químicos y aplicaciones. TLATEMOANI *Revista Académica de investigación*. Editorial Eumed. 11:18.

Rosas-Ramírez D., Escalante-Sánchez E. y Pereda-Miranda R. 2011. Betatins III-VI, glycolipid ester-type dimers from *I. batatas*. *Phytochemistry*, (72):773-780

Ruiz T. G. 2004. Desarrollo y validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para cuantificar la cefalona CQ-M-EPCT (un nuevo antibacteriano) en plasma. Tesis que para obtener el título de Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 80 p

Rzedowski, J. y McVaugh R. 1966. Vegetación de Nueva Galicia. *Contributions from the University of Michigan Herbarium*. (9):1-123

Sánchez O. P. M. 2008. Efecto de la época de transplante sobre la acumulación de luteína en inflorescencias de cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.). Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional. México. 85 p

Santizo R. I. M. 2004. Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Tesis para optar por el título de Químico Biólogo. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 134 p

Serrato-Palacios L.L., Toro-Vazquez J.F. and Dibildox-Alvarado E. 2015. Phase behavior and Structure of systems based on mixtures of n-hentriacontane and melissic acid. Journal of the American oil chemist's Society. (92)4:533-540

Shaji K. P. and Bharathi P. 2015. A novel liquid oral formulation for 1-octacosanol an anticancer drug and its stability study. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology. 6p

Shi S., Zhao Y., Zhou H., Zhang Y., Jiang X. and Huang K. 2008. Identification of antioxidants from *Taraxacum mongolicum* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-radical-scavering detection-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments. Journal of Chromatography A. (1209):145-152

Solomon P. E., Berg L. R. y Martin W. D. 2013. Biología. Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. México. Novena Edición. 26-28 p

Srivastava L. M. Plant Growth and Development, Hormones and Environment. 2002. Academic Press. Elsevier Science. 757 p

Stökl. J., Schlüter P. M., Stuessy T. F., Paulus H. F., Assum G. and Ayasse. 2008. Scent variation and hybridization cause the displacement of a sexually deceptive orchid species. American Journal of Botany. 95(4):472-481

Tecanhuey F. L. 2005. Estudio fitoquímico de *I. murucoides*. Tesis para obtener el título de Licenciada en Quimicofarmacobiología. Universidad de las Américas. México. 55 p

Tessmann D. and Dianese J. 2002. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. Fitopatol. (27)-5:538-542

Tovar D. R. J. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. Trabajo de grado para optar por el título de Químico Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología Química. Colombia. 150 p

Traditional Ayurveda Hearr Care. S/A. En diabetes mellitus tipo 2. Apimanu. https://www.apimanu.com/pdf/produkte/products_spanish/diabgymna.pdf.

UNILEVER. 2006. Uso cosmético del ácido petroselínico. Oficina Española de patentes y marcas. Número de publicación 2248962. 6 pp

Wang, T.; Liu, Y.Y.; Wang, X.; Yang, N.; Zhu, H.B.; Zuo, P.P. 2010. Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacol.* 31: 765–774.

Wagner H., Bladt S. & Zgainski E. 1984. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag. 320 p

Wen D., Li C., Di H., Liao Y. y Liu H. 2005. A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. *Journal of Agricultural and Fodd Chemistry.* 53(17):6624-6629

Wink M. 2010. Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annual Plant Reviews.* (40):1-19

Wink M., Botschen F., Gosmann C., SchÄfer H. and Waterman P. G. 2010. Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism. *Annual Plant Reviews.* (40):364-433

Wheeler G.S. y Ordnung K. M. 2005. Secondary metabolite variation affects the oviposition preference but has little effect on the performance of *Boreiglycaspis melaleucae*: A biological control agent of *Melaleuca quinquenervia*. *Biological control.* 35:115-123

Xu R., Ye Y. y Zhao W. 2012. *Introduction to natural products chemistry*. Beijing: Science Press, CRC Press. 363 p

Yayli N., Gülec C., ÜcÜncÜ O., Yasar A., Ülker S., Coskuncelebi K. and Terzioglu S. 2005. Composition and Antimicrobial Activities of volatile components of *Minuartia meyeri*. Turk Journal Chemistry. (30): 71-76

Yogeswari S., Ramalakshmi S., Neelavathy R. and Muthumary J. 2012. Global Journal of Pharmacology. 6(2):65-71