



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO FLORAL DE *Jacaranda mimosifolia* D. Don. (BIGNONIACEAE) Y ALGUNAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.”

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
ESTEFANI PEZA ORTIZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES

Tlalnepantla, Edo. de México.

Septiembre, 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.

ÍNDICE

Sección	Página
1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	2
3 MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	5
3.2 COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS.....	6
3.3 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.....	8
3.4 DESCRIPCIÓN <i>J. mimosifolia</i>	12
4 ANTECEDENTES.....	14
5 JUSTIFICACIÓN.....	17
6 HIPÓTESIS.....	18
7 OBJETIVOS.....	19
8 METODOLOGÍA.....	20
8.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.....	20
8.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	20
8.2.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	20
8.2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	20
8.3 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA.....	21
8.3.1 MÉTODOS CUALITATIVOS.....	21
8.3.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	22
FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO.....	23
a) CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA.....	23
b) CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	24
9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
9.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	25
9.1.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	25
9.1.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	27
9.2 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA.....	29
9.2.1 MÉTODOS CUALITATIVOS.....	29
9.2.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	31
9.2.3 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO.....	31
10 CONCLUSIONES.....	37
11 APÉNDICES.....	38
I METABOLITOS SECUNDARIOS.....	38
II MÉTODOS CUALITATIVOS.....	50
12 REFERENCIAS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
1. Formación de radicales y iones de oxígeno.....	10
2. Tipos de Especies Reactivas de Oxígeno y su formación.....	10
3. Antecedentes.....	14
4. Reacciones de identificación de los diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en el partición metanólica del extracto metanólico de <i>J. mimosifolia</i>	30
5. Cromatografía en columna abierta, fase estacionaria resina Diaion HP-20.....	32
6. Cromatografía en columna abierta, fase estacionaria sílica.....	33
7. Clasificación de alcaloides.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Jacaranda mimosifolia</i>	3
2. Delfinidina.....	14
3. Porcentaje de reducción del DPPH por acción de la partición metanólica de flores de <i>J. mimosifolia</i>	27
4. Porcentaje de reducción del DPPH por acción de la quercetina.....	28
5. Curva patrón para determinar la concentración total de fenoles.....	31
6. Ácido hexadecanoico.....	35
7. Patrones de enlace entre unidades de isopreno.....	40
8. Ejemplos de terpenos.....	44
9. Molécula base de fenoles.....	44
10. Estructura base de fenilpropanoides.....	45
11. Esqueleto base de cumarinas.....	46
12. Ácido gálico.....	46
13. Estructura de flavonoides.....	48

*El presente trabajo fue realizado en el
Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de
Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la
Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
UNAM.*

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A los sinodales la Dr. Ana María García Bores, el Dr. José Guillermo Ávila Acevedo, la Dra. Rocío Serrano Parrales, la Dr. Claudia Tzasná Hernández Delgado y a la Bióloga Soledad Chino Vargas, por haber revisado mi proyecto de tesis.

En especial a la Dra. Ana María García Bores por todas las observaciones y lo que me ha enseñado como profesionista y persona, por las charlas en el laboratorio.

A los profesores y a mis compañeros de laboratorio por cada día que convivimos de trabajo y días festivos.

Dedicatorias

A mis padres Ángel y Alejandra, a mis hermanos Eder, Aldo y Valeria, por haberme apoyado durante toda mi carrera profesional.

Con mucho cariño a mi hermana por ser mi mejor amiga, por los consejos y por siempre creer en mí.

A mis amigas Alejandra Verde y Cristin por los momentos compartidos.



1. RESUMEN

Existen 49 especies registradas del género *Jacaranda* sólo hay información bibliográfica para 13. Entre éstas se encuentra *Jacaranda mimosifolia*, árbol ampliamente distribuido como planta de ornato. Aunado a su valor estético existen reportes sobre su uso etnobotánico, por lo que se considera un género con potencial farmacológico no conocido en su totalidad. Debido a que las propiedades de las flores de *J. mimosifolia* han sido poco estudiadas, el objetivo de este trabajo fue evaluar su actividad antibacteriana y antioxidante, así como conocer su composición química general. Para lograr los objetivos se obtuvo el extracto metanólico de flores de *J. mimosifolia*, el cual se particionó con metanol y hexano. Se evaluó la actividad antibacteriana de éste extracto en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella tiphy*. Asimismo la actividad antioxidante se determinó mediante el método de reducción del radical libre 2,2-difenil-picril-hidrácilo (DPPH). La cuantificación de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo a través de la reacción de Folin-Ciocalteu. La investigación de su composición de metabolitos secundarios se realizó de manera cualitativa mediante reacciones colorimétricas de identificación para terpenos, compuestos fenólicos, glucósidos y alcaloides; complementariamente se separaron los compuestos por métodos cromatográficos. Como resultados se observó que el extracto de flores de *J. mimosifolia* no posee actividad antibacteriana en las cepas evaluadas; tiene una capacidad antioxidante media (CA_{50}) de 181.5 $\mu\text{g/ml}$ y una concentración de compuestos fenólicos de 226.8 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto. Las reacciones de identificación fueron positivas para terpenos, compuestos fenólicos y glucósidos. A partir de la cromatografía en columna abierta se obtuvieron 259 alícuotas de las cuales una fue procesada en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, a partir de la cual se identificó el ácido hexadecanóico. De acuerdo con la FDA se considera que el extracto tiene buena actividad antioxidante y con respecto a la caracterización química fue posible identificar un compuesto.

2. INTRODUCCIÓN

México está ubicado geográficamente en una zona de transición o convergencia neártica y neotropical, tiene grandes cadenas montañosas con relieves accidentados y diferentes altitudes, ambos factores propician la existencia de una amplia variedad de climas y de casi todos tipos de vegetación. Las condiciones climáticas y los distintos tipos de suelo han permitido el desarrollo de una vasta riqueza de especies vegetales (Soberón y Llorente, 1993). De acuerdo a los datos proporcionados por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) en México existen 23 522 especies vegetales, aunque se estima que el número podría acercarse a 31 000. México ocupa el cuarto lugar entre los países con mayor diversidad de plantas, de las cuales aproximadamente 15 000 son endémicas, esta cifra representa alrededor del 50% del total, por otro lado, dentro del porcentaje restante se considera que muchas especies han sido introducidas (CONABIO, 2006).

Las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos conocidos como metabolitos secundarios, su diversidad es comparable con el número de especies vegetales que existen. El interés por su estudio ha sido para obtención de productos útiles para el hombre y para la generación de conocimiento (Croteau *et al.*, 2000).

En México y en muchos otros países las especies vegetales son empleadas como recursos terapéuticos, especialmente en zonas donde los servicios de atención médica son escasos (Osuna Y Lozoya, 1989). Debido a la versatilidad de usos que se les da a las plantas, no es de sorprender que haya especies cuyo uso difiera de una región a otra, tal es el caso de *Jacaranda mimosifolia*, árbol conocido comúnmente como “jacaranda” (Figura 1).

En Sudamérica muchas especies del género *Jacaranda* son explotadas en la industria maderera. Sin embargo, en México *J. mimosifolia* es apreciada principalmente como árbol de sombra y ornato, especialmente en jardines y parques. Existen investigaciones etnobotánicas realizadas por Osuna y Lozoya en el estado de Morelos (1989), quienes reportan que *J. mimosifolia* es



empleada para la cura de afecciones gastrointestinales. También hay fuentes bibliográficas en las que se menciona que en Ecuador, es utilizada en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual y para la “purificación de la sangre” (Gachet y Schühly, 2009).

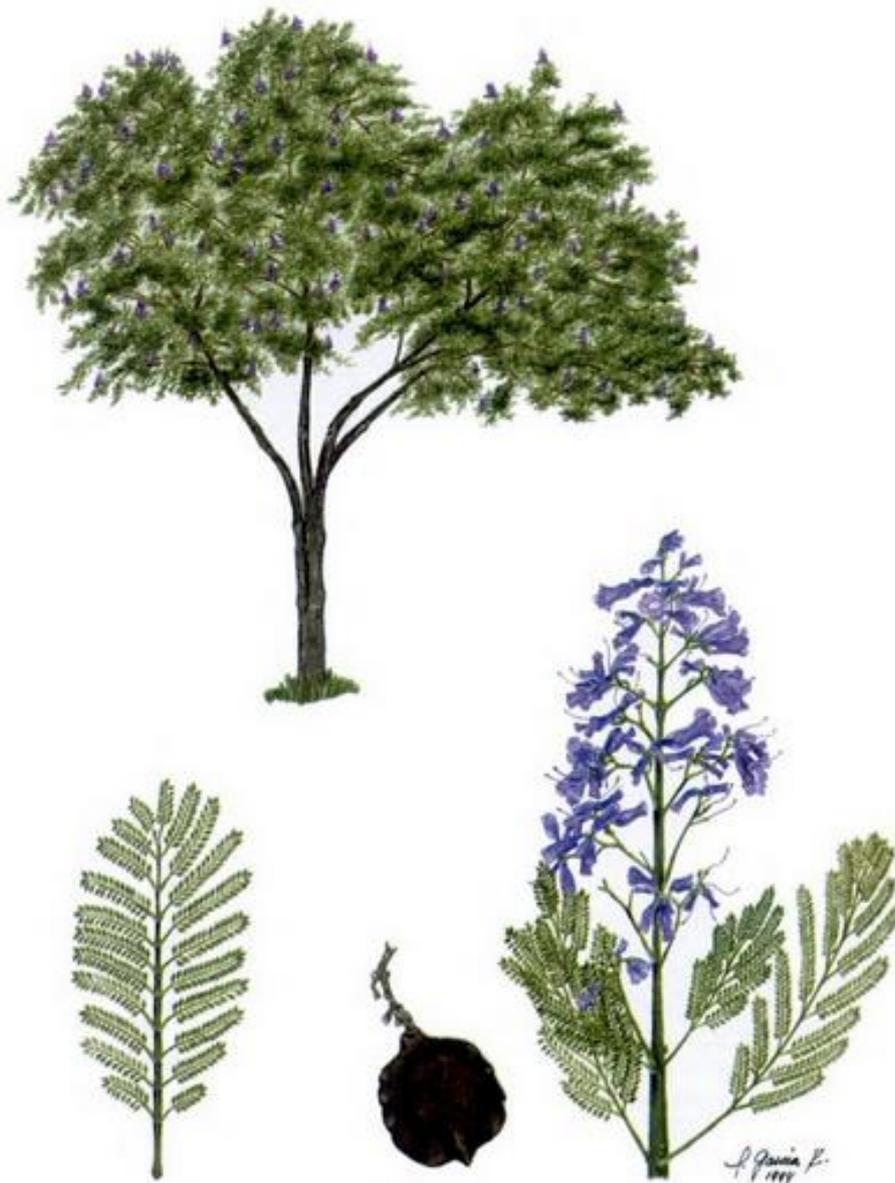


Figura 1. *Jacaranda mimosifolia*. Se observan las hojas bipinnadas alternas, flores campanuladas y fruto leñoso (Fonnegra y Jiménez, 2007).

La actividad biológica de *J. mimosifolia* ha sido evaluada por algunos grupos de investigación quienes utilizaron diversas partes de la planta, principalmente

hojas, corteza, semillas; de manera escasa fruto y flores. Los resultados proporcionados muestran actividad hipotérmica e hipotensiva (Nicasio y Meckes, 2005), antiparasitaria (Monroy-Ortíz y Castillo-España, 2007), antibacteriana (Gachet y Schühly, 2009), antioxidante (Rana *et al.*, 2012) y citotóxica, al disminuir la viabilidad de líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y PC-3) (Gasmi y Sanderson, 2013).

Con respecto al conocimiento de su contenido fitoquímico, *J. mimosifolia* es una de las 6 especies del género *Jacaranda* para la que se han caracterizado algunos metabolitos secundarios, en su mayoría compuestos fenólicos simples, fenilpropanoides, triterpenos, acetósidos y quinonas (Gachet y Schühly, 2009).

La información de la composición química y propiedades biológicas de *J. mimosifolia* se ha realizado principalmente en hojas y corteza. Debido a la escasa investigación que se ha realizado en sus flores; el objetivo de este trabajo fue determinar la composición química general del extracto de flores, así como evaluar algunas de sus actividades biológicas.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

La clasificación de los metabolitos sintetizados por las plantas en primarios y secundarios ha sido un amplio tema de discusión. Se consideran metabolitos primarios a los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, azúcares y lípidos; ya que son los componentes estructurales de las células y participan en los procesos esenciales de división celular, nutrición, crecimiento, respiración, almacén y reproducción.

Los metabolitos secundarios son sintetizados por las plantas, también se han aislado en bacterias, protistas, hongos y animales. Estas moléculas presentan las siguientes características: contienen diferentes grupos funcionales; presentan complejidad estructural; provienen de diferentes rutas de biosíntesis; se distribuyen de manera diferencial entre los distintos grupos taxonómicos; tienen una baja abundancia en los organismos, frecuentemente menor al 1% del total de carbono; su almacén usualmente tiene lugar en orgánulos y células específicas. En el pasado se les consideraba como productos de desecho del metabolismo vegetal, sin embargo, las células son energéticamente eficientes y no invertirían energía en producir moléculas que no necesitan (Cseke y Kaufman, 1999). Su función es esencial durante los procesos de desarrollo de las plantas; participan en las interacciones ecológicas que influyen en su supervivencia y adaptación al medio, tales como: simbiosis; defensa, ya que se ha demostrado que son antibióticos, antifúngicos, antivirales, contra depredadores, tóxicos, antioxidantes y fotoprotectores; competencia, al ser alelopáticos; y forman parte de los mecanismos de reproducción, como atractivos de polinizadores, dispersores de semillas y frutos (Bourgaud *et al.*, 2001).

Una síntesis activa de metabolitos se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas como la competencia por el espacio, luz y nutrientes (agentes alelopáticos), protección contra el exceso de radiación solar o en

respuesta a ataques de herbívoros, infecciones por bacterias, hongos y virus (Sepulveda *et al.*, 2003).

Los sustratos para la biosíntesis de metabolitos secundarios son los productos de algunas rutas del metabolismo primario como fotosíntesis, glucólisis, ciclo de Krebs, la vía del ácido shikímico y las bases nitrogenadas. La gran diversidad estructural y de grupos funcionales dentro de un mismo tipo de metabolitos secundarios se da por modificaciones químicas de los precursores base, tales como hidroxilaciones, metilaciones, epoxidaciones, malonilaciones, esterificaciones y glucosilaciones (Wink, 1999). Se considera que la síntesis de metabolitos secundarios satisface las necesidades inmediatas de la planta ya que se ha registrado que sus niveles incrementan en respuesta al estrés. Aunado a lo anterior, existen también diversos patrones de síntesis ya que ésta puede ocurrir en un órgano, tejido o célula específica, almacenarse ahí mismo o en otras partes, por otro lado, la tasa de síntesis depende también de la etapa de desarrollo de la planta (Sepulveda *et al.*, 2003).

La clasificación de los metabolitos secundarios difiere entre autores, los criterios que utilizan con mayor frecuencia para agruparlos son: a) origen biosintético; b) alifáticos o aromáticos; c) compuestos nitrogenados o no nitrogenados, entre otras (Cseke y Kaufman, 1999). En el presente trabajo se consideran como grupos de metabolitos secundarios a los alcaloides (nitrogenados), terpenos y compuestos fenólicos, éstos últimos engloban a los metabolitos de síntesis mixta (Apéndice I).

3.2 COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS

El uso indiscriminado de antibióticos ha traído como consecuencia casos clínicos de infecciones causadas por cepas resistentes, por lo que la efectividad de los actuales fármacos es incierta. Las acciones que se podrían llevar a cabo para disminuir la resistencia bacteriana son: control en el uso de antibióticos, conocimiento de los mecanismos genéticos de resistencia, así como promover el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (Nascimento *et al.*, 2000).



De acuerdo con Organización Mundial de la Salud (OMS), las plantas medicinales podrían ser la mejor fuente de obtención de una gran cantidad de fármacos. Alrededor del 80% de los individuos en países desarrollados confían y recurren al uso de medicina tradicional, por lo tanto, debe ser investigado su potencial antimicrobiano para un mejor entendimiento de sus propiedades, eficiencia y toxicidad (Eloff, 1998).

Las propiedades antimicrobianas de una planta se han atribuido a la acción de sus metabolitos secundarios. El mecanismo de acción de cada molécula antimicrobiana está relacionado con los grupos funcionales que contiene, su disposición y en general con el arreglo espacial de la molécula, ya que estos factores en conjunto definen su reactividad. No obstante a lo anterior, muchos mecanismos aún se desconocen y deben ser examinados (Hernández, 1999).

Algunos mecanismos de acción antibacteriana que se han descrito son los llevados a cabo principalmente por taninos, flavonoides, fenoles simples, fenilpropanoides, quinonas, cumarinas y terpenos. Los metabolitos secundarios con residuos hidroxilados pueden formar puentes de hidrógeno con biomoléculas, por ejemplo, con determinadas zonas en proteínas, en centros de reacción enzimáticos o con ácidos nucleicos, lo cual inhibe su función. Otro mecanismo es la unión de los metabolitos con sustratos esenciales que las bacterias requieren en su metabolismo, por ejemplo, iones metálicos. La toxicidad por quelación, descrita para taninos, se da porque los sistemas biológicos son altamente dependientes de los iones metálicos y su unión con metabolitos los vuelve inaccesibles para el consumo bacteriano (Scalbert, 1991).

Los flavonoides que presentan actividad antibacteriana tienen la capacidad de inhibir la síntesis de DNA y RNA ya que tienen grupos hidroxilo libres, con los que pueden formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas; una estructura plana, semejante a la estructura de las bases púricas y pirimídicas, lo cual propicia que se puedan intercalar entre de las mismas en la doble hélice. Aquellas flavonas que han mostrado tener un mayor efecto inhibitorio en

la síntesis de ácidos nucleicos son aquellas que presentan tres grupos hidroxilo en el anillo B (Hernández, 1999).

Algunos compuestos bioactivos sencillos son los fenoles simples y fenilpropanoides que tienen un alto estado de oxidación, por ejemplo, el catecol, el ácido cinámico y el cafeico. El mecanismo de inhibición de proteínas por compuestos altamente oxidados posiblemente se da a través de reacciones con residuos sulfurados (Murphy, 1999).

Las quinonas características por su alta reactividad se sabe que forman complejos unidos de manera irreversible con los aminoácidos. Por su alta capacidad de reaccionar, el potencial de las quinonas como antibacterianos se considera alto. Probablemente las moléculas blanco se encuentran expuestas en la superficie de la pared celular como adhesinas, polipéptidos o enzimas ligadas a la membrana (Murphy, 1999).

El mecanismo de acción antibacteriano de los terpenos no ha sido del todo comprendido pero se piensa que está relacionado con la disrupción de la membrana, como consecuencia de baja polaridad de éstos compuestos. Se ha identificado que los terpenos con actividad antibacteriana poseen grupos funcionales reactivos como epóxidos, ésteres o cetonas α , β -insaturadas que actúan por alquilación de moléculas biológicas necesarias para las funciones metabólicas viables (Murphy, 1999).

3.3 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

La abundancia atmosférica del oxígeno (O_2) es del 21%, dicha concentración a nivel celular sería dañina. A excepción de algunos organismos anaeróbicos y aerotolerantes todas las células requieren O_2 para una eficiente producción de energía, no obstante, el O_2 es un gas mutagénico. Un mecanismo para disminuir la toxicidad del O_2 es la regulación de su suministro hacia las células; dentro de los tejidos esto se logra al formar enlaces reversibles con la hemoglobina (eritrocitos), la mioglobina (músculos) y la neuroglobina (cerebro) (Halliwell y Gutteridge, 2007).



El efecto dañino del O_2 se debe a su reactividad; por una parte a su naturaleza radical, pero en mayor medida a su capacidad de producir radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO). Un alta reactividad puede propiciar la oxidación de componentes celulares esenciales; los organismos aerobios evitan o contrarrestan dichas condiciones porque han seleccionado a través de la evolución moléculas y mecanismos de defensas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los términos radical libre y ERO usualmente son confundidos. Un radical libre es cualquier especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su último orbital, mientras que el término ERO hace referencia tanto a los radicales de O_2 como a las moléculas derivadas del mismo, que aunque tengan todos sus orbitales apareados, presentan una moderada o alta tasa de reactividad. El O_2 es por concepto un radical libre ya que tiene dos electrones desapareados con el mismo spin, cada uno en un orbital π^* antienlazante, este hecho restringe su reactividad. Para que el O_2 pueda actuar como oxidante, el átomo o molécula a partir de los cuales va sustraer los electrones tiene que tener también dos electrones con el mismo spin. No obstante la restricción en la reactividad del O_2 , éste puede reaccionar con otros radicales por transferencia de un electrón, lo cual genera un radical superóxido (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los radicales libres se forman debido a la reducción de una molécula o a la ruptura de un enlace covalente. La ruptura puede ser por fisión heterolítica, es decir, los dos electrones que participan en el enlace permanecen en uno de los átomos, dejándolo con carga negativa y el otro átomo con carga positiva. De manera opuesta se da la fisión homolítica, donde los electrones se reparten uno en cada átomo (Tabla 1). La disociación de un enlace covalente requiere energía, la cual proviene del calor, la luz ultravioleta o la radiación ionizante (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Tabla 1. Formación de radicales y iones (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Radical catión	$X - e \rightarrow X^{*+}$
Radical anión	$Y + e \rightarrow Y^{*-}$
Fisión homolítica	$A : B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$
Fisión heterolítica	$A : B \rightarrow A^{-} + B^{+}$

Las ERO pueden ser producto de la transferencia de electrones hacia el O₂. En la siguiente tabla se mencionan algunos tipos de ERO y su proceso de formación (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Tabla 2. Tipos de ERO y su formación (Halliwell y Gutteridge, 2007).

ERO	Formación
Oxígeno Singulete 1O_2	Es generado por la absorción de energía capaz de excitar los electrones. Existen 2 tipos, de los cuales solo uno es radical. Son altamente reactivos ya que no tiene restricción de spin.
Superóxido $O_2^{\bullet-}$	Por adición de un electrón al O ₂ . El electrón ocupa un orbital π^* antienlazante.
Ión Peróxido O_2^{2-}	Se forma por reducción del superóxido, no se considera radical. La fuerza del enlace disminuye debido a la existencia de cuatro electrones en los orbitales antienlazantes π .
Peróxido de hidrógeno H_2O_2	Es la principal ERO que está presente en los sistemas vivos. Es la forma protonada del ión peróxido.
Ión óxido O^{2-}	Tiene lugar si ocurre la eliminación del enlace covalente del O ₂ , por la reducción del ión peróxido con dos electrones más, lo cual disminuye la fuerza del enlace.
Radical hidroxilo $\bullet OH$	El radical hidroxilo es producido a partir del peróxido de hidrógeno vía la reacción de Fenton. También se forma por la fisión homolítica del enlace covalente del agua.

Las ERO son generadas en los sistemas biológicos durante los procesos patológicos y fisiológicos normales, así como por la influencia de fuentes



externas, como los aditivos de los alimentos, fármacos, luz UV, radiación ionizante y la contaminación ambiental. Durante los últimos años se ha establecido que las ERO están involucradas en el desarrollo de ciertas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardíacas, arterioesclerosis, artritis reumatoide y enfermedades neurodegenerativas, por mencionar algunas. El proceso durante el cual se pueden generar estos daños se denomina estrés oxidativo, el cual se ha definido como consecuencia de una condición de desbalance entre la cantidad de moléculas oxidantes (ERO y otras especies reactivas) que supera la capacidad de los antioxidantes de contrarrestarlos (Briviba y Sies, 1994).

Para contrarrestar los daños causados por los agentes oxidantes existen sistemas endógenos de defensa antioxidantes (enzimáticos y de bajo peso molecular), cuya actividad se ve complementada con la acción de los antioxidantes obtenidas de la dieta (vitaminas, micronutrientes, metales traza, etc.). Los antioxidantes consumidos por humanos y animales a partir de las plantas son metabolitos secundarios utilizados por las mismas para su propia protección contra el daño oxidativo, algunos de los más conocidos son la vitamina C, la vitamina E, la ubiquinona, los carotenos, los esteroides, los polifenoles, los ácidos fenólicos, los lignanos y los flavonoides (Briviba y Sies, 1994; Choe y Min, 2009).

Entre las características por las cuales algunos metabolitos secundarios son considerados antioxidantes se encuentra su alta capacidad reductora, es decir, la facilidad de donar un hidrógeno a las ERO para suprimir su reactividad. Como consecuencia de la reducción el antioxidante sufre una oxidación y se convierte en radical, sin embargo, cuando éste tiene un anillo aromático o con dobles ligaduras conjugadas, el electrón desapareado del mismo entra en resonancia, lo cual disminuye su reactividad mientras no sea reducido por otra molécula antioxidante. Otro mecanismo para suprimir la reactividad de las ERO ocurre cuando el antioxidante se une al mismo formando un aducto, con lo cual también suprime su reactividad. Aunado a lo anteriormente descrito, se les considera antioxidantes a aquellas moléculas que tienen la capacidad de quelar

iones metálicos, esto se debe a que los metales catalizan reacciones de oxidación, principalmente las de iniciación; por ejemplo las reacciones de inicio de la lipoperoxidación. Existe un mecanismo antioxidante que se da por transferencia de energía, éste tiene lugar específicamente en el oxígeno singulete. El oxígeno singulete se genera por absorción energía, la cual es capaz de excitar sus electrones hacia orbitales superiores; algunos antioxidantes reciben esa energía devolviéndolo a su estado basal, en consecuencia es menos reactivo. Para que la transferencia ocurra, el nivel de energía del antioxidante debe ser cercano o estar un poco por debajo de la energía del oxígeno singulete (Choe y Min, 2009).

Como ejemplos típicos de moléculas antioxidantes se puede mencionar el tocoferol, comúnmente conocido como vitamina E y el ácido ascórbico o la vitamina C. La vitamina C por sí misma no tiene una actividad antioxidante significativa, sin embargo, ha sido ampliamente estudiada la sinergia que realiza con la vitamina E al aumentar su capacidad antioxidante; esta última protege a los lípidos de la membrana celular del daño oxidativo al atrapar los radicales que inician la lipoperoxidación (Takahisa *et al.*, 1985). Por su parte la vitamina C reduce la tasa de consumo de la vitamina E ya que reduce al radical tocoferol. Otro ejemplo son los ubiquinoles, la forma más reducida de la ubiquinona, éstos pueden reaccionar especialmente con el oxígeno singulete (Briviba y Sies, 1994).

Uno de los grupos de metabolitos secundarios más mejor estudiados por su poder antioxidante son los carotenoides, cuyos representantes más conocidos son el β -caroteno y el licopeno. Los carotenos actúan por abstracción de un átomo de hidrógeno o de un electrón a partir de moléculas que pueden catalizar el daño por radicales o reaccionar con el O_2 en su estado basal. Por ejemplo, la unión con el oxígeno singulete se da por transferencia de energía y produce un oxígeno en estado basal y un carotenoide radical. Por su parte, los flavonoides y los compuestos fenólicos también inhiben la lipoperoxidación al desactivar los radicales que la desencadenan las reacciones de oxidación, como el superóxido, el radical peróxido o el oxígeno singulete (Briviba y Sies, 1994).



3.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y DISTRIBUCIÓN DE *J. mimosifolia*

J. mimosifolia es una de las 49 especies del género *Jacaranda* que pertenece a la familia Bignoniaceae. Se considera originaria del territorio noreste de Argentina y algunas zonas de Bolivia, Brasil y Paraguay, se desarrolla en climas tropicales y secos a una altitud entre los 500 y 2 400 metros sobre el nivel del mar. En México es una especie introducida y actualmente está ampliamente distribuida a lo largo de todo el territorio (Dorado *et al.*, 2012).

Fenológicamente se describe como un árbol de copa amplia con una altura de entre 8 y 12 metros. Tiene una longevidad de hasta 100 años. Las flores presentan una coloración lavanda y son ligeramente fragantes. Las hojas son de aspecto plumoso y tienen una disposición bipinnada o de pinnas alternas. Cada flor consta de un diminuto cáliz en forma de taza, una corola delgada y tubular con 5 pétalos delicadamente ondulados y unidos, los 5 lóbulos están redondeados y doblados hacia afuera, extendiéndose en forma de una campana. Las flores se disponen como panículas piramidales con más de 80 inflorescencias terminales por grupo axilar, se marchitan rápidamente, son caedizas durante la primavera y preceden al follaje. El fruto es leñoso, dehiscente, se describe como plano y en forma de castañuela, contiene una gran cantidad de semillas pequeñas, las cuales se producen a finales de otoño y permanecen todo el año (figura 1) (Lesur, 2011).

4. ANTECEDENTES

Los antecedentes sobre *J. mimosifolia* que se consideraron en este trabajo son aquellos artículos que reportan metabolitos secundarios aislados y caracterizados por primera vez, así como aquellos en los cuales se identificaron compuestos ya conocidos para la especie o en otras especies y que son reportados por primera vez en *J. mimosifolia*. También se incluyen los resultados sobre la actividad biológica de los extractos de *J. mimosifolia*, así como reportes etnobotánicos sobre los usos de dicha la planta en la medicina tradicional.

Tabla 3. Antecedentes de *J. mimosifolia*.

Autor y año	Contribución
Mahran <i>et al.</i> , 1991	<p>A partir de las flores de <i>J. mimosifolia</i> y <i>J. acutifolia</i> se aislaron 2 antocianinas, delfinidina 3,5-diglucósido, delfinidina 3-glucósido (figura 2) y 2 flavonas, 7-O-neohesperidósido de apigenina y 7-O-glucósido de apigenina.</p> <div data-bbox="730 1149 1050 1361" style="text-align: center;"> </div> <p data-bbox="778 1395 1002 1429">Figura 2. Delfinidina.</p>
Nicasio y Meckes, 2005	<p>Validaron el uso tradicional de <i>J. mimosifolia</i> en el tratamiento contra la hipertensión, registraron la disminución de la frecuencia cardiaca en hasta un 25% con la máxima concentración del extracto (400 mg/kg). También observaron un efecto hipotérmico.</p>
Chen <i>et al.</i> , 2007	<p>Determinaron la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales del extracto acetónico de las flores de <i>J. acutifolia</i>, y de sus particiones acuosa, con acetato de etilo y <i>n</i>-butanol. La partición con acetato de etilo presentó la mayor actividad</p>



	<p>antioxidante: DPPH CA₅₀ = 0.049 mg/ml, reducción de ion hierro CA₅₀ = 0.125 mg/ml y la mayor concentración de fenoles totales con 17.20 mgEAG/g. Todos los resultados fueron dependientes de la concentración y consistentes con el contenido de fenoles totales.</p>
Moharram y Marzouk, 2007	<p>Aislaron una nueva molécula denominada jacarinósido, la cual describen como un dímero derivado de acetósidos, el cual contiene ácido cafeico, D-glucosa y L-ramnosa. Identificaron 5 compuestos feniletanoides y 7 flavonoides conocidos, los cuales fueron reportados por primera vez para el género <i>Jacaranda</i>.</p>
Gachet, y Schühly, 2009	<p>Realizaron una revisión bibliográfica del género <i>Jacaranda</i>. Con respecto a <i>J. mimosifolia</i> reportan que los extractos de hojas, hexánico, etanólico y acuso, tienen actividad antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> a una concentración de 0.6 µg. La corteza de la raíz contiene triterpenos, en hojas se ha identificado una hidroquinona, 9 flavonoides, 5 acetósidos, un jacarinósido y en el aceite de las semillas el ácido 8Z, 10E, 12Z-octadocatrienóico. Concluyen que las quinonas están presentes con frecuencia en el género. Las especies de <i>Jacaranda</i> poseen un potencial farmacológico significativo en un contexto etnobotánico.</p>
Zaghloul et al., 2011	<p>A partir del extracto metanólico de corteza seca de <i>J. mimosifolia</i> y sus particiones con éter de petróleo, dietil éter, cloroformo y acetato de etilo, lograron aislar 9 compuestos. Los metabolitos que fueron nuevos reportes para el género <i>Jacaranda</i> son: lupeol, betulinaldehído, ácido termínico, ácido maslínico, glucósido de β-sitosterol. De la partición dietil acetato obtuvieron 3 compuestos glucosilados, los cuales contienen L-ramnosa y D-glucosa en sus estructuras.</p>

Rana <i>et al.</i> , 2012	<p>Evaluaron la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales y de flavonoides totales de <i>J. mimosifolia</i>. A partir de la partición en butanol y en cloroformo del extracto de hojas aislaron un nuevo glucósido feniletanoide y el compuesto jacaranona, respectivamente. La partición en butanol de ambos órganos de la planta contuvo la mayor concentración de fenoles y de flavonoides totales, con valores de 180.57 mg EAG/g en hojas y 181.85 mg EAG/g en flores para el contenido de fenoles totales, mientras que la concentración de flavonoides totales fue de 55.42 mg de equivalentes de quercetina EQ/g en hojas y 32.99 mg EQ/g de flores.</p>
Solomon <i>et al.</i> , 2013	<p>Realizaron extractos acuosos, etanólicos, acetónicos, con cloroformo y con éter de petróleo de las flores de 7 plantas pertenecientes a la familia Bignoniaceae. En todos los extractos de <i>J. mimosifolia</i> identificaron compuestos fenólicos, quinonas (excepto el extracto en éter de petróleo) y carbohidratos (excepto en el extracto clorofórmico). En el extracto acuoso, acetónico y etanólico se presentaron terpenos; en el de éter de petróleo se identificaron cumarinas; en el acuoso, clorofórmico y acetónico los fitoesteroles; así como proteínas en los extractos acuoso y cloroformico.</p>



5. JUSTIFICACIÓN

Existen 49 especies de jacaranda de las cuales 39 son endémicas de Brasil, país en el cual tienen alto valor en la industria maderera, sin embargo, debido al valor estético que ofrecen los colores de sus flores, en México se pueden encontrar en parques y jardines. Existen reportes etnobotánicos sobre el uso de *J. mimosifolia* como planta medicinal, los resultados de su actividad biológica han sido validados, se han aislado y caracterizado metabolitos secundarios, por ello, se considera una especie con potencial farmacológico no estudiado en su totalidad. Debido a que la mayoría de la investigación existente sobre ésta planta se ha realizado principalmente en las hojas y corteza, se considera que es necesario contribuir al conocimiento del contenido de metabolitos secundarios en otros órganos, como las flores, así como investigar sus propiedades biológicas. Aunado a lo anterior, la presente investigación se justifica con la idea de un buen aprovechamiento de los recursos vegetales, ya que en México *J. mimosifolia* es utilizado como árbol de ornato cuyas flores terminan siendo un desecho de jardinería.

6. HIPÓTESIS Y PREGUNTA CIENTÍFICA

1. ¿Cuáles son los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en las flores de *J. mimosifolia*?
2. ¿Los compuestos que se encuentran en las flores de *J. mimosifolia* poseen propiedades antibacterianas o antioxidantes?
3. ¿Existe alguna relación entre el contenido de metabolitos secundarios de las flores de *J. mimosifolia* y la actividad biológica que llegue a poseer?

Al analizar la partición metanólica de flores de *J. mimosifolia* se identificarán los compuestos presentes en dicha especie y serán caracterizados químicamente, con ello se contribuirá al conocimiento fitoquímico de la planta. Al evaluar la actividad antibacteriana y antioxidante se conocerá de manera general el potencial farmacológico del extracto floral.



7. OBJETIVOS

General

Determinar la composición química de las flores de *J. mimosifolia*, y algunas actividades biológicas.

Particulares

- Obtener el extracto metanólico de las flores de *J. mimosifolia*.
- Evaluar la actividad antibacteriana y antioxidante del extracto.
- Identificar de manera cualitativa los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto.
- Aislar e identificar los metabolitos secundarios para contribuir al conocimiento fitoquímico de los metabolitos secundarios del extracto de flores de *J. mimosifolia*.

8. METODOLOGÍA

8.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Las flores de *J. mimosifolia* fueron colectadas en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala en abril de 2013. Un ejemplar se depositó el herbario IZTA y se le asignó el número de registro 2484 IZTA. El extracto se obtuvo por maceración con metanol del tejido fresco, se concentró a presión reducida en rotavapor y se calculó el rendimiento del extracto por diferencia de peso. Con el fin de separar los compuestos de alta y baja polaridad, se hizo la partición con metanol y hexano.

8.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

8.2.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en agar Kirby-Baüer con sensidiscos (modificado por Koneman *et al.*, 1985), a una concentración de 2 mg de extracto/sensidisco y como control positivo cloramfemicol 25 µg/sensidisco. Dicha metodología se realizó con las particiones metanólica y hexánica del extracto. Se utilizaron bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Como modelo bacteriano de Gram negativas se utilizaron las siguientes cepas: *E.coli* 132MR, *E. coli* 1249MR, *E. coli* 28MR y dos cepas *E. coli* aisladas de casos clínicos (CC). Los bioensayos para bacterias Gram positivas se realizaron en las siguientes cepas: *S. aureus* CC, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 28MR, *S. epidermidis* y *S. typhi* CC.

8.2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de la partición metanólica del extracto se determinó mediante el método de decoloración del radical libre DPPH, a una concentración de 250 µM en metanol. Éste método consiste en medir la decoloración que presenta la solución color morado del radical DPPH, al ser reducido por los compuestos contenidos en la partición metanólica del extracto,



lo cual se observa al tornarse amarilla. La medición de la decoloración se realiza por espectrofotometría a una absorbancia de 515 nm (Serrano, 2013).

A partir de una solución stock de 2.5 mg del extracto en 10 ml de metanol se realizaron las siguientes diluciones: 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75 $\mu\text{g/ml}$, esto con el objetivo de tener proporcionalidad entre los datos, al graficar la concentración del extracto contra el porcentaje de decoloración que presentó. Se llevaron a cabo un total de ocho repeticiones para cada concentración (Serrano, 2013).

La unidad para evaluar la capacidad antioxidante que se utilizó fue la capacidad antioxidante media o CA_{50} , que es la concentración del extracto a la cual el radical DPPH es reducido en un 50% de su concentración. Ésta se calculó a partir la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración, realizada con las diversas concentraciones del extracto. Como control negativo se utilizó metanol y como control positivo quercetina a concentraciones entre 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ (Serrano, 2013). Valores menores de la CA_{50} indican una mayor capacidad antioxidante, ya que se requiere menos cantidad de extracto para reducir en un 50% al radical DPPH.

8.3 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA

8.3.1 MÉTODOS CUALITATIVOS

La primera fase consistió en el reconocimiento cualitativo, es decir presencia o ausencia de los distintos grupos de metabolitos secundarios, para ello se llevaron a cabo reacciones colorimétricas de identificación para terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos y glucósidos.

La identificación de terpenos se realizó con una cromatografía en capa fina (CCF) en Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck 0.2 mm de espesor), el tamaño de la placa fue de 1.5 centímetros de ancho por 8.5 centímetros de largo. Como fase móvil se utilizaron los disolventes diclorometano y hexano para las particiones metanólica y hexánica respectivamente. Se colocó cada disolvente en una

cámara cromatográfica y se dejó saturar, posteriormente se colocó una pequeña muestra del extracto a 1 cm del borde de la placa, ésta se introdujo a la cámara. Se mantuvo hasta que el solvente ascendió a 1 cm por debajo del borde superior. Como agente cromógeno se utilizó el reactivo de vainillina y ácido sulfúrico, el cual se asperjó sobre la placa y después se calentó sobre una parrilla eléctrica, lo anterior debido a que se sabe que el reactivo de vainillina reacciona con el calor y detecta terpenos (Teran, 2006).

Para llevar a cabo la identificación de alcaloides se tomó una porción de la partición metanólica del extracto y se suspendió en dos tubos de ensaye, uno de ellos contenía en solución el reactivo de Dragendorff y el otro tubo el reactivo de Meyer, posteriormente se observó la presencia o ausencia de precipitados o cambios de coloración. La prueba de Dragendorff se considera positiva si se presentan precipitados color anaranjado-marrón y la de Meyer muestra un halo blanquecino en presencia de alcaloides (Apéndice II).

Con respecto a la determinación de compuestos fenólicos, para esta prueba se tomó una pequeña muestra de la partición metanólica del extracto y se disolvió en metanol dentro de un tubo de ensaye, a ésta solución se le agregó cloruro férrico. Los resultados son positivos sí se presenta un precipitado de coloración rojiza a púrpura o azulada (Apéndice II).

El procedimiento para la identificación de glucósidos fue el siguiente: una porción de la partición metanólica se disolvió en metanol, se agregó el α -naftol en solución alcohólica y posteriormente se vertió ácido sulfúrico, lentamente por las paredes del tubo de ensaye (Apéndice II). La presencia de glucósidos se observa como un precipitado rojo-violeta (Domínguez, 1988).

8.3.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La concentración de compuestos fenólicos totales de la partición metanólica del extracto floral de *J. mimosifolia* se determinó a través de la reacción de Folin-Ciocalteu. Como referencia se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las siguientes concentraciones crecientes: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$, la medición se realizó por espectrofotometría a una absorbancia de 760 nm. La curva de calibración fue utilizada para interpolar la absorbancia de



una solución metanólica del extracto a una concentración de 0.2 mg/ml. Los resultados se expresan como EAG/g de extracto (Serrano, 2013).

8.3.3 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO

a) CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA

Como estrategia metodológica para obtener compuestos puros, la partición metanólica del extracto metanólico de flores de *J. mimosifolia* se sometió de manera secuencial a dos cromatografías en columna abierta (CC). Previamente y con el fin de determinar la mezcla de disolventes a utilizar como fase móvil para cada CC, se observó el desplazamiento de una pequeña muestra de la partición en cromatografía en capa fina (CCF), utilizando una placa de Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck 0.2 mm de espesor) de 1.5 centímetros de ancho por 8.5 centímetros de largo, éste procedimiento se realizó con solventes de diferente polaridad.

La primera CC fue de fase inversa, para la cual se utilizó como fase estacionaria una resina adsorbente de poliestireno tipo estireno divinil benceno con un nombre comercial es Diaion HP-20 (Sigma-Aldrich). Las características de ésta fase estacionaria son las siguientes: tamaño de partícula mayor a 250µm, radio del poro 290 Å y área de la superficie 590 m²/g Para complementar el procedimiento los eluyentes utilizados fueron solventes de mayor a menor polaridad de metanol, metanol-acetona y acetona.

Las alícuotas de cada CC fueron analizadas por CCF con el fin de comprobar la pureza de los compuestos obtenidos; así como para decidir cuáles alícuotas debían ser agrupadas, de acuerdo al criterio de que compartieran el mismo número y posición de las bandas, esto para propiciar la formación de cristales de compuestos puros. Se utilizaron cromatofolios de aluminio cubiertos con Gel de Sílice (Merck 0.2 mm de espesor), con un tamaño de 4 centímetros de largo por un centímetro de ancho. Las placas se observaron bajo una lámpara de luz UV a 254 y 366 nm y posteriormente se revelaron con solución cromogénica de

sulfato cérico en ácido sulfúrico, ésta mezcla permite observar la presencia de compuestos orgánicos.

Una vez agrupadas las alícuotas se eligió aquella para la cual se observarían el mayor número de bandas separadas de manera definida. Dicha muestra se sometió a una segunda CC cuya fase estacionaria fue Gel de Sílice 60 F254 (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck malla 70-230 ASTM), como eluyentes se utilizaron mezclas de disolventes de menor a mayor polaridad, hexano-acetato de etilo y acetato de etilo- metanol. Las alícuotas obtenidas de ésta segunda CC también fueron analizadas y procesadas en CCF bajo los mismos criterios y objetivos utilizados en la primera CC.

b) CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las fracciones obtenidas de la CC que estuvieron disueltas en mezclas de solventes de baja polaridad, fueron sometidas a un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-EM). El equipo utilizado fue un cromatógrafo (Agilent technologies) modelo 6850, cuya columna HP-5MS (Aligent technologies) presenta medidas de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro y película de 0.25 µg que a su vez está acoplada a un espectrómetro de masas (Agilent technologies modelo HP-5MS). El gas utilizado como fase móvil fue helio (He). El tipo de inyección fue Split o manual. La cantidad de muestra que se inyectó fue de 1 µl. El tiempo total de análisis fue de 40 minutos y la identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST, versión 8.0.



9. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

9.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

9.1.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La partición metanólica y hexánica de flores de *J. mimosifolia* no tuvieron actividad antibacteriana ya que no formaron halos de inhibición, es decir no afectaron el crecimiento poblacional bacteriano en ninguna de las cepas de las especies estudiadas: *E.coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. typhimurium*. El control positivo, cloranfenicol, si produjo halos de inhibición en todas las cepas.

Los metabolitos secundarios presentes en flores de *J. mimosifolia* son diferentes a de los contenidos en otros órganos de la planta, ya que algunos artículos reportan que los extractos obtenidos a partir ramas, semillas y hojas de la misma, presentan actividad antibacteriana. Los extractos de ramas y semillas de *J. mimosifolia* tienen una significativa actividad antibacteriana en un intervalo de concentraciones del extracto entre 8.4 y 26.2 µg/ml, esto fue evaluado por Mahran y colaboradores en 1991 para diferentes especies, como *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *B. cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona sp.*, *Mycobaterium phlei* y *Neisseria sp.* Por otro lado, los extractos de hojas de diferente polaridad (acuoso, metanólico y hexánico) mostraron alta actividad antibacteriana (concentraciones entre 2.3 y 14.4 µg/ml) en *E. coli* (acuoso), *S. aureus* (metanólico) y *B. cereus* (acuoso, metanólico y hexánico) (Rojas *et. al.* 2006), en comparación con los 2 mg de extracto/sensidisco utilizados en el presente estudio que no tuvieron efecto inhibitorio.

De acuerdo a los antecedentes, se reporta que el aceite esencial de flores *J. acutifolia* contiene ácidos grasos, terpenos y otros metabolitos que poseen actividad antibacteriana y antifúngica. En dicha investigación, la actividad antimicrobiana sobre cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *Candida albicans* fue considerada por los autores como relevante, ya que sus resultados mostraron halos de inhibición entre 22-25.5 mm y una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre 0.9 y 10.9 mg/ml; y moderada en *Shigella flexneri* y *S. typhimurium*

con halos de inhibición entre 13-14.5 mm (Mostafa *et al.*, 2015). Sin embargo, en éste estudio se considera que concentraciones mayores a 2 mg/ml no son significativas, ya que el efecto antibacteriano por altas concentraciones del extracto se atribuye al exceso de metabolitos más que a su actividad antibacteriana.

Al comparar éstos resultados obtenidos en la presente investigación deben ser considerados dos factores: que la concentración del aceite esencial/sensidisco fue de 30 mg/ml, quince veces mayor que la concentración de las particiones utilizadas en este estudio; que el tipo de metabolitos secundarios presentes en un aceite esencial y en un extracto difieren de manera significativa. Debido a que *J. mimosifolia* y *J. acutifolia* pertenecen al mismo género, se esperaría que tuvieran una composición similar de metabolitos secundarios, sin embargo, esta puede cambiar de una región a otra. Si se considerara que los extractos de ambas especies tuviesen en común algunos metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas, la ausencia de actividad pudo deberse a que se elaboró el extracto metanólico. Aunque los extractos metanólicos si pueden contener metabolitos secundarios de baja polaridad, como los que se encuentran en los aceites esenciales, la concentración de los mismos es menor en extractos polares que en no polares. En posteriores estudios se recomendaría obtener los aceites esenciales.

Aunado a lo anterior, diversos factores deben ser tomados en cuenta al explicar por qué los extractos de las plantas pueden o no presentar propiedades antibacterianas, del tipo bactericida o bacteriostático. Debido a que los extractos contienen mezclas de diversos grupos de metabolitos secundarios, con modos de acción diferentes (Da Silveira *et. al.*, 2012). La ausencia de actividad antibacteriana en las cepas sometidas a prueba pudo deberse a que los compuestos contenidos en las particiones del extracto, no tienen la capacidad de modificar la estructura celular bacteriana, inhibiendo la síntesis de la pared celular o alterando la permeabilidad de su membrana plasmática, no intervienen en procesos metabólicos, como la inhibición de alguna fase de la replicación genética, la síntesis proteica o de metabolitos esenciales para la supervivencia de las bacterias, mecanismos por los cuales actúan las sustancias antibacterianas. Otro de los factores pudo haber sido inherente a las



bacterias mismas, ya que las cepas utilizadas fueron cepas resistentes o aisladas de casos clínicos, por lo cual pudieron presentar más de un mecanismo de resistencia.

9.1.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante se determinó para la partición metanólica del extracto de *J. mimosifolia*. Lo anterior, debido a que el DPPH es soluble en solventes polares, especialmente en metanol. Otra de las razones tomadas en consideración fue el hecho de que existe una relación entre la actividad antioxidante de los extractos vegetales y la presencia de compuestos fenólicos que contengan grupos funcionales con capacidad reductora, los cuales se caracteriza por su naturaleza polar (Chen *et al.*, 2007).

El resultado del porcentaje de reducción del radical libre DPPH por acción del extracto fue producto del promedio de las ocho repeticiones realizadas. Se calculó una CA₅₀ de 181.5 µg/ml a partir de la ecuación de regresión $y = 0.255x + 3.7154$ (Figura 3).

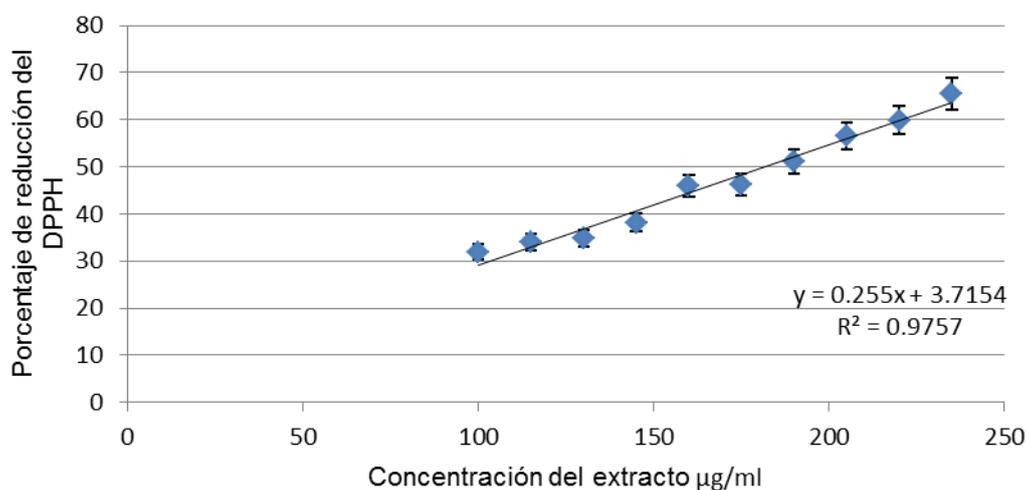


Figura 3. Porcentaje de reducción del DPPH por acción de la partición metanólica del extracto floral de *J. mimosifolia* (n=8±DE).

Como control positivo se utilizó el reactivo quercetina, ya que es un antioxidante comercial conocido y ampliamente utilizado. El cual tuvo una CA₅₀ de 5.18 µg/ml (Figura 4).

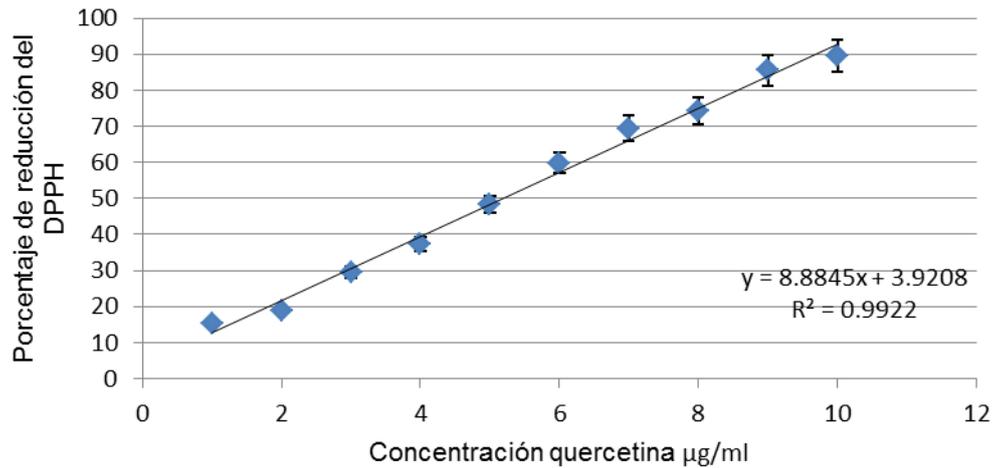


Figura 4. Porcentaje de reducción del DPPH por acción de la quercetina ($n= 8\pm DE$).

Al observar el valor CA_{50} de la partición metanólica del extracto ($181.5 \mu\text{g/ml}$) y el CA_{50} de la quercetina ($5.18 \mu\text{g/ml}$), es evidente que la cantidad requerida para reducir el 50% de los radicales es considerablemente mayor en la partición del extracto en comparación con el control positivo. Debido a ello, se pensaría que la partición metanólica no tiene una buena capacidad antioxidante. Sin embargo, era de esperarse la quercetina fuese un mejor antioxidante porque es un compuesto puro, mientras que la partición está constituida por una mezcla de diversos metabolitos secundarios, de los cuales no todos tienen la capacidad de reducir radicales. Por lo anterior, si se considera que la partición del extracto presenta una buena capacidad antioxidante, esto es corroborado por la FDA (Food and Drug Administration, USA), la cual menciona que se consideran antioxidantes aprobados aquellos que estén por debajo de a $200 \mu\text{g/ml}$ (Gardziella *et al.*, 2000).

La capacidad antioxidante que tienen algunos extractos de las flores de *J. mimosifolia* fue evaluada por Rana y colaboradores en 2012. Sin embargo, sus resultados no pueden ser comparados con el del presente estudio ya que ellos no consideraron como unidad la capacidad antioxidante media. No obstante, los datos de ésta investigación pueden ser cotejados con información de la actividad biológica de los extractos florales de especies del mismo género. Chen y colaboradores en 2007 informan la actividad antioxidante del extracto acetónico y sus particiones con acetato de etilo, *n*-butanol y agua, de flores de *J. acutifolia*. A partir de 1.5 kg de tejido obtienen un rendimiento del 10.20, 6.03,



1.82 y 2.35% con los solventes antes mencionados, respectivamente. Los valores más bajos de la capacidad antioxidante media que ellos obtuvieron fueron 49 µg/ml con la partición de acetato de etilo, mientras los más altos fueron de 538 µg/ml con la partición acuosa. Estos resultados nos podrían indicar que los compuestos que muestran la habilidad de donar electrones y con ello inhibir los radicales libres son de mediana polaridad, ya que los más polares contenidos en la partición acuosa tuvieron una CA_{50} mayor de 200 µg/ml, por lo que no se considera que haya tenido buena actividad antioxidante (Gardziella *et al.*, 2000).

Al comparar la actividad antioxidante de *J. acutifolia* y *J. mimosifolia*, es lógico que *J. acutifolia* haya presentado un valor CA_{50} considerablemente más bajo, si se considera que Chen y colaboradores hicieron diversas particiones con disolventes de distinta polaridad, lo cual resulta en una separación diferencial. Esto es importante ya que la presencia o ausencia de un determinado tipo de metabolitos depende del disolvente utilizado para su extracción, así como del estadio fisiológico de las flores (Solomon, 2013).

9.2. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA

9.2.1 MÉTODOS CUALITATIVOS

Las reacciones de identificación con la solución de vainillina, los reactivos de Dragendorff, cloruro férrico y el α -naftol fueron positivos (Tabla 4), lo cual indica que los metabolitos secundarios de la partición metanólica del extracto metanólico de flores de *J. mimosifolia* podrían pertenecer al grupo de los terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos y glucósidos. No se observó ningún precipitado blanquecino al incorporar la muestra en la solución del reactivo de Meyer, por lo que se considera negativo en detección de alcaloides.

Tomando en cuenta la información disponible sobre la composición fitoquímica de flores de *J. mimosifolia*, se corrobora la presencia de terpenos, compuestos fenólicos y glucósidos, ya que también fueron identificados por Solomon y colaboradores en 2013. De igual manera estos autores mencionan como

constituyentes principales de los extractos de alta polaridad a las quinonas, cumarinas, fitoesteroles y carbohidratos.

Tabla 4. Reacciones de identificación de los diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en la partición metanólica del extracto metanólico de flores de *J. mimosifolia*.

Metabolitos	Terpenos	Alcaloides	Compuestos Fenólicos	Glucósidos
Reactivos				
Vainillina y H ₂ SO ₄	+			
Dragendorff		+		
Mayer		-		
Cloruro Férrico			+	
α-naftol (Molish)				+

Debido a la gran diversidad estructural de los compuestos fenólicos, no existe una metodología que nos permita discernir de manera cualitativa los diferentes grupos. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Moharram y Marzouk en 2007, los fenoles contenidos en flores de *J. mimosifolia* podrían ser de tipo flavonoides glucosilados, como antocianidinas condensadas con unidades de glucosa. Lo anterior tiene mayor validez si se toma en cuenta que las antocianinas son los principales constituyentes de los pigmentos de las flores, junto con las flavanonas y los flavonoles que fungen como co-pigmentos y gracias a los cuales se observan diferentes tonalidades de los colores (Solomon *et al.*, 2013).

Con respecto a los resultados para alcaloides, aunque la reacción con el reactivo de Dragendorff dio positiva, no es posible aseverar que *J. mimosifolia* contienen alcaloides, ya que éste reactivo también puede formar precipitados con proteínas, purinas, betalaínas, cumarinas y polifenoles (Domínguez, 1988).



Lo anterior se suma al hecho de que la reacción entre la partición del extracto con el reactivo de Meyer no fue positiva, indicando la ausencia de alcaloides, además de que no han sido identificados previamente para el género.

9.2.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La concentración de compuestos fenólicos totales presentes en la partición metanólica del extracto de flores de *J. mimosifolia* se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal de la curva de ácido gálico $y = 0.0114x - 0.0348$ (figura 5), lo cual resulta en la una concentración 226.8 mg EAG/g de extracto, es decir, se estima que el 22.68% de los compuestos del extracto son compuestos fenólicos. Dicha cantidad es mayor a la calculada mediante ésta misma metodología por Rana y colaboradores en 2012 para el extracto de flores de *J. mimosifolia* crecida en la India, quienes reportan una concentración de 181.85 mg EAG /g. Esto puede explicarse principalmente a que la producción de metabolitos secundarios es diferentes en las diferentes latitudes, está sujeta a la influencia del ambiente, de otros organismos, así como a la temporalidad y es estadio fenológico de la misma (Anaya, 2003).

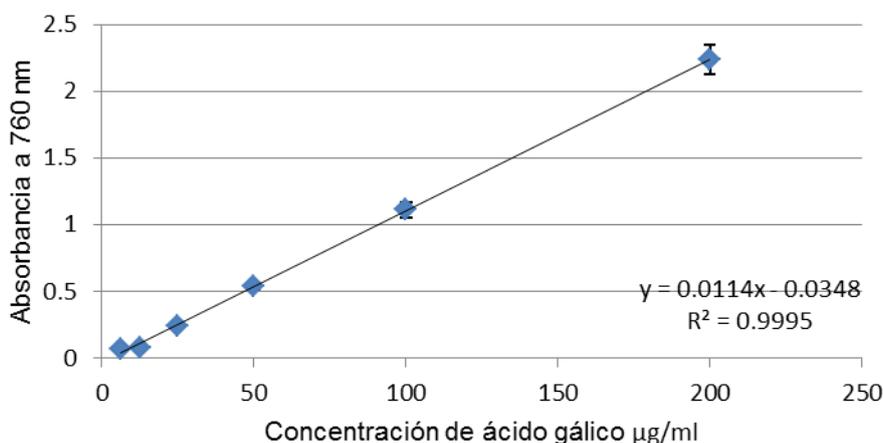


Figura 5. Curva patrón para determinar la concentración total de fenoles (n= 3±DE)

9.2.3 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO

El rendimiento del extracto fue de 10%. A partir de primera CC, se obtuvieron un total de 49 alícuotas reunidas en 11 fracciones (Tabla 5). Una característica al utilizar resinas como fase estacionaria en una CC es que las polaridades de

las fase móvil y la fase estacionaria se invierten ya que la primera es más polar que la segunda, contrario a lo que sucede cuando se utilizada de manera convencional el gel de sílica. De acuerdo con las especificaciones, el uso de resinas en la separación de compuestos es recomendable para la purificación de antibióticos, biomoléculas, así como para la eliminación de azúcares y sales. Aunado a lo anterior, en algunos artículos consultados utilizan ésta resina para separar compuestos altamente polares, como el caso de Yan y colaboradores en 2002, quienes reportan que al utilizar la resina Diaion HP-20 para purificar compuestos de los frutos de arándano, obtuvieron antocianinas, proantocianidinas y flavonoles glucosilados.

Tabla 5. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta (fase estacionaria resina Diaion HP-20), realizada a la partición metanólica del extracto metanólico de flores de *J. mimosifolia*.

Eluyente	Proporción	Número de alícuotas	Fracciones agrupadas	Número de fracción asignado
Metanol	100%	27	1-10	1
			11-14	2
			15-19	3
			20-23	4
			24-27	5
Metanol-Acetona	1:1	11	28-30	6
			31-34	7
			35	8
			36-37	9
			38	10
Acetona	100%	11	39-49	11



De acuerdo con la literatura consultada los flavonoides presente en las flores de *J. mimosifolia* podrían ser de tipo antocininas, específicamente delfinidinas, ya que a éstas se les ha atribuído producen el color morado y azul. Lo anterior concuerda con lo reportado por Mahran y colaboradores en 1991, quienes aíslan a partir de las flores de *J. mimosifolia* dos antocianinas (3,5- delfinidina diglucósido y 3-glucósido de delfinidina) y dos flavonas (7-O-neohesperidósido de apigenina y 7-glucósido de apigenina). Se considera entre las funciones de los metabolitos secundarios (principalmente flavonoides, carotenos y en menor medida betalaínas) contenidos en las flores, proveer el color y sabor a las flores y frutos, éstas características tienen importancia reproductiva en las plantas ya que influyen las interacciones ecológicas entre plantas y animales, como la atracción de polinizadores y dispersores de semillas (Croteau *et al.*, 2000).

La fracción 11 (Tabla 5), reunida a partir de las alícuotas 39-49, se procesó en una segunda CC, cuya fase estacionaria fue gel de sílice y como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano-acetato de etilo, hexano-metanol y metano. A partir de esta segunda CC se obtuvieron un total de 210 alícuotas, las cuales fueron agrupadas en 49 fracciones (Tabla 6). No se pudo aislar ningún compuesto puro, esto se determinó ya que en las CCF de las fracciones ninguna placa mostró la presencia de una sola mancha y no se obtuvieron precipitados cristalinos.

Tabla 6. Cromatografía en columna abierta de la fracción 11, fase estacionaria sílica gel.

Eluyente	Proporción	Número de alícuotas	Fracciones combinadas	Número de fracción asignado
Hexano-Acetato de etilo	9:1	4	1-2	1
			3-4	2
Hexano-Acetato de etilo	8:2	24	5	3
			6-10	4
			11-19	5
			20-24	6
Hexano-Acetato de	7:3	29	25-27	7

etilo			28-31	8
			32-39	9
			40-46 *43	10
			47-53	11
Hexano-Acetato de etilo	6:4	16	54-63	12
			64	13
			65-69	14
Hexano-Acetato de etilo	1:1	12	70	15
			71-74	16
			75	17
			76-81	18
Hexano-Acetato de etilo	4:6	7	82-83	19
			84-85	20
			86-88	21
Hexano-Acetato de etilo	3:7	13	89	22
			90-92	23
			93-94	24
			95-98	25
			99-100	26
			101-102	27
Hexano-Acetato de etilo	2:8	10	103	28
			104-105	29
			106-108	30
			109-111	31
Acetato de etilo	100%	20	112-113	32
			114-115	33
			116-117	34
			118- 120	35
			121-130	36
				37
Acetato de etilo- Metanol	9:1	28	131-135	38
			136-137	39
			138-144	40



			145-148	41
			149-154	42
			155-160	43
Acetato de etilo- Metanol	8:2	12	161-163	44
			164-165	45
			166-167	46
			168-172	47
Acetato de etilo- Metanol	1:1	10	173	48
			174-182	49
Metanol	100%	15	183-210	50

La alícuota número 43 eluída con la mezcla hexano-acetato de etilo en proporción 7:3 (293.8 mg), presentó una consistencia aceitosa y coloración amarillenta debido a lo cual fue posible procesarla en GC/MS.

El cromatograma de la alícuota número 43 fue poco ilustrativo debido a la presencia de una gran cantidad de picos con concentraciones no significativas. La identificación de compuestos se realizó por comparación del espectro de masas con la base de datos de la biblioteca NIST, versión 8.0. Con una probabilidad de 85% se identificó el ácido hexadecanóico (figura 6), el cual representa el 7.34 % de la fracción. Dicho porcentaje convertido en peso resulta en 21.56 mg de ácido hexadecanóico contenido en una fracción de 293.8 mg.

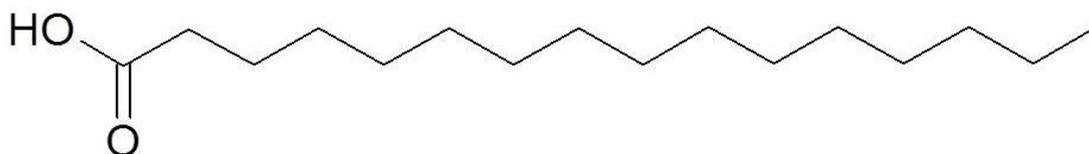


Figura 6. Ácido hexadecanóico.

Con respecto al ácido hexadecánico, en el presente estudio se reporta por primera vez como componente del extracto metanólico de las flores de *J. mimosifolia*. Los ácidos grasos y lípidos en general tienen un alto valor

energético, inclusive mayor que el de los azúcares, por ésta razón la presencia de los mismos en el néctar pudiera conferir cierta ventaja en la atracción de polinizadores para aquellas plantas que los contienen, pues son caracteres que resultan “atractivos” desde el punto de vista nutricional (Anaya, 2003).

De acuerdo a la información disponible en la literatura acerca del contenido de ácidos grasos de flores de *J. mimosifolia*, Kram y colaboradores en 2013, realizaron un ensayo utilizando GC/MS e identificaron en el néctar la presencia de tres ácidos grasos de 12, 16 y 18 átomos de carbono. Los autores de dicha investigación argumentan que la presencia de ácidos grasos libres podría tener un papel de suma importancia para la atracción de polinizadores, ya que consideran que la presencia de éstos compuestos contrarresta algunas características poco favorables para la polinización, como el hecho de que el néctar no tenga una coloración atrayente y que su disposición es menos accesible ya que se encuentra hasta el fondo de la flor tubular.



10. CONCLUSIONES

Las particiones metanólica y hexánica del extracto metanólico floral de *J. mimosifolia* no tuvieron actividad antibacteriana.

La fracción metanólica del extracto metanólico floral de *J. mimosifolia* presentó una capacidad antioxidante media de 181.5 µg/ml.

La fracción metanólica del extracto metanólico de flores de *J. mimosifolia* presenta metabolitos secundarios del grupo de los terpenos, compuestos fenólicos y compuestos glucosilados.

La fracción metanólica del extracto contiene un 22.6% de compuestos fenólicos.

En una de las fracciones de la cromatografía en columna abierta se identificó el ácido hexadecanóico, el cual se reporta por primera vez en la especie.

11. APÉNDICES

APÉNDICE I

METABOLITOS SECUNDARIOS

ALCALOIDES

Originalmente se consideraba a los alcaloides como metabolitos derivados de las plantas que contuvieran nitrógeno en su estructura y que además fuesen farmacológicamente activos, sin embargo dicha definición no puede ser generalizada, ya que muchos de éstos no tienen actividad farmacológica y no se han aislado únicamente en plantas (Croteau *et al.*, 2000).

Al igual que otras moléculas que contienen nitrógeno, los alcaloides son sintetizados a partir de aminoácidos, especialmente de triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina y arginina, los cuales durante la biosíntesis pueden combinarse con esteroides o con derivados de terpenos. Se ha descrito que el átomo de nitrógeno en dichas sustancias es casi siempre parte de un anillo heterocíclico, derivado de la estructura original de algunos aminoácidos aromáticos o resultado de la ciclización de aminoácidos alifáticos (Cseke y Kaufman, 1999).

Los alcaloides se encuentran en un 20 a 30% de las plantas vasculares, sin embargo también han sido aislados en animales, aunque no se ha determinado si son biosintetizados por dichos organismos o los consumen de alguna fuente externa. Se considera que los alcaloides participan en la defensa química ya que se ha comprobado su toxicidad y un amplio rango de actividades fisiológicas en animales.

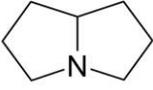
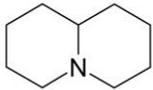
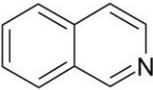
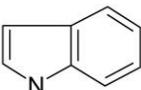
La importancia antropocéntrica de los alcaloides es muy antigua ya que algunas plantas ricas en estos compuestos son utilizadas para preparar venenos, purgativos, antitusivos, sedantes, pociones para contrarrestar mordidas de serpientes, fiebre, demencia o con fines religiosos. El aislamiento de la morfina en 1806 fue el comienzo del estudio de los alcaloides, desde entonces han influido en la historia de la humanidad de forma benéfica por la

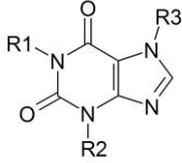


obtención de fármacos o dañina por la producción de drogas (Croteau *et al.*, 2000).

Existen muchas categorías de alcaloides, las cuales se clasifican de acuerdo a su estructura de origen, así se consideran, pirrolidina, tropano, piperidina, pirrolizidina, quinolizidina, isoquinolina y alcaloides indólicos (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación de los alcaloides (Cseke y Kaufman, 1999; Funayana y Cordell, 2015).

Clase	Estructura	Precursor biosintético	Ejemplos
Pirrolidina		Ácido aspártico	Nicotina
Tropano		Ornitina	Atropina, cocaína
Piperidina		Lisina	Coniina
Pirrolizidina		Ornitina	Retrorsina
Quinolizidina		Lisina	Lupinina
Isoquinolina		Tirosina	Codeina, morfina
Indólicos		Triptófano	Psilocibina, reserpina, estricnina

Derivados de bases nitrogenadas		Purina	Cafeína, teobromina, teofilina
---------------------------------	---	--------	--------------------------------

TERPENOS

Conceptualmente los terpenos están conformados por moléculas de isopreno, enlazadas cabeza-cola, cabeza-cabeza o la cabeza con mitad de la molécula (figura 7). El concepto deriva del hecho que la descomposición de terpenos produce el gas isopreno, sin embargo, este compuesto en sí mismo no es precursor en los sistemas biológicos (Croteau *et al.*, 2000).

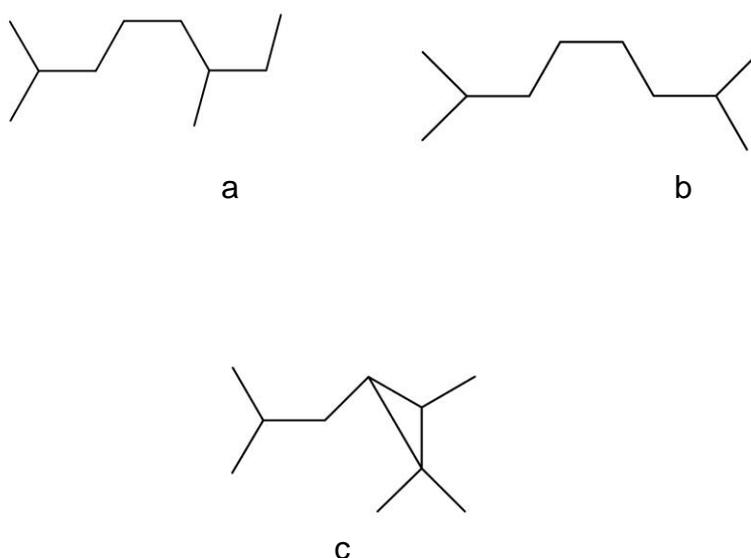


Figura 7. Patrones de enlace entre las unidades de isopreno. a) cabeza-cola, b) cabeza-cabeza, c) cabeza-mitad de la molécula (Croteau *et al.*, 2000).

La clave del descubrimiento de la biosíntesis de terpenos fue el descubrimiento del ácido mevalónico (MVA) y la elucidación de la vía de síntesis a partir de la cual el acetil CoA produce al isopentenil pirofosfato (IPP) a través del MVA. El IPP es el isopreno biológicamente activo y su isómero, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) son los precursores de todos los terpenos. Algunas de las reacciones posteriores durante la síntesis de terpenos son ciclizaciones, re-arreglos



estructurales e incluso pérdida o adición de átomos de carbono (Bramley, 1997).

A nivel intracelular se establece que la biosíntesis de los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos ocurre en el citosol y retículo endoplasmático. Mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos se sintetizan en los cloroplastos. La producción, acumulación y secreción está asociada con la presencia de estructuras anatómicas altamente especializadas como tricomas glandulares, cavidades secretoras en hojas, epidermis glandular, pétalos, etc. (Croteau *et al.*, 2000).

La nomenclatura de los terpenos se basa en el número de unidades de isopreno que contienen, por ésta característica se clasifican en: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos (Croteau *et al.*, 2000).

HEMITERPENOS

Moléculas de cinco carbonos (C_5), es decir, una sola unidad de isopentano (Croteau *et al.*, 2000).

MONOTERPENOS

Conformados por dos unidades de isopreno (C_5) unidas de manera lineal o cíclica. Son los componentes mejor conocidos de las esencias de las flores y de aceites esenciales (figura 8). Tienen importancia económica por la obtención de saborizantes y perfumes (Croteau *et al.*, 2000).

SESQUITERPENOS

Contienen tres unidades de isopreno (C_{15}), pueden ser lineales, bicíclicos y tricíclicos. También forman parte de los aceites esenciales, se les han atribuido actividades como antibióticos, antiherbívoro. La hormona vegetal ácido abscísico es parte de este grupo (figura 8) (Croteau *et al.*, 2000).

DITERPENOS

Moléculas que contienen cuatro unidades de isopreno (C_{20}), están representados en moléculas esenciales como el fitol (figura 8), el cual forma la porción hidrofóbica de la clorofila, las giberelinas (figura 8), consideradas hormonas vegetales y el retinol (Nagarajan y Brindha, 2012). También son parte de las resinas de coníferas y legumbres. Un diterpeno con importancia farmacológica es el taxol, debido a que presenta actividad anticancerígena.

TRITERPENOS

Contienen seis isoprenos (C_{30}), son producto de la unión cabeza-cabeza de dos moléculas de 15 carbonos que a su vez están unidas cabeza-cola. Son sólidos con altos puntos de fusión, Los triterpenos simples son componentes de ceras y de algunas membranas especializadas, se piensa que pueden actuar como moléculas señal. Por su parte los complejos glucosilados, por ejemplo las saponinas, proveen protección contra patógenos (Thimmappa *et al.*, 2014). Ejemplos de esteroides y saponinas se muestran en la figura 8.

TETRATERPENOS

Son producto de la condensación de ocho unidades de isopreno (C_{40}), sus principales representantes son los carotenos (figura 8), los cuales confieren coloración roja, naranja y amarilla, a las flores y frutos de algunas especies. Existen dos tipos, los carotenos que no contiene oxígeno sus anillos terminales y las xantofilas que si los tienen. En los últimos años los carotenos contenidos en vegetales comestibles han sido muy estudiados, esto debido a sus propiedades antioxidantes. En tejidos fotosintéticos los carotenos son componentes estructurales del aparato fotosintético, además de proteger de la fotooxidación (Carranco *et al.*, 2011).

POLITERPENOS

Se consideran moléculas que tienen más de 8 unidades de isopreno (Croteau *et al.*, 2000).

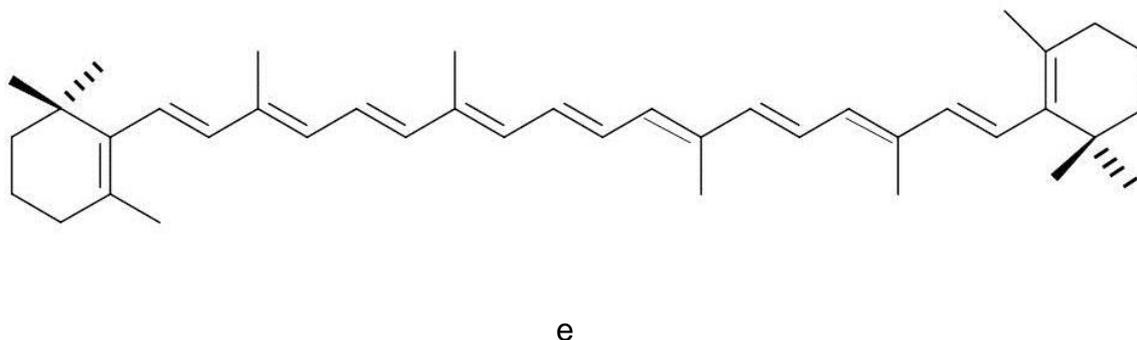


Figura 8. Ejemplos de terpenos. a) limoneno, b) ácido abscísico, c) fitol, d) colesterol, e) β -caroteno (Cseke y Kaufman, 1999).

COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos provienen principalmente de las vías de síntesis del ácido shikímico y del acetato/malonato o de síntesis mixta. La molécula base de los fenoles se caracteriza por tener al menos un anillo aromático, unido con un grupo hidroxilo (figura 9), muchos compuestos derivan de éstos por reacciones de condensación o adición (Strack, 1997).

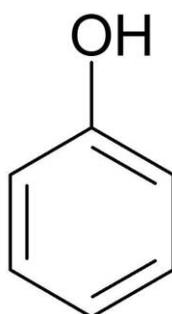


Figura 9. Molécula base de los fenoles.

FENILPROPANOIDES

Como su nombre lo indica los fenilpropanoides contienen una cadena de tres carbonos unida a un anillo aromático de seis carbonos (C_6C_3) (figura 10). Los metabolitos primarios que fungen como sustrato para la síntesis de fenilpropanoides son la fenilalanina y tirosina. La enzima fundamental que desencadena la síntesis de fenilpropanoides es la fenilalanina/tirosina amonio liasa (PAL/TAL), la cual convierte la fenilalanina en ácido cinámico y la tirosina en ácido *p*-cumárico (Croteau *et al.*, 2000).

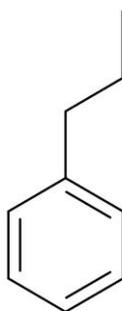


Figura 10. Estructura base de los fenilpropanoides.

Un grupo de fenilpropanoides de importancia son las ligninas y los lignanos, sus precursores base son los monolignoles principalmente del alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico, alcohol sinapílico, cuya síntesis en la mayoría de las plantas parte del ácido cinámico y escasamente del ácido *p*-cumárico. Esta vía de síntesis comprende hidroxilaciones, metilaciones, adición de CoA y reducciones dependientes de NADPH, las cuales ocurren en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, mientras que su polimerización tiene lugar fuera de la membrana plasmática. Las ligninas son el segundo componente más abundante en plantas vasculares (20-30%), se encuentran como polímeros de alcohol coniferílico y sinapílico que forman una matriz tridimensional alrededor de los polisacáridos de la pared celular secundaria de fibras y el xilema secundario (elementos del vaso y traqueidas) y es parte de los tejidos de refuerzo en herbáceas y arbustos. Los lignanos se encuentran ocasionalmente como dímeros y más frecuente como oligómeros principalmente de coniferil alcoholes condensados con monolignoles, alilfenoles y monómeros de fenilpropanoides (enlazados carbono-carbono 8-8', 8-5', 8-4'). La función de los lignanos se ha atribuido a la defensa contra patógenos, como antioxidantes en flores, semillas, ramas, corteza, hojas y raíces (Croteau *et al.*, 2000).

El ácido *p*-cumárico es precursor de otra clase de metabolitos secundarios denominados cumarinas, su síntesis involucra ciclización de la cadena lateral, hidroxilaciones, formación de isómeros *trans/cis* y metilaciones (figura 11). Las cumarinas se encuentran en distintos órganos pero tienen una mayor concentración en flores y frutos ya que forman parte de los compuestos que

proveen aroma dulce. Su función está relacionada con la defensa contra microbios y herbívoros, como inhibidores de la germinación, además de la protección contra rayos UV (Croteau *et al.*, 2000).

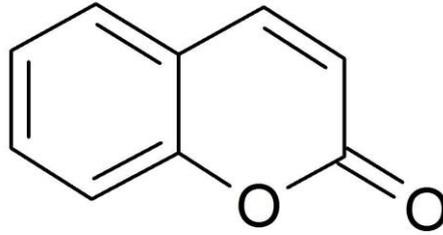


Figura 11. Esqueleto base de las cumarinas.

TANINOS

Los taninos son polímeros con aproximadamente 12 a 16 grupos fenólicos, su principal característica es la astringencia, es decir, su capacidad de formar complejos con proteínas volviéndolas insolubles y precipitándolas (Murphy, 1999). Existen dos tipos de taninos los hidrolizables y los condensados, los cuales son sintetizados por vías diferentes, en esta sección se consideran únicamente a los taninos hidrolizables debido a que su parte fenólica deriva de la forma enol del ácido 3-dehidroshikímico. Su unidad monomérica fundamental es el ácido gálico (figura 12), el cual se polimeriza por esterificación con azúcares (generalmente glucosa) o polialcoholes (Isaza e Hipólito, 2007).

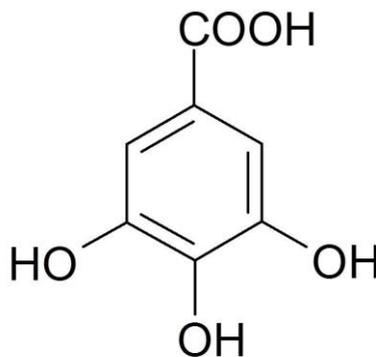


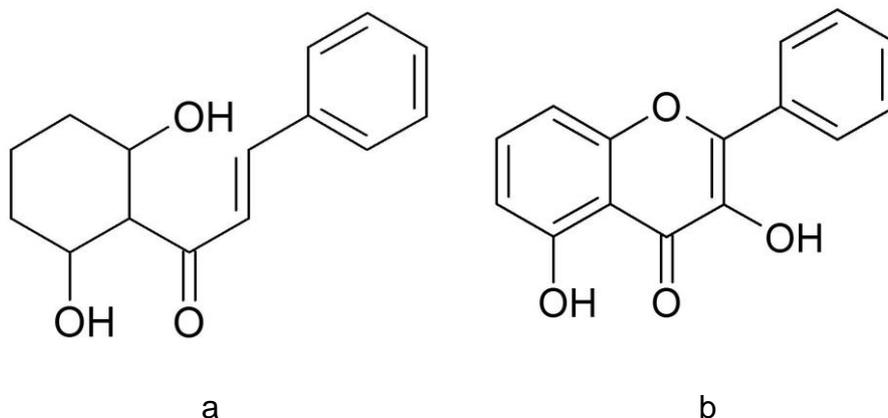
Figura 12. Ácido gálico.



FLAVONOIDES

Comúnmente se describen a los flavonoides con una configuración $C_6C_3C_6$ ya que su esqueleto base consiste en dos anillos benceno, denominados A y B, unidos por un propano ciclado llamado anillo C. Se consideran una enorme clase de compuestos fenólicos, cuyo número supera los 4500 flavonoides conocidos. Están contenidos como monómeros, dímeros o grandes oligómeros en vacuolas de casi todos los tejidos vegetales (Croteau *et al.*, 2000).

La primera reacción que desencadena la biosíntesis de flavonoides es la condensación de tres moléculas de malonil CoA con *p*-cumaroil CoA (catalizada por la enzima chalcona sintetasa o CHS). La gran diversidad de flavonoides se debe a la existencia de diferentes tipos de enzimas que pueden participar en su biosíntesis, debido a que su acción se podría describir como de ramificación de la vía. La primera clase de flavonoides son las chalconas, a partir de las cuales se forman las auronas y las flavanonas, la síntesis de estas últimas es decisiva ya que son precursoras de los isoflavonoides, flavonas, flavonoles, antocianinas, catequinas y proantocianidinas o taninos condensados (figura 13). Las modificaciones que ocurren en la estructura base se dan en el anillo C, éstas pueden ser ciclaciones estereoespecíficas, formación de dobles ligaduras, hidroxilaciones, acilaciones, metilaciones, glucosilaciones, entre otras (Croteau *et al.*, 2000).



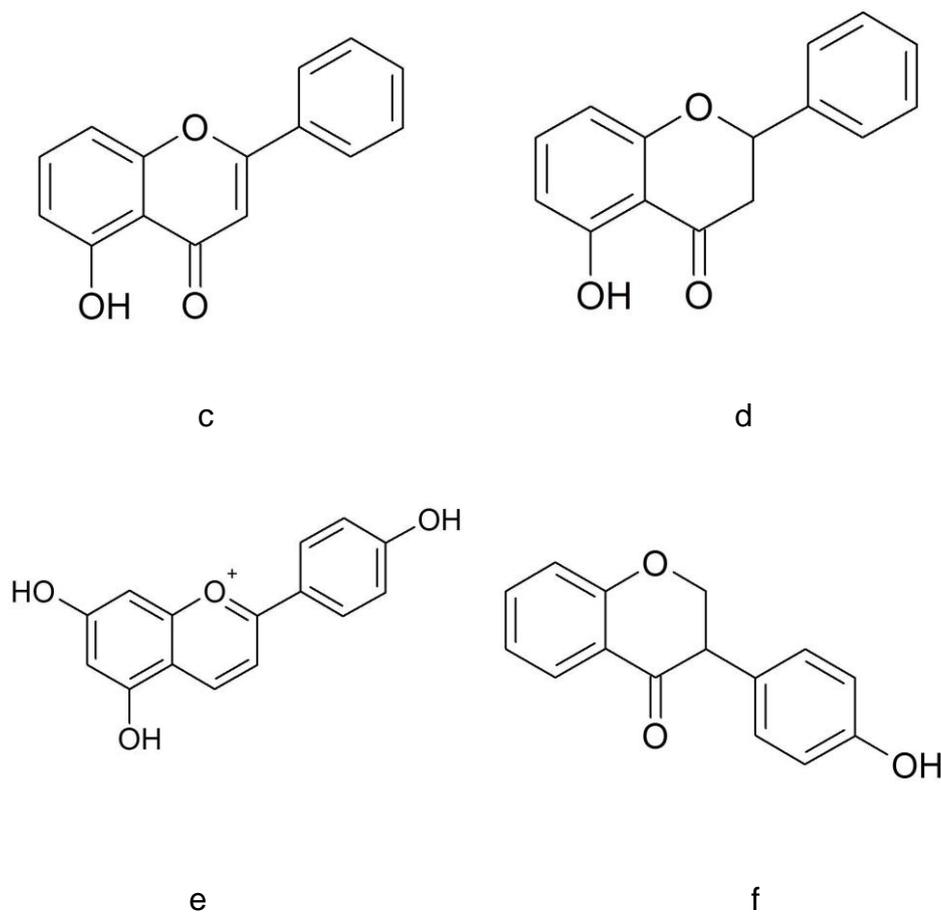


Figura 13. Estructura de los flavonoides. a) Chalconas. b) Flavonoles. c) Flavonas. d) Flavanonas. e) Antocianinas. F) isoflavonoides (Drago, 2007).

Los flavonoides participan en las interacciones ecológicas al conferir rasgos fenotípicos como el color de las flores, el sabor y aroma de los frutos, lo que las hace atractivas para la polinización y la dispersión de semillas. Los carotenoides, betalainas y antocianinas son los principales grupos de pigmentos contenidos en flores y frutos. Las antocianinas son características por su color rosa, magenta, morado y azul. Al igual que los demás metabolitos secundarios, los flavonoides (bajo sus propios mecanismos de acción) proveen a las plantas de resistencia y protección contra plagas, radiación UV y enfermedades causadas por microorganismos (Drago, 2007).

En las últimas décadas los flavonoides han ganado un interés creciente en la industria farmacéutica y alimenticia. Las investigaciones realizadas con éste grupo de metabolitos indican que presentan una inestimable cantidad de actividades en las que se incluyen anti-inflamatoria, anti-cancerígena,



antioxidante, antibacteriana, estrogénica por mencionar algunas. Aunado a lo anterior, el consumo de alimentos ricos en flavonoides se ha asociado a una disminución de la probabilidad padecer enfermedades neurodegenerativas y cardiacas (Raskin *et al.*, 2002).

ESTILBENOS

Adicionalmente al grupo de metabolitos secundarios de síntesis mixta están los estilbenos (menos estudiado en comparación con los flavonoides), éstos se producen en algunas especies de plantas por reacciones de condensación del ácido *p*-hidroxicinámico con tres moléculas de coenzima A, mediante la acción de una enzima llamada estilbenos sintetasa. Alrededor de 300 estilbenos se han caracterizado en briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas. Entre sus propiedades es interesante mencionar su potente efecto antifúngico por inhibición de la germinación de esporas y del crecimiento micelial, así como su intervención en los procesos de dormancia, inhibición del crecimiento en plantas, toxicidad en insectos entre las más relevantes (Croteau *et al.*, 2000).

APÉNDICE II

MÉTODOS CUALITATIVOS

ALCALOIDES

Los métodos de aislamiento, purificación e identificación de alcaloides se basan en la naturaleza básica de dichos compuestos. La presencia de alcaloides en un extracto se observa cuando éstos son precipitados en soluciones de ácidos de metales pesados, como el yoduro de bismuto en el reactivo de Dragendorff, en el cual se forman precipitados con una coloración anaranjada-marrón. Por otro parte, con el reactivo de Meyer se observa un halo blanquecino ante la presencia de alcaloides ya que éstos precipitan con el mercurio yoduro de potasio contenido en dicho reactivo (Domínguez, 1988).

COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La reacción de identificación de los compuestos fenólicos se considera positiva cuando en la reacción con cloruro férrico se presenta un precipitado con una coloración rojizo a púrpura o azulado. La precipitación de los compuestos fenólicos se debe a que forma complejos con el hierro de la solución de cloruro férrico, lo cual provoca la oxidación del grupo fenol y la consecuente reducción del metal (Alvarado, 2013).

GLUCÓSIDOS

Comúnmente los metabolitos secundarios se encuentran unidos con moléculas de naturaleza glucosídica, el enlace entre este tipo de moléculas se considera O-glucosídico y se da a través del carbono anomérico del azúcar. La identificación de glucósidos se lleva a cabo por medio de la reacción de Molish, ésta se considera universal para observar la presencia de cualquier carbohidrato. Ésta reacción consiste en la hidrólisis del enlace glucosídico y la deshidratación de la molécula de azúcar, catalizada por ácido sulfúrico, seguido por su condensación con el α -naftol (Alvarado, 2013).



12. REFERENCIAS

- Alvarado Z. G. 2013. *Actividad antibacteriana, antioxidante y toxicidad general de Cordia globosa (Jacq) Kunth*. Tesis de Licenciatura. Facultad de estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp 8-12.
- Anaya L. A. L. 2003. *Ecología Química*. Editorial Plaza y Valdés. México. 349 p.
- Briviba K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defense system. In: Frei B. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic Press Inc. Massachusetts, USA, pp 107-124.
- Bramley M. P. 1997. Isoprenoid Metabolism. In: Dey P. M., Harborne J.B. *Plant Biochemistry*. Academic Press. London, UK. pp 417-435.
- Bourgau F., Gravot A., Milesi S., Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
- Carranco J. M. A., Calvo C. M., Pérez-Gil R., F. 2011. Carotenoides y su función antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61 (3): 233-241.
- Chen Y. F., Lin F. M., Huang K. F. 2007. Antioxidant activity of *Jacaranda acutifolia* flower. *The Journal of Chinese Medicine*, 17 (4): 143-150.
- Choe E., Min D. B. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8: 345-358.
- CONABIO. 2006. *Capital Natural y Bienestar Social*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 71 p.
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist. Rockville, USA. pp 1250-1317.

- Cseke J. L., Kaufman B. P. 1999. How and why these compounds are synthesized by plants. In: Kaufman B. P., Cseke J. L., Warber S., Duke J. A., and Briemann H. L. Natural products from plants. CRC Press. Florida, USA, pp 37-90.
- Da Silveira S. M., Júnior A. C., Scheuermann G. N., Secchi F. L., Vieira C. R. W. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the south of Brazil against food spoilage and food borne pathogens. *Ciência Rural*, 42: 1300-1306.
- Domínguez X. A. 1988. Métodos de investigación Fotiquímica. 2ª ed. Editorial Limusa. México. 47 pp.
- Dorado O., Flores-Castorena A., De Jesus-Almonte J. M., Arias M. D., Martínez-Alvarado D. 2012. Árboles de Cuernavaca nativos y exóticos: Guía para su identificación. UAEM/Trópico Seco Ediciones. Cuernavaca, México. 361 p.
- Drago S. M. E. 2007. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38 (4): 42-47.
- Eloff J., N. 1998. Which extractants should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 1-8.
- Fonnegra G., R., Jiménez R., S., L. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2ª ed. Editorial Universidad de Antioquia. pp 131.
- Funayama S., Cordell G., A. 2015. Alkaloids: A treasury of poisons and medicine. Academic Press. London, UK. pp 193-206.
- Gachet M. S., Schühly W. 2009. *Jacaranda* – an ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 121: 14–27.
- Gardziella A., Pilato L. A., Knop. 2000. Phenolic Resins. 2da Edición. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 560 p.



- Gasmi J., Sanderson T. J. 2013. Jacaric acid and its octadecatrienoic acid geoisomers induce apoptosis selectively in cancerous human prostate cells: a mechanistic and 3-D structure–activity study. *Phytomedicine*, 20: 734-742.
- Halliwell B., Gutteridge M. C. J. 2007. *Free Radicals in biology and medicine*. 4^a ed. Oxford University Press Inc. New York, US. pp 1-29.
- Hernández D. C. T. 1999. Actividad antimicrobiana de la planta *Tagetes lucida* Cav. (Pericon). Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp 6-27.
- Isaza M., Hipólito J. 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technia*, 13 (33): 13-18.
- Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R., Sommers H. M. 1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. México. pp 386-393.
- Kram. W. B., Baingridge A. E., Perera N. M. A. D., Carter C. 2013. Identification, cloning and characterization of a GDSSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. *Plant Molecular Biology*, 68: 173-183.
- Lesur, L. 2011. Árboles de México. Editorial Trillas. México. 368p.
- Mahran G. H., El-Fishawy A. M., Hosny A. M. S., Hilal A. M. 1991. Phytochemical and antimicrobial study of *Jacaranda mimosifolia* D. Don grown in Egypt. *Herba Hungarica*, 30: 98-104.
- Moharram F. A., Marzouk M. S. A. 2007. A novel phenylethanoid dimer and flavonoids from *Jacaranda mimosifolia*. *Physical Sciences*, 62b: 1213-1220.
- Monroy-Ortíz C. y Castillo-España P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la

- Biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. 405 p.
- Mostafa M. N., Eldahshan A. O., Singab B. A. N. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of flower essential oil *Jacaranda acutifolia* Juss. against food-borne pathogens. *European Journal of Medicinal Plants*, 6 (2): 62-69.
- Murphy C. M. 1999. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564-582.
- Nagarajan A., Brindha P. 2012. Diterpenes-A Review on Therapeutic uses with special emphasis on Antidiabetic Activity. *Journal of Pharmacy Research*, 5 (8): 4530-4540.
- Nascimento G. F. G., Locatelli J., Freitas C. P. and Silva L. G. 2000. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 247-256.
- Nicasio P., Meckes M. 2005. Hypotensive effect of the hydroalcoholic extract from *Jacaranda mimosifolia* leaves in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 301–304.
- Osuna, L., Lozoya, X., 1989. Plantas medicinales usadas por la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales infecciosos. *Revista Médica del IMSS*, 27 (4): 305-311.
- Rana A., Bhangalia S., and Pratap S. H. 2012. A new phenylethanoid glucoside from *Jacaranda mimosifolia*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 27 (13): 1167-1173.
- Raskin I., Ribnicky D.M., Komamytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J.M., Comwell T., Pastor I., Fridlender B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, 20 (12): 522-531.
- Rojas J. J., Ochoa V. J., Ocampo S. A., Muñoz J. F. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric



- medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, 6: 1–6.
- Serrano P. R. 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burceraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp 21-30.
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Sepulveda-Jiménez G., Porta-Ducoing H. y Rocha-Sosa M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 3 (21): 355-363.
- Soberón M. J. y Llorente B. J. 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*.
- Solomon J., Joselin J., Shynin B. S. S., Rajam F. A. 2013. Phytochemical evaluation of Bignoniaceae flowers. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5 (4): 106-111.
- Strack D. 1997. Phenolic Metabolism. In: Dey P. M., Harborne J.B. *Plant Biochemistry*. Academic Press. London, UK. pp 387-416.
- Takahisa D., Graham W., Ingold B., Ingold U. K. 1985. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effort of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 835: 298-303.
- Terán B. C. 2006. Actividad antibacteriana y antifúngica de *Cordia curassavica* (Jaccq) Roemer y Schultes (barredor). Tesis de Licenciatura de Biología.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, 60 pp.

- Wink M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: M. Wink M. Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. pp 1-17.
- Yan X., Murphy B. T., Hammond G. B., Vinson J. A., Neto C. C. 2002. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (21): 5844-9.
- Zaghloul A. M., Gahar A. A., Ahmad M. M., Baraka H. N., El-Bassuony A. A. 2011. Phenylpropanoids from the steam bark of *Jacaranda mimosifolia*. Natural Products Research, 25 (1): 68-76.