

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

División de Estudios de Posgrado

**Estudio fitoquímico del extracto etanólico de
las hojas de *Indigofera suffruticosa***

T E S I S

**Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Químicas**

PRESENTA

Brenda Beltrán Mendoza

Director: Dr. Omar Viñas Bravo

Co-directora: Dra. Alma Xochil Avila Alejandre

San Juan Bautista Tuxtepec, 2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2018/MCQ/033
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 17 de octubre de 2018

C. BRENDA BELTRÁN MENDOZA

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

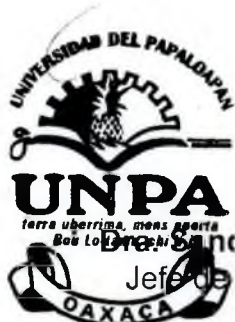
Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Roxana Martínez Pascual	UNPA	Presidente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedras CONACyT- UNPA	Vocal
Dr. Adolfo López Torres	UNPA	Secretario
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	1er Suplente
Dr. Lemuel Pérez Picaso	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



DIVISION DE
ESTUDIOS DE
POSGRADO

[Firma]
Dr. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

C.c.p. Dr. Omar Viñas Bravo, Dra. Alma Xóchit Ávila Alejandré – Director y Co-Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

[Firma]
M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



VICE-RECTORIA
ACADEMICA



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/112
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 17 de octubre de 2018

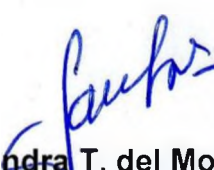
L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias Químicas de **C. Brenda Beltrán Mendoza**, matrícula **16130001**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Indigofera suffruticosa***" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú


Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Brenda Beltrán Mendoza
C.c.p. Archivo

A mis padres y hermanos...

RECONOCIMIENTO

A la Universidad del Papaloapan, por las facilidades brindadas por el personal y en el uso de los equipos del LINAN-Tuxtepec, para el desarrollo de este proyecto.

Se agradece a CONACYT por la beca **615681** otorgada, además de la beca de apoyos complementarios para mujeres indígenas en su modalidad de apoyo **1** y apoyo **2**.

También por el financiamiento del proyecto INFRA-2015-01-252013 y LN-2016-271911.

Al Ing. Pedro Guerra del CBTa No. 251, por proporcionar la planta y compartir su experiencia con el añil.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional en cada una de las etapas que han forjado mi crecimiento personal y profesional.

A los doctores: Conde, Abelardo y Lemuel, ya que fueron pieza fundamental para continuar este ciclo como estudiante, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto, pero, sobre todo, por su disposición para hacer más grata mi estancia en esta universidad.

A los revisores de tesis, los doctores: Abelardo, Lemuel, Daniel, Roxana, Adolfo, Ariana y Miguel, que, con cada una de sus observaciones, ayudaron a hacer de esta, una mejor tesis.

A la Dra. Xochil por su paciencia, disponibilidad y consejos que permitieron complementar mis aptitudes y habilidades en el trabajo de laboratorio. Al M.C. Alejandro, por su apoyo y asesoría.

A mis “compañeritos” de generación: Yun, Mich, Tere, Yure, Karen, Cris, Key, Alán, Edgar, Félix, por los momentos compartidos, por su apoyo incondicional cuando así lo necesité, y por su grata amistad.

A mis entrañables amigos: Luchis, Karis, Sami, Are, Lalo, Zai, Lidi, Elías y Zarco, por cada uno de los momentos compartidos y por estar siempre conmigo.

Y, por último, pero no menos importante, gracias Dr. Omar, por confiar desde el principio (yo creo) en que podía llegar a la meta, por no dejar que desesperara en los “peores momentos”, por su constante interés hacia nuestro trabajo, por su calidad como ser humano y, sobre todo, por ayudarme a “practicar mi paciencia”. Cada uno de mis logros durante este tiempo fueron guiados por usted, así que, otra vez, Gracias...

Con sinceridad Brenda.

ÍNDICE.

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Plantas medicinales.....	3
2.2 Metabolitos primarios.....	5
2.3 Metabolitos secundarios.....	6
2.4 Actividad antioxidante.....	7
2.5 Actividad antimicrobiana.....	10
2.6 Descripción del género <i>Indigofera</i>	12
2.6.1. Etnobotánica y antropología.....	13
3. ANTECEDENTES	15
4. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	21
4.1 Extracción asistida por ultrasonido	21
4.2 Cromatografía.....	22
4.2.1 Cromatografía en capa fina	23
4.2.2 Cromatografía en columna.....	24
4.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.....	26
4.4 Espectrometría de masas	32
4.5 Espectrofotometría de UV-Vis.	34
4.6 Espectrofotometría de infrarrojo.	36
5. JUSTIFICACIÓN	40
6. HIPÓTESIS	41
7. OBJETIVOS	42
7.1 Objetivo general.....	42
7.2 Objetivos específicos.....	42

8. PARTE EXPERIMENTAL.....	43
8.1 Materiales y equipos utilizados.	43
8.2 Metodología.	44
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
9.1 Recolección de la planta.....	45
9.2 Secado y molienda.	46
9.3 Extracción etanólica asistida por ultrasonido.	46
9.4 Extracción líquido-líquido.....	47
9.5 Pruebas de actividad antioxidante y antimicrobiana.	48
9.5.1 Actividad antioxidante del EEAU y de las fracciones de <i>I. suffruticosa</i>	48
Ensayo del radical DPPH.	48
Ensayo del radical catiónico ABTS.....	51
9.5.2 Actividad antimicrobiana del extracto crudo de <i>I. suffruticosa</i>	54
9.6 Cromatografía en capa fina.	57
9.7 Cromatografía en columna	59
9.7.1 β -caroteno.	60
9.7.2 β -sitosterol y fitol.	62
9.7.3 Índigo e indirubina.	64
9.7.4 Triptantrina.	67
9.7.5. Glucósido del ácido antranílico.....	74
9.7.6 Indican (indolil- β -D-glucopiranosido).....	80
10. CONCLUSIONES.....	86
11. REFERENCIAS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la morfina aislada de <i>Papaver somniferum</i> .	3
Figura 2. Galegina, guanidina de origen natural y la metformina, biguanida sintética inspirada en la galegina.	5
Figura 3. a) Espectro de UV-Vis del DPPH• (morado), espectro de UV-Vis del DPPH reducido (café). b) Mecanismo propuesto para la desactivación del DPPH• con ácido ascórbico.	9
Figura 4. En la parte superior se muestra la reacción general del ABTS• ⁺ con ácido ascórbico, en la parte inferior se observan los espectros de UV-Vis del ABTS• ⁺ (rojo), y del ABTS ⁺ reducido (verde).	10
Figura 5. Compuestos fenólicos comunes en plantas y que presentan propiedades antimicrobianas.	11
Figura 6. Alcaloides aislados de la familia Ranunculaceae con propiedades antimicrobianas.	12
Figura 7. Partes la planta <i>I. suffruticosa</i> , 1. Rama floreciente; 2-5. Hojas; 6. Cáliz; 7. Androceo; 8. Estambre; 9. Pistilo.	13
Figura 8. Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de las hojas de <i>I. suffruticosa</i> .	16
Figura 9. Estructura del compuesto aislado de las raíces y tallos de <i>I. suffruticosa</i> mediante extracciones sucesivas.	17
Figura 10. Estructuras de los compuestos presentes en la planta entera de <i>I. suffruticosa</i> , del extracto de éter de petróleo se aislaron los compuestos 7 y 8 y del extracto etanólico el compuesto 9 .	17
Figura 11. Estructuras de los compuestos aislados de flores y frutos de <i>I. espicata</i> , con CHCl ₃ y MeOH.	18
Figura 12. Estructuras de los compuestos presentes en las partes aéreas de <i>I. hirsuta</i> , del extracto acuoso se aislaron los compuestos 20 y 21 , y del extracto metanólico los compuestos 22-25 .	19
Figura 13. Compuestos aislados en diferentes especies del género <i>Indigofera</i> .	20
Figura 14. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido, un líquido que es sometido a ultrasonido genera pequeñas burbujas que se comprimen y se expanden hasta la implosión	22

Figura 15. Cromatografía en capa fina, a) preparación de la placa y b) distancia recorrida por el frente del disolvente y distancia recorrida por los compuestos.	23
Figura 16. Proceso de separación en cromatografía en columna, donde A y B son compuestos de diferente polaridad interaccionando con la fase estacionaria y con la fase móvil.	25
Figura 17. a) Núcleos con espín de $\frac{1}{2}$ bajo la influencia de un B_0 , a mayor intensidad de B_0 mayor es la diferencia de energías de los estados α y β , b) proceso de excitación-relajación de un núcleo.	27
Figura 18. Anisotropía magnética en anillos aromáticos, las líneas de fuerza del campo magnético inducidas por los electrones π deslocalizados circulan en sentido opuesto al campo magnético externo, incrementando y reduciendo la protección en los núcleos vecinos del anillo aromático.	29
Figura 19. Desplazamientos químicos de protones con diferente ambiente químico.	30
Figura 20. Acoplamiento indirecto espín-espín. La constante de acoplamiento es la diferencia en Hz entre los picos que componen la señal.	31
Figura 21. Dependencia de la constante de acoplamiento y el ángulo diedro, relación de Karplus.	31
Figura 22. Constantes de acoplamiento de sistemas comunes de protones.....	31
Figura 23. Ionización por electronebulización, el analito disuelto es introducido a un capilar cargado, debido a la repulsión de cargas eléctricas el líquido se sale del capilar y forma pequeñas gotas altamente cargadas (aerosol), conforme el disolvente se evapora la interacción de las moléculas cargadas provoca que las gotas estallen y finalmente los iones se mueven hacia el analizador de masa.....	33
Figura 24. Sistema cuadrupolo, con la variación de las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores m/z transmitidas haciendo posible el barrido espectral, además es posible la eliminación selectiva de iones.	33
Figura 25. Representación de la ley de Lambert-Beer, relaciona la intensidad de luz entrante (I_0), en un medio con intensidad saliente (I_1) después de que en dicho medio se produce la absorción. Hay una relación directa de la absorción de la luz con la concentración (C), el coeficiente de absorción (ϵ) y la longitud de la celda (l)	35

Figura 26. Transiciones electrónicas, los sistemas conjugados absorben a mayores longitudes de onda que los no conjugados. A medida que la conjugación aumenta decrece la diferencia energética entre el HOMO y LUMO y la radiación necesaria para producir la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ aumenta su longitud de onda.....	36
Figura 27. Vibraciones fundamentales simétrica y asimétricas entre átomos que conforman una molécula, provocada por la absorción de energía infrarroja.	37
Figura 28. Las vibraciones entre átomos provocan cambios en el momento dipolar, la intensidad de una banda depende de la diferencia del momento dipolar.....	37
Figura 29. Posición de bandas de absorción para algunos grupos funcionales en la región del IR medio.	38
Figura 30. Esquema de una celda de ATR, el haz IR pasa a través del cristal ATR donde la onda evanescente penetra y es absorbida por la muestra, la intensidad se ve atenuada en las regiones del espectro donde la muestra absorbe.	39
Figura 31. Diagrama de trabajo empleado en la elaboración del proyecto.....	44
Figura 32. Presentación de los sobres con hojas de añil que se comercializa en la comunidad General Felipe Ángeles, presentación de 15 g.	45
Figura 33. Hojas de <i>I. suffruticosa</i> después de la molienda para mejorar el proceso de extracción, se obtuvo un total de 395 g.....	46
Figura 34. Diagrama del proceso de extracción líquido-líquido, se muestra el rendimiento en porcentaje para para cada una de las fracciones orgánicas y de la fracción acuosa.	48
Figura 35. CCF de las fracciones obtenidas de la bipartición líquido-líquido del extracto crudo, en sistemas de hexano/AcOEt para las fracciones de hexano y CHCl_3 ; sistemas de CH_2Cl_2 /MeOH para las fracciones de AcOEt, <i>n</i> -BuOH y acuoso. Se utilizaron como reveladores lámpara de UV de 365 y 254 nm, KMnO_4 , vainillina y H_2SO_4	58
Figura 36. Identificación del compuesto aislado de la fracción de hexano en donde a) se observa la CCF del compuesto aislado contra β -caroteno (35) comercial y b) estructura del compuesto identificado como β -caroteno (35).....	60
Figura 37. Comparación del a) espectro de UV-Vis del β -caroteno (35) aislado; en solución con hexano y del b) espectro de UV-Vis para el β -caroteno (35) descrito en la literatura; en hexano.....	61

Figura 38. Espectro de ^1H del a) β -caroteno (35) aislado; RMN de 400 MHz en CDCl_3 , b) expansión de los protones vinílicos del β -caroteno (35) descrito en la literatura; en CDCl_3	61
Figura 39. CCF de las fracciones 1-6 usando como referencia: F fitol y β-s β -sitosterol, las placas se revelaron a a) luz visible, b) en lámpara de UV de 254 nm, c) UV 365 nm y d) H_2SO_4 al 50% y calcinación.	63
Figura 40. Estructura de β -sitosterol (7) identificado en la fracción de hexano.	63
Figura 41. Estructura de fitol (36) identificado en la fracción de hexano.	64
Figura 42. Identificación de los compuestos aislados de la fracción de hexano y CHCl_3 , a) CCF del análisis realizado sobre la producción del índigo en donde: 1 es la mezcla obtenida de <i>B. cusia</i> Brem, 2 la mezcla obtenida de <i>I. tinctoria</i> Linn y 3 representa al estándar de índigo, b) CCF de los compuestos aislados, c) estructura del compuesto identificado como índigo (1) y d) estructura de indirubina (37).....	65
Figura 43. Comparación de los espectros de UV-Vis del compuesto aislado de la fracción de hexano, a) espectro del índigo (1) aislado; en CHCl_3 y b) espectro del índigo (1) descrito en la literatura; en CHCl_3	65
Figura 44. Comparación de los espectros de UV-Vis del compuesto aislado de la fracción de hexano, se observa en el a) espectro de indirubina (37) aislado; en CHCl_3 , b) espectro de indirubina (37) descrito en la literatura; en CHCl_3	66
Figura 45. CCF de las fracciones obtenidas de la separación por CC de la fracción de AcOEt , se observan a a) luz visible, b) en lámpara de UV a 234 nm y c) UV de 354 nm, d) después de retirar el disolvente.	67
Figura 46. Multiplicidad y constante de acoplamiento de los protones H-1 y H-3 de triptantrina (38).	68
Figura 47. Estructura de triptantrina (38) y correlación de los protones en $g\text{COSY}$	68
Figura 48. Espectro $g\text{COSY}$ de triptantrina (38); se resalta la correlación de un sistema aromático disustituido en <i>orto</i> correspondiente a la estructura 38 . RMN de 400 MHz; CDCl_3	69
Figura 49. Espectro TOCSY de triptantrina (38); se observa de color rojo y azul los dos sistemas aromáticos correspondientes a la estructura 38 . RMN de 400 MHz; CDCl_3	69

Figura 50. Estructura de triptantrina (38) y correlación de sus protones con los carbonos en <i>g</i> HMBC.	70
Figura 51. Espectro <i>g</i> HSQC de triptantrina (38); se observa con líneas punteadas la correlación directa de los protones con los carbonos a los que están unidos. RMN de 400 MHz; CDCl ₃	70
Figura 52. Espectro <i>g</i> HMBC de triptantrina (38); Se observan con líneas punteadas las correlaciones a tres enlaces entre los protones y los carbonos. RMN de 400 MHz; CDCl ₃	71
Figura 53. Espectro de MS/MS-ESI en modo positivo de triptantrina (38).	72
Figura 54. Espectro de UV-Vis de triptantrina (38); en CHCl ₃	73
Figura 55. Espectro de IR de triptantrina (38).	73
Figura 56. CCF de las fracciones obtenidas de la CC de la fracción de <i>n</i> -BuOH, revelado con a) lámpara de UV de 365 nm, b) UV de 254 nm y c) revelado con vainillina.	74
Figura 57. Espectro de ¹ H del glucósido del ácido antranílico (39). RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	75
Figura 58. Estructura del glucósido del ácido antranílico (39) aislado de la fracción de <i>n</i> -BuOH y correlación de los protones aromáticos en <i>g</i> COSY.	75
Figura 59. Experimento <i>g</i> COSY del glucósido del ácido antranílico (39), se observa la correlación de los protones del sistema aromático correspondiente a la estructura 39 . RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	75
Figura 60. Estructura del glucósido del ácido antranílico (39) y su correlación en <i>g</i> HMBC.	76
Figura 61. Espectro <i>g</i> HSQC de glucósido del ácido antranílico (39), se observa con líneas punteadas la correlación directa de los protones con los carbonos a los que están unidos. RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	76
Figura 62. Espectro <i>g</i> HMBC del glucósido del ácido antranílico (39); se observan con líneas punteadas las correlaciones a tres enlaces entre los protones y los carbonos. RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	77
Figura 63. Espectro de MS-ESI en modo positivo del glucósido del ácido antranílico (39).	78

Figura 64. a) Espectro de UV-Vis del GAA (39), en MeOH, c) Espectro de UV-Vis del ácido antranílico descrito.....	79
Figura 65. Espectro de IR del glucósido del ácido antranílico (39).....	79
Figura 66. CCF del indican (3) aislado de la fracción de <i>n</i> -BuOH, se reveló con a) lámpara de UV a 365 nm, b) UV de 254 nm y c) con vainillina.	80
Figura 67. Espectro de ¹ H del indican (3), se observan en la expansión los protones aromáticos y el protón anomérico 1' correspondientes a la estructura 3 . RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	81
Figura 68. Estructura del indican (3) y la correlación de los protones aromáticos en <i>g</i> COSY, además de la correlación de N-H con H-2.	81
Figura 69. Espectro <i>g</i> COSY del indican (3) se observa de color rojo la correlación de los protones aromáticos y de azul el protón de N-H con H-2. RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	81
Figura 70. Espectro TOCSY del indican (3), se observa de color rojo la correlación de los protones aromáticos. RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	82
Figura 71. Estructura del indican (3) y correlación en <i>g</i> HMBC.	82
Figura 72. Espectro <i>g</i> HSQC del indican (3); se observa con líneas punteadas la correlación directa de los protones con los carbonos a los que están unidos. RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	83
Figura 73. Espectro <i>g</i> HMBC del indican (3); se observan con líneas punteadas las correlaciones a tres enlaces entre los protones y los carbonos. RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	83
Figura 74. Espectro de MS/MS-ESI en modo negativo del indican (3).....	85
Figura 75. Espectro de UV-Vis del indican (3); en MeOH.	85
Figura 76. Espectro de IR del indican (3)	85

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Clasificación de los grupos de fármacos aprobados por la OMS en el periodo 1981-2014, el 70% de ellos tienen relación con productos naturales.....	4
Gráfica 2. Inhibición del DPPH• por 0.2 mg/mL del extracto crudo y por las fracciones de hexano, CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH y acuosa, utilizando 0.1 mg/mL de ácido ascórbico como referencia.....	49
Gráfica 3. Porcentaje de inhibición del ABTS• ⁺ por 25 µg/mL del extracto crudo y cada una de las fracciones. Las medias ± desviación estándar que no comparten una letra son significativamente diferentes; ^A p ≤ 0.05 B,C,D,E,F; <i>n</i> =6.....	52
Gráfica 4. Inhibición del ABTS• ⁺ por el ácido ascórbico a diferentes concentraciones.	52
Gráfica 5. Actividad antimicrobiana del extracto crudo sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> , a una concentración de 190 µg/mL la inhibición es nula comparado con el control, se observa inhibición en el crecimiento de la bacteria a partir de 370 µg/mL del extracto crudo en la hora 10, a una mayor concentración la inhibición de <i>E. coli</i> es más evidente.	55
Gráfica 6. Concentración mínima inhibitoria del extracto crudo (370 µg/mL) en el crecimiento de <i>E. coli</i> , con base al análisis estadístico se obtuvo diferencia significativa respecto al control en la hora 11.	55
Gráfica 7. Concentración mínima inhibitoria de ampicilina (0.5 µg/mL) en el crecimiento de <i>E. coli</i> , con base al análisis estadístico se encontró diferencia significativa respecto al control en la hora 11.	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dimensiones de columna y volumen de disolvente para cromatografía flash.	25
Tabla 2. Núcleos de importancia en espectroscopia de RMN.....	26
Tabla 3. Espectroscopia de RMN de disolventes deuterados.....	28
Tabla 4. Disolventes utilizados para la extracción líquido-líquido.	47
Tabla 5. Valores de IC ₅₀ obtenidos del extracto crudo y de las fracciones de la extracción líquido-líquido.....	50
Tabla 6. VEAC obtenidos de la inhibición del ABTS ^{•+}	53
Tabla 7. Compuestos aislados de las fracciones del extracto etanólico por CC.	59
Tabla 8. Desplazamientos de ¹ H y ¹³ C para triptantrina (38); RMN de 400 MHz; CDCl ₃	71
Tabla 9. Desplazamientos de ¹ H y ¹³ C del GAA (39); RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆ . 77	
Tabla 10. Desplazamientos de ¹ H y ¹³ C del indican (3); RMN de 400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆	84

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiasolin-6-ácido sulfónico)
ABTS ^{•+}	Radical catión 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiasolin-6-ácido sulfónico)
ATR	Attenuated total reflectance
B_0	Campo magnético
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Correlation spectroscopy
d	Doble
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
e^-	Electrón
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EEAU	Extracción etanólica asistida por ultrasonido
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ESI	Ionización por electronebulización
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GAA	Glucósido del ácido antranílico
GC	Cromatografía de gases
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence.
HOMO	Highest occupied molecular orbital
HSQC	Heteronuclear simple quantum coherence
I	Espín nuclear
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%
IR	Infrarrojo

IUPAC	International union of pure and applied chemistry
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LC	Cromatografía líquida
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
m	Multiplete
M ⁺ •	Ion molecular
MIC	Minimum inhibitory concentration
MS	Espectrometría de masas
ND	No determinado
OM	Orbital molecular
OMS	Organización mundial de la salud
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Phosphate buffered saline
ppm	Partes por millón
R _f	Ratio to the front
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
S _a	Simple ancha
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TOF	Tiempo de vuelo
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda
δ	Desplazamiento químico

RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo el estudio fitoquímico de una planta conocida como añil (*Indigofera suffruticosa*), y que se usa en la medicina tradicional de México para el tratamiento de heridas, malestares estomacales, para el tratamiento de la epilepsia y la enfermedad de Parkinson, entre otros.

Se evaluó la actividad antioxidante de las fracciones del extracto etanólico y se encontró que la fracción de *n*-BuOH es la de mayor actividad con una IC₅₀ de 97.95 µg/mL determinado con el ensayo del radical DPPH, y con VEAC de 240 µg/g de extracto seco obtenido mediante el ensayo del radical catiónico ABTS. Por otra parte, se determinó que la concentración mínima inhibitoria en el crecimiento de la bacteria *E. coli*, del extracto crudo, es de 370 µg/mL después de 11 horas.

De las fracciones obtenidas del extracto etanólico se aislaron y caracterizaron ocho compuestos, β-caroteno, β-sitosterol, fitol, índigo, indirubina, triptantrina, indican y glucósido del ácido antranílico, algunas de las actividades biológicas descritas en la literatura para estos compuestos coinciden con las propiedades que se le atribuyen a esta planta.

Cabe resaltar que dos de los compuestos aislados se reportan por primera vez en el género *Indigofera*, los cuales son, el alcaloide indolquinazolínico triptantrina y el glucósido del ácido antranílico.

ABSTRACT

In this work, we report the phytochemical study of a plant known as añil (*Indigofera suffruticosa*), which is used in Mexican traditional medicine in injury treatment, stomachache, epilepsy treatment and Parkinson's disease, among others.

The antioxidant activity of ethanolic extract of the leaves of *I. suffruticosa* was evaluated, specifically a *n*-BuOH fraction exhibited the highest activity (IC₅₀ of 97.95 µg/mL) using the DPPH• assay, and with the VEAC of 240 µg/g of dry extract gotten by the ABTS•⁺ assay. Furthermore, the Minimal Inhibitory Concentration for *E. coli* of the ethanolic extract was determined to be 370 µg/mL at the 11 h.

Eight compounds were isolated and characterized from different fractions of the ethanolic extract, whose reported biological activities coincide with some of the properties attributed to this plant.

In our study, two new compounds were found for this *Indigofera* genera, the indolequinazoline alkaloid tryptanthrin and the anthranilic acid glucoside.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son indispensables para la vida de los organismos debido a que producen el oxígeno que respiran, mantienen el suelo, regulan la humedad y contribuyen a la estabilidad del clima. Para la especie humana representan la principal fuente de alimentos y más del 40% de los fármacos que se comercializan derivan de ellas. Existen alrededor de 270 000 especies vegetales distribuidas en todos los ecosistemas, en este contexto, México se encuentra entre los países con mayor diversidad biológica en el mundo, las especies conocidas en el país se ha estimado en más de 60 000, de las cuales se han descrito más de 23 000 especies de plantas vasculares.¹

México tiene una gran herencia de las culturas prehispánicas en el uso de plantas medicinales y la prueba de esto es el manuscrito azteca "Códice de la Cruz-Badiano" escrito en 1552 que contiene 251 descripciones de plantas y sus usos medicinales. Actualmente un alto porcentaje de la población sigue dependiendo de la medicina tradicional,² sin embargo, de toda la diversidad vegetal que posee el país, se han realizado estudios químicos y farmacológicos a un número limitado de especies (1.5%).³

Oaxaca es el estado de mayor diversidad biológica y cultural del país, registra una compleja heterogeneidad ambiental, de allí su biodiversidad; se conocen más de 8 000 especies de plantas vasculares de las cuales 700 especies son endémicas.⁴ A lo largo de más de 10 000 años de coexistencia los habitantes locales han desarrollado múltiples estrategias de manejo de los recursos naturales para satisfacer sus necesidades básicas de alimentación y salud.

Los 17 grupos étnicos de Oaxaca han desarrollado una tradición local de remedios medicinales basados en la amplia biodiversidad que les rodea. Cada cultura presenta sus propios criterios de selección apoyados en un proceso empírico lento de prueba y error, que les ha permitido identificar un número definido de plantas medicinales para su uso. Este conocimiento ha sido transferido a través de generaciones mediante la tradición oral.⁵

De acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS), la medicina tradicional es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud, prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales.⁶ Actualmente la medicina tradicional representa para millones de personas la principal fuente de atención sanitaria y a veces la única. La medicina tradicional a base de hierbas está próxima a los hogares y es asequible, además, es culturalmente aceptada y en ella confían muchas personas, cabe destacar que las plantas empleadas son la base para el desarrollo de nuevos fármacos.⁷

En diferentes regiones del sur de México (Veracruz, Oaxaca, Tabasco) se utiliza una hierba que se considera maleza en algunos cultivos, se le conoce como platanillo, jiquilite o añil y su nombre científico es *Indigofera suffruticosa*. Es una hierba de 1.5 m de altura, con tallos cuadrados, sus frutos son pulposos y miden de 1 a 1.5 cm, las semillas son cilíndricas, florece y fructifica durante todo el año.⁸ Algunos de los usos que se le da a esta planta son: auxiliar en el tratamiento de verrugas, como desparasitante, como remedio para el empacho y para tratar la disentería. Además, las hojas y el tallo alivian las quemaduras cuando se colocan directamente sobre la piel. Varios estudios farmacológicos *in vivo* han demostrado acción androgénica y antibiótica del tallo, mostrando un efecto depresor del sistema nervioso central e hipotensor. Además, un estudio en individuos epilépticos que tomaron añil durante seis meses, demostró beneficios similares a los obtenidos mediante la administración de bromuros.⁹

En el presente trabajo se realizó el estudio fitoquímico del extracto de las hojas de *Indigofera suffruticosa*. El aislamiento y caracterización de los metabolitos se realizó por medio de técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas. La actividad antioxidante se realizó por los ensayos de radicales libres (DPPH• y ABTS•+) y paralelamente se midió la concentración mínima inhibitoria del extracto crudo en el crecimiento de *E. coli*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Plantas medicinales.

Son plantas medicinales todas aquellas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos que se pueden emplear en el tratamiento de enfermedades, ya sea de manera directa o preparada en infusiones y ungüentos. Se conocen aproximadamente 270 000 especies de plantas en la actualidad y se estima que cerca del 10% se usan en la medicina tradicional, es decir, se encuentran descritos en los tratados médicos de fitoterapia por presentar algún uso. El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano.¹⁰

Si bien es cierto que se conocen desde épocas antiguas los beneficios medicinales de las plantas, hasta hace relativamente poco tiempo, se desconocían el o los compuestos que les otorgaban dichas propiedades (benéficas o tóxicas), lo que limitaba su uso. No fue sino hasta 1805 cuando el químico alemán Friedrich Wilhelm Sertürner aisló la morfina (Figura 1) en forma pura a partir de la goma de opio (*Papaver somniferum*).¹¹ Este descubrimiento marcó el precedente en la separación de las sustancias puras y sobre todo para que muchos investigadores iniciaran un arduo trabajo en el aislamiento de los compuestos que le conferían la actividad medicinal a las plantas, con ello, se empezó a estudiar la relación entre la estructura y la actividad biológica.

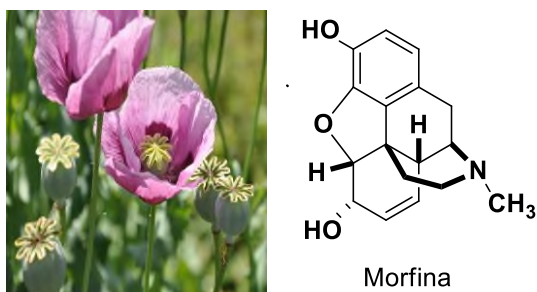
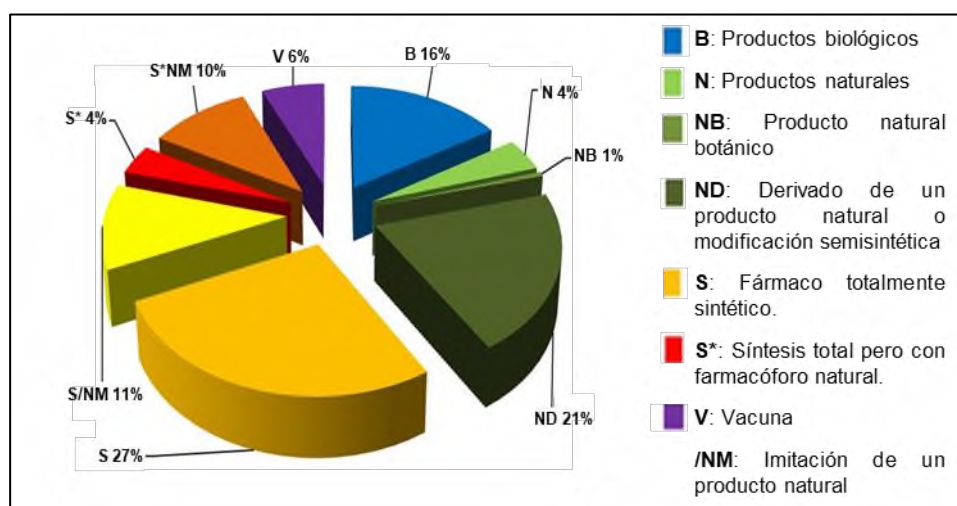


Figura 1. Estructura de la morfina aislada de *Papaver somniferum*. (Tomado de Medicinal natural products)¹²

Las plantas son de gran importancia en la medicina moderna debido a que son una fuente directa de nuevos compuestos utilizados como agentes terapéuticos, con beneficios adicionales tales como su baja toxicidad y mayor potencial para tratar enfermedades resistentes a fármacos.¹³

Entre 1981 y 2014, los productos de origen natural y sus derivados representaron cerca del 70% de los nuevos fármacos en el mercado. En la gráfica 1 se desglosan los grupos de compuestos activos aceptados y aprobados por la OMS, donde se observa que una gran proporción de los fármacos comerciales provienen o se han inspirados en productos obtenidos de forma natural.^{14,15}



Gráfica 1. Clasificación de los grupos de fármacos aprobados por la OMS en el periodo 1981-2014, el 70% de ellos tienen relación con productos naturales. (Tomado de David J. N. y Gordon M. C. 2016)

Por otra parte, la OMS estima que más de la mitad de la población recurre al uso de la medicina tradicional.¹⁶ El uso de remedios de fuentes naturales es una práctica común, entre el 70% y 80% de la población ha recurrido al menos una vez al uso de la medicina alternativa o complementaria.¹⁷

De las más de 270 000 plantas superiores existentes en este planeta solo a una pequeña porción se le han realizado estudios fitoquímicos, sin embargo, aún con la poca cantidad de especies analizadas se han obtenido buenos resultados. Por ejemplo, se han estudiado cerca de 400 plantas para el tratamiento de la diabetes tipo 2, derivado de estos trabajos se aisló la galegina (Figura 2), una sustancia producida por la hierba *Galega officinalis*, que en evaluaciones experimentales y clínicas

proporcionaron la base farmacológica y química para la síntesis de la metformina (Figura 2), que es la terapia de base para la diabetes tipo 2. Otros ejemplos de compuestos aislados de plantas y que se están utilizando para el tratamiento del cáncer incluyen taxol (*Taxus brevifolia*), vinblastina y vincristina (*Catharanthus Roseus*), los derivados de camptotecina, topotecán e irinotecán (*Camptotheca acuminata*), etopósido (*Podophyllum notatum*), derivados de epipodofilotoxina (raíz de mandrágora *Podophyllum peltatum*).¹⁸

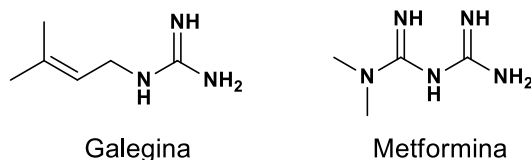


Figura 2. Galegina, guanidina de origen natural y la metformina, biguanida sintética inspirada en la galegina. (Tomado Medicinal plants and their importance)¹⁸

Por lo descrito anteriormente, se puede pronosticar que las plantas seguirán proporcionando nuevos metabolitos bioactivos, que, a su vez, llevarán al desarrollo de nuevos fármacos, por lo tanto, el estudio fitoquímico de las plantas medicinales sigue siendo de gran importancia para la búsqueda de compuestos de interés farmacéutico.

2.2 Metabolitos primarios.

Los metabolitos primarios son todos aquellos esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, desarrollo y reproducción. Comprenden a los glúcidos o hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

Los glúcidos representan compuestos útiles como reserva energética (glucosa, sacarosa y almidón en plantas, glucógeno en animales), como material estructural y cementante (celulosa, pectinas, hemicelulosa en vegetales). Muchos de ellos son altamente solubles en agua y otros totalmente insolubles en cualquier disolvente, como es el caso de la celulosa.

Los lípidos son típicos compuestos de reserva energética y de carbono, componentes estructurales fundamentales de las membranas biológicas, solubles en disolventes no polares.

Las proteínas son quizás los compuestos más versátiles, esenciales por sus actividades catalíticas, estructurales, hormonales y una gran diversidad de otras funciones.

Los ácidos nucleicos en cambio, cumplen la función primordial de ser las moléculas encargadas de contener la información genética y permitirles a los seres vivos transmitir sus características a su descendencia.¹⁹

2.3 Metabolitos secundarios.

En contraste con las vías metabólicas primarias, existe un área del metabolismo concerniente a compuestos que están mucho más limitados en su distribución en la naturaleza. Este metabolismo implica la biosíntesis de compuestos que se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos e imprime rasgos característicos únicos a una especie. Estos compuestos son denominados metabolitos secundarios y representan una expresión de la individualidad de las especies. Los metabolitos secundarios no son necesariamente producidos bajo todas las condiciones ambientales y en la mayoría de los casos la función de estos compuestos y su beneficio aún se desconoce, no son esenciales para la supervivencia del organismo, sin embargo, es lógico asumir que juegan un rol importante para su bienestar. Algunos metabolitos regulan las interacciones entre plantas, microorganismos, insectos y animales, actúan como sustancias tóxicas contra depredadores o como compuestos volátiles responsables de la atracción de polinizadores, feromonas, entre otros.¹⁸

A primera vista, las estructuras de los metabolitos secundarios parecen ser asombrosamente diversas. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos pertenecen a una de varias familias, cada una de las cuales tienen características estructurales particulares que surgen de la forma en que se construyen en la naturaleza, es decir, a partir de su biosíntesis.²⁰

Aprovechando estas características de los metabolitos secundarios, el ser humano los ha utilizado para su beneficio, por ejemplo, en la industria farmacéutica, en la agricultura, en la industria cosmética, alimentaria, entre otros. Son comúnmente llamados productos naturales y representan moléculas con variadas estructuras. En muchos casos estos productos naturales pueden ser utilizados como materia prima para la obtención de otros compuestos, dando origen a nuevos compuestos con múltiples aplicaciones. La utilidad de los mismos está solamente limitada por la imaginación humana o por el avance de los conocimientos científicos.¹⁸ Derivado de la importancia y los usos que se les dan a los compuestos obtenidos a partir de especies vegetales, ha incrementado el interés sobre el estudio fitoquímico de estas, para ello, se determina la capacidad biológica y se realiza el aislamiento y elucidación de los metabolitos presentes en las plantas. Algunas de las actividades biológicas que más se miden son la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana, ambos por su importancia en la prevención de enfermedades.¹⁹

Una planta que resulta interesante estudiar es *Indigofera suffruticosa*, esta especie se ha utilizado para producir el colorante índigo, sin embargo, existen diversos estudios de su uso en la medicina tradicional.

2.4 Actividad antioxidante.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) formadas *in vivo*, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el peróxido de hidrógeno ($ROO^{\bullet}$); y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) como el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) y el dióxido de nitrógeno ($NO_2^{\bullet}$), son especies químicas transitorias, altamente inestables, son potencialmente perjudiciales por su alta reactividad y además están involucrados en los procesos de oxidación en los organismos.

En el caso de las plantas, las EROs y las ERNs son capaces de producir lesiones celulares oxidativas cuando las condiciones de estrés ambiental inducen una sobreproducción de ellas, sin embargo, también las utilizan como señales en distintos procesos biológicos, como crecimiento y desarrollo, en respuesta al estrés biótico y abiótico, y a la muerte celular programada. Gracias a que las plantas tienen una amplia gama de sistemas antioxidantes pueden regular la producción de estas especies

reactivas.²¹ Los antioxidantes biosintetizados por las plantas son los compuestos fenólicos, flavonoides, estilbenos, tocoferoles, tocotrienoles, ácido ascórbico y carotenoides.²²

En el caso de los seres humanos, las especies reactivas son esenciales para el suministro de energía, desintoxicación, señalización química y en la función inmune, y son regulados por el superóxido dismutasa endógena, el glutatión peroxidasa y la catalasa, pero debido a la sobreproducción, inducidas por la exposición a sustancias oxidantes externas o fallas en los mecanismos de defensa, dañan las estructuras celulares como el ADN, lípidos y proteínas, lo que aumenta el riesgo de iniciar el proceso de más de 30 enfermedades diferentes, entre las más notorias se encuentran las neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Parkinson.²³

La búsqueda de antioxidantes naturales para usos dietéticos, cosméticos y farmacéuticos se ha convertido en un importante desafío de la investigación industrial y científica en las últimas dos décadas, por lo tanto, los esfuerzos por obtener un extenso conocimiento sobre el poder de los antioxidantes de las plantas y aprovechar su potencial aumentan continuamente.²⁰

Existen diversos ensayos para medir la actividad antioxidante en plantas, rápidos y consistentes, sin embargo, cada uno de ellos presentan sus ventajas y desventajas, por lo que se prefiere evaluar al menos dos métodos en lugar de un enfoque unidimensional. Los métodos más comunes son los que se describen a continuación: *ensayo del poder antioxidante reductor del hierro* (FRAP, por sus siglas en inglés), este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm.²⁴ *Ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno* (ORAC, por sus siglas en inglés), este método consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido ($\text{ROO}^{\bullet}$), evalúa la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger a la proteína del daño oxidativo. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado en muchos

estudios recientes de las plantas, ya que presenta la ventaja de combinar el porcentaje de inhibición y el tiempo de duración de la inhibición de los radicales libres de la acción en una sola cantidad.²⁵ *Ensayo del radical DPPH* (DPPH•, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), es un ensayo de decoloración que evalúa la disminución de la absorbancia a 515-528 nm producido mediante la adición de uno o varios antioxidantes a una solución de DPPH•.²⁶ Esta técnica se basa en que el DPPH• es susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de hidrógeno proporcionado por el antioxidante.²⁷ Se analiza la reducción de la absorbancia medida a 517 nm (Figura 3).

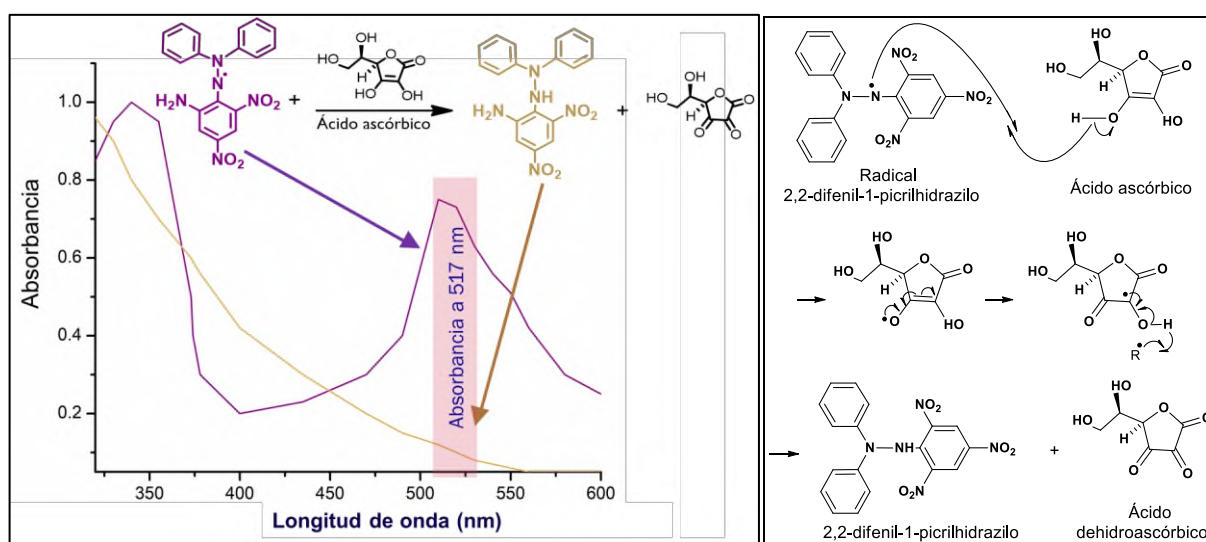


Figura 3. a) Espectro de UV-Vis del DPPH• (morado), espectro de UV-Vis del DPPH reducido (café). **b)** Mecanismo propuesto para la desactivación del DPPH• con ácido ascórbico. (Tomado de Measurement of antioxidant activity and capacity)²⁸

Otra técnica ampliamente usada, es el *ensayo del radical catión ABTS* (ABTS•⁺, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)), también es una técnica de decoloración en la que el radical se genera previamente a través de la reacción entre ABTS y persulfato de potasio en una forma estable antes de la reacción con supuestos antioxidantes. El ABTS•⁺ tiene máximos de absorción a longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm, sin embargo, se mide la reducción de color (absorbancia), si el radical es estabilizado por agentes antioxidantes, a 734 nm (Figura 4).²⁹

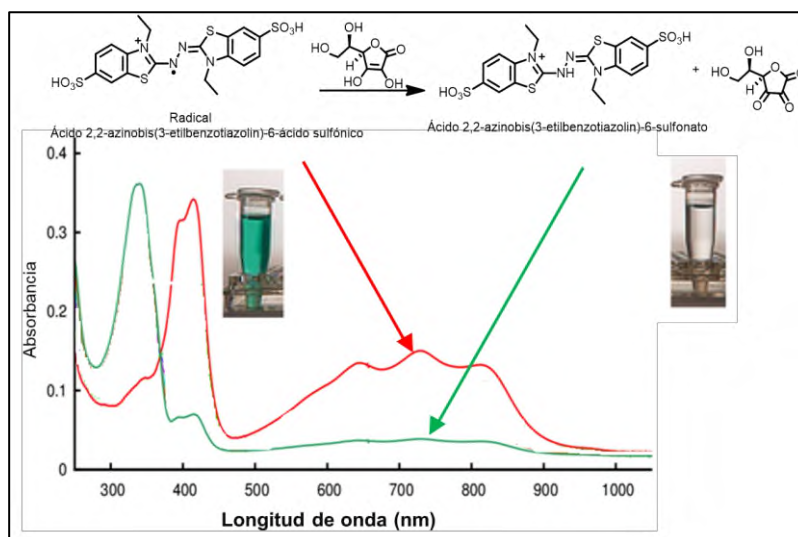


Figura 4. En la parte superior se muestra la reacción general del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ con ácido ascórbico, en la parte inferior se observan los espectros de UV-Vis del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (rojo), y del ABTS^+ reducido (verde). (Tomado de Measurement of antioxidant activity and capacity)

2.5 Actividad antimicrobiana.

Los fármacos derivados de plantas usadas en la medicina tradicional y que presentan propiedades antimicrobianas están bien documentados, por ello existe un interés creciente en el estudio de las plantas como fuentes de agentes antimicrobianos.³⁰ Investigaciones recientes se han centrado en estudios de extractos de plantas, aceites esenciales, metabolitos secundarios puros y nuevas moléculas sintetizadas como posibles agentes antimicrobianos.

Dentro de los métodos utilizados para determinar la actividad antimicrobiana; los métodos de dilución son de los más apropiados para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizado en el agar (dilución de agar) o medio de caldo (macrodilución o microdilución). Se puede usar el método de dilución en caldo o en agar para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos. El valor de la MIC registrado se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado que inhibe el crecimiento del microorganismo analizado y generalmente se expresa en $\mu\text{g/mL}$ o mg/L .³¹

Algunos de los fitoquímicos bioactivos más simples consisten en un solo anillo fenólico sustituido. Las hierbas comunes estragón (*Artemisia dracunculus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) contienen ácido cafeico, que es efectivo contra virus, bacterias y hongos. Tanto el catecol como el pirogalol son compuestos fenólicos, que se ha demostrado que son tóxicos para los microorganismos (Figura 5). Los grupos hidroxilo están relacionados directamente con la toxicidad relativa para los microorganismos, con evidencia de que el aumento de la hidroxilación da como resultado un aumento de la toxicidad.²⁸

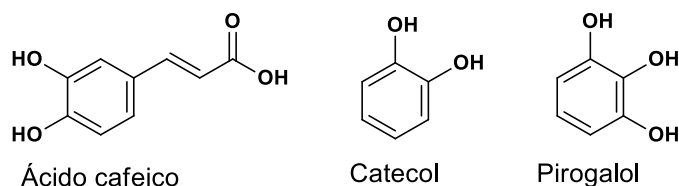


Figura 5. Compuestos fenólicos comunes en plantas y que presentan propiedades antimicrobianas. (Tomado de Plant products as antimicrobial agents)²⁸

En los mecanismos propuestos sobre la toxicidad fenólica para los microorganismos se incluyen la inhibición enzimática por los compuestos oxidados a través de la reacción con grupos sulfhidrilo y/o a través de más interacciones inespecíficas con las proteínas. Los compuestos fenólicos que poseen una cadena lateral C-3 a un nivel inferior de oxidación y que no contienen oxígeno se clasifican como aceites esenciales y a menudo son citados como antimicrobianos.³² Otra familia de compuestos con propiedades antimicrobianas son los alcaloides, comúnmente aislados de las plantas de la familia Ranunculaceae o Ranúnculo, por ejemplo, la solamargina es un glicoalcaloide aislado de las bayas de *Solanum khasianum* es útil contra infecciones intestinales asociadas con el SIDA. La berberina y el harmano son efectivos contra *tripanosomas* y *plasmodium* (Figura 6).²⁸

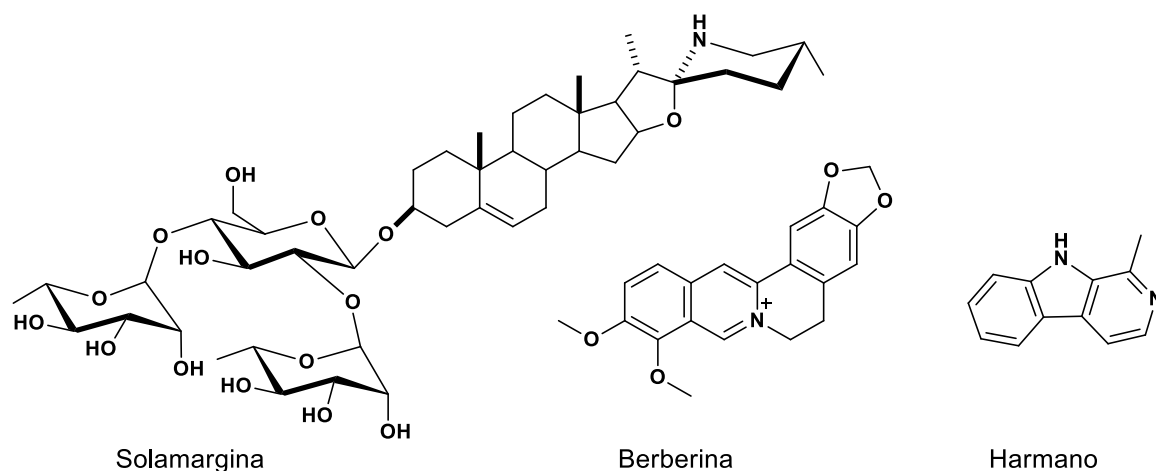


Figura 6. Alcaloides aislados de la familia Ranunculaceae con propiedades antimicrobianas. (Tomado de Plant products as antimicrobial agents)²⁸

2.6 Descripción del género *Indigofera*.

El género *Indigofera* cuenta con más de 700 especies de plantas con flores, pertenecientes a la familia Fabaceae. Están distribuidas extensamente a través de las regiones tropicales y subtropicales del mundo,³³ es un género que florece y fructifica durante todo el año. En México se encuentra *Indigofera suffruticosa*, una especie que se le conoce comúnmente como platanillo, jiquilite y añil, este último por una de sus principales aplicaciones en la producción de un colorante que lleva ese nombre.⁸

Es una hierba de 1.5 m de altura, con los tallos cuadrados, las hojas están divididas en hojuelas, sus flores se encuentran en la unión del tallo y las hojas, sus frutos miden de 1 a 1.5 cm y sus semillas son cilíndricas, en la figura 7 se pueden observar algunas de sus principales características.

La especie *I. suffruticosa* es originaria de América austral, habita en clima cálido, desde el nivel del mar hasta los 1 100 m. Es una planta silvestre que crece a las orillas de los caminos, de arroyos o riachuelos, asociada a vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorral, xerófilo y pastizal.^{34,35}

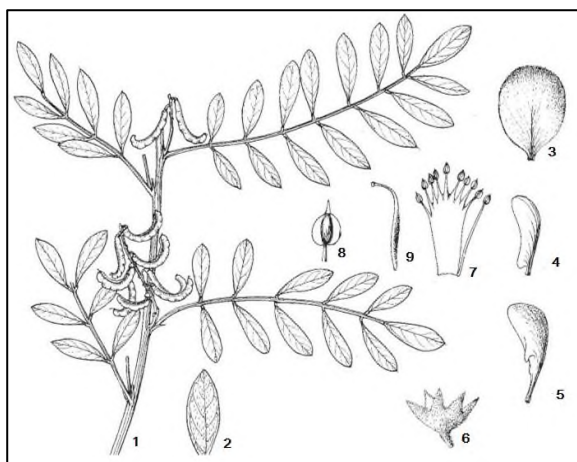


Figura 7. Partes la planta *L. suffruticosa*, 1. Rama floreciente; 2-5. Hojas; 6. Cáliz; 7. Androceo; 8. Estambre; 9. Pistilo. (Tomado de <http://www.efloras.org>).³⁶

2.6.1. Etnobotánica y antropología.

A lo largo de nuestro país se usa a esta planta de diferentes maneras y para tratar diversos males, por ejemplo, en el sur (Tabasco y Quintana Roo) se le usa para desprender verrugas, para el mal de ojo (dolor de cabeza y ojos) y para tratar parásitos intestinales, entre otros malestares. En Nayarit, se recomienda el polvo extraído de las hojas para el empacho o como agua de uso para la soltura (disentería). Otros usos documentados incluyen el tratamiento de quemaduras al colocar las hojas directamente sobre la piel; también el añil se utiliza para problemas de estreñimiento, en heridas, llagas, sarna y caspa.³⁷ Además, experimentalmente se ha comprobado su efectividad como antiepiléptico, depresor del sistema nervioso central, hipotensor y antibiótico, se usa para teñir telas e incluso hay registro de su uso en culturas prehispánicas en murales y pinturas. El Códice Florentino señala que puesta la hierba sirve para las enfermedades de la cabeza.⁸

A inicios del siglo XX, el Instituto Médico Nacional describió su actividad como acaricida, antiepiléptico, antiespasmódica, antipirética, astringente, para el dolor de cabeza, laxante, diurético, eclampsia, expectorante, para la gastroenteritis, locura, como sedante y como analgésico. En ocasiones ha presentado toxicidad, se observó en caso de sobredosis cuando se ha utilizado como purgante, provocó diarreas severas y espasmos. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la considera como tratamiento para la epilepsia y como laxante.⁸

De acuerdo a los estudios fitoquímicos preliminares realizados a *I. suffruticosa* se identificaron la presencia de flavonoides, cumarinas y triterpenos en extractos obtenidos de las hojas de esta planta, con base a ello se puede asumir que algunos extractos de especies de este género posean propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

3. ANTECEDENTES

El género *Indigofera* pertenece a la familia Fabaceae, que se clasifica como la tercera familia más grande de las plantas en floración después de Orchidaceae y Asteraceae, con aproximadamente 650 géneros y 18 000 especies diferentes. La familia en general se caracteriza por un tipo de fruto en forma de vaina (legumbre). Fabaceae se divide en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Faboideae.³⁸

Diversos estudios en la literatura sobre el género *Indigofera* destacan las actividades biológicas y en algunos casos se mencionan los metabolitos aislados de diferentes partes de la planta, como se describen a continuación:

Chen-Chieh, *et al.*, en 2013 determinaron la actividad como agente quimiopreventivo y antiinflamatorio del extracto etanólico y acuoso de las hojas de *I. suffruticosa* Mill y, a través de un estudio fitoquímico preliminar identificaron a una familia de compuestos como flavonoides, los cuales describieron como responsables de dicha actividad.^{39,40}

Luiz Ferreira, *et al.*, en 2011 estudiaron la capacidad antiulceragénica del extracto obtenido con CHCl₃ y MeOH de partes aéreas de *I. suffruticosa*, así como la presencia de flavonoides sin especificar estructuras.⁴¹

Bu Wong, *et al.*, en 1999 y Pérez de alejo, *et al.*, en 1996 publicaron una importante actividad anticonvulsionante del extracto etanólico de hojas, tallos, raíz y frutos de *I. suffruticosa*, aunque no atribuyen esta actividad a un determinado grupo de metabolitos.^{42,43}

Pereira Leite, *et al.*, en 2006 realizaron varias extracciones con hojas de *I. suffruticosa*, de la cuales describieron una importante actividad antimicrobiana en el extracto acuoso.⁴⁴

Sánchez Govín, *et al.*, en 2006 identificaron tres importantes familias de compuestos (cumarinas, flavonoides y triterpenos) al realizar una extracción con MeOH de hojas y tallos de *I. suffruticosa* Mill.⁴⁵

Senthil Kumar, *et al.*, en el 2013 estudiaron la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva del extracto obtenido con MeOH de hojas de *I. cassioides* Rottl, e identificaron algunas familias de compuestos como esteroides, taninos, flavonoides y glucósidos.⁴⁶

Lopes, *et al.*, en el 2011 realizaron una extracción con MeOH de las hojas de *I. suffruticosa* de la cual, mediante cromatografía en columna aislaron y elucidaron algunos alcaloides como al índigo (1), indirubina (2), indican (3), dioxindol- β -D-glucósido (4) y alantoína (5, figura 8). Además, obtuvieron que el indican posee actividad inmunoestimulante y actividad citotóxica con mejores resultados que la mezcla de los alcaloides 2-5.⁴⁷

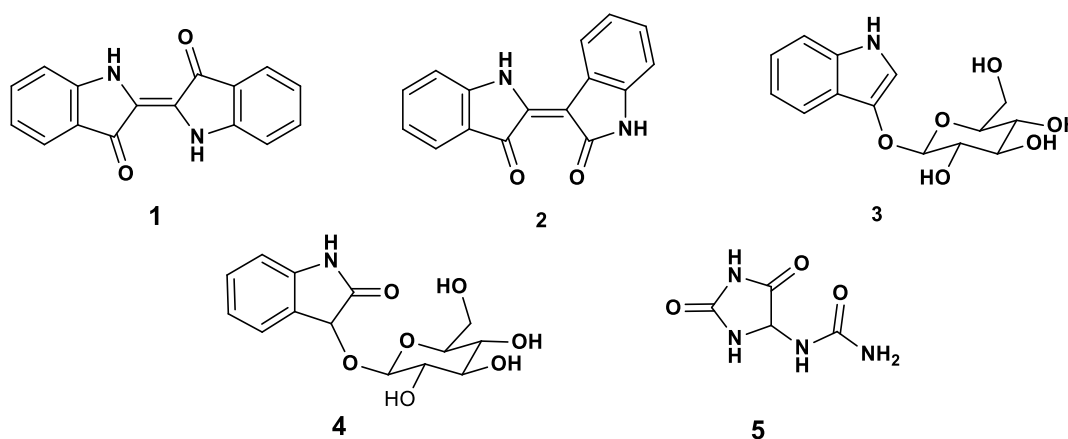


Figura 8. Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de las hojas de *I. suffruticosa*. (Tomado de Lopes, *et al.* 2011)

Garcez, *et al.*, en 1989 realizaron extracciones sucesivas con hexano, AcOEt y EtOH de la raíz y tallos de *I. suffruticosa*, y describen el aislamiento y elucidación del compuesto 2,3,4,6-tetra-(3-nitropropanoil)- α -D-glucopiranososa (**6**, figura 9).⁴⁸

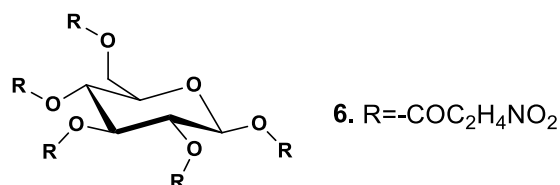


Figura 9. Estructura del compuesto aislado de las raíces y tallos de *I. suffruticosa* mediante extracciones sucesivas. (Tomado de Garcez, *et al.* 1989)

Domínguez, *et al.*, en 1979 utilizaron toda la planta de *I. suffruticosa* para obtener extractos con éter de petróleo y EtOH logrando el aislamiento e identificación de β -sitosterol (**7**) y lousifieserona (**8**) del extracto de éter de petróleo y D-(+)-pinitol (**9**) del extracto etanólico (Figura 10).⁴⁹

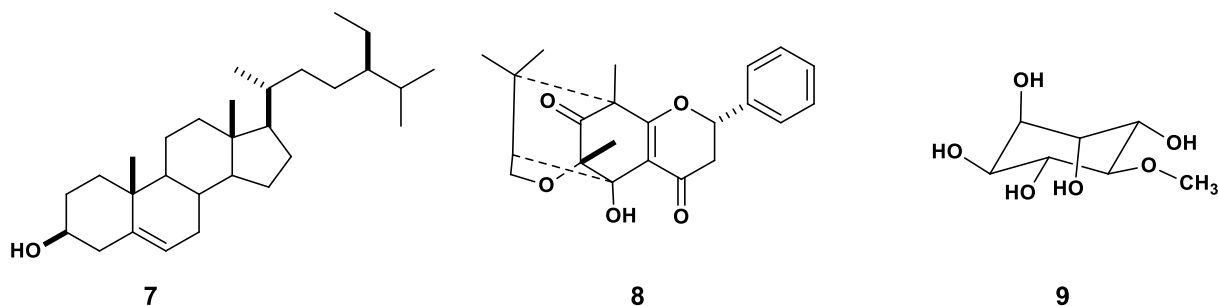


Figura 10. Estructuras de los compuestos presentes en la planta entera de *I. suffruticosa*, del extracto de éter de petróleo se aislaron los compuestos **7** y **8** y del extracto etanólico el compuesto **9**. (Tomado de Domínguez, *et al.* 1979)

Bueno Pérez, *et al.*, en 2013 realizaron extracciones con CHCl_3 y MeOH de las hojas, flores y frutos de *I. spicata*, los cuales presentaron actividad como agente quimiopreventivo. De estos extractos aislaron y elucidaron algunas flavononas ya conocidas como (+)-5"-deacetilpurpurina (**10**), (+)-5-metoxipurpurina (**11**), (2S)-2,3-dihidroteproglabrina (**12**), y (2S)-2,3-dihidroteproapollina C (**13**), dos nuevas flavononas (+)-purpurina (**14**) y (2S)-7-metoxi-8-(3-metoxi-3-metilbut-1-enil)flavanona (**15**), tres rotenoides; los *cis*-(6a β ,12a β)-hidroxirotenona (**16**), rotenona (**17**) y teprosina (**18**) y una chalcona (+)-tepropurpurina (**19**, Figura 11).⁵⁰

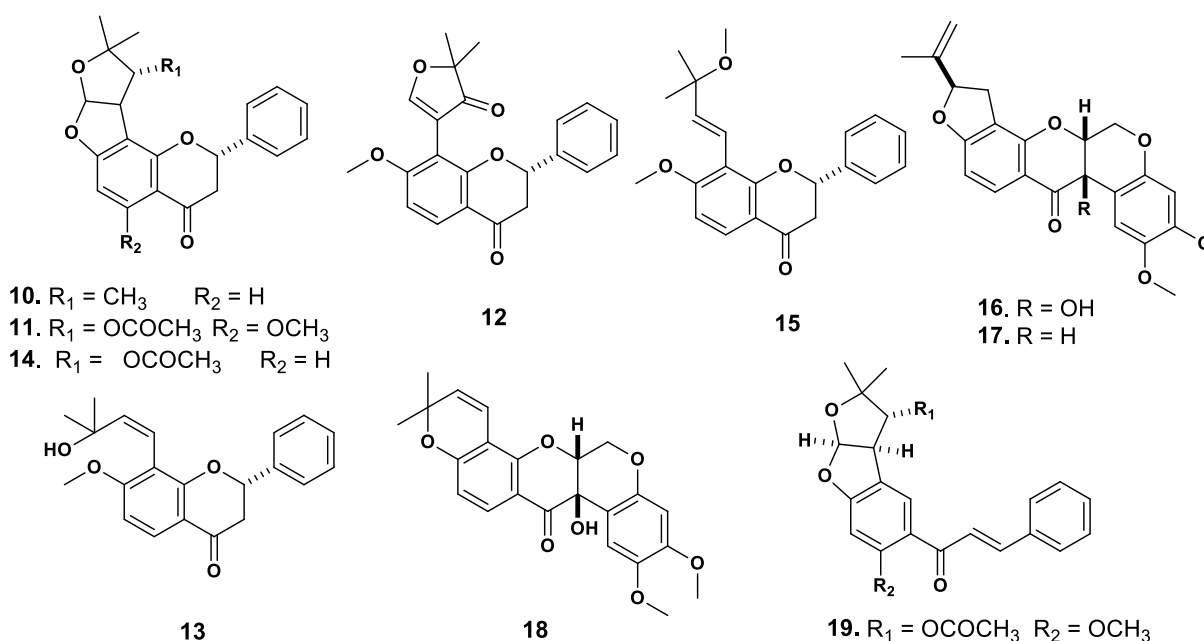


Figura 11. Estructuras de los compuestos aislados de flores y frutos de *I. spicata*, con CHCl_3 y MeOH. (Tomado de Bueno Pérez, *et al.* 2013)

Cândido da Silva Moura, *et al.*, en 2011 identificaron en el extracto acuoso de las partes aéreas de *I. hirsuta* al triptófano (**20**) y uracilo (**21**) y del extracto metanólico a la rutina (**22**), kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosido (**23**), ácido gálico (**24**) y al galato de metilo (**25**, figura 12). Estudiaron la actividad antioxidante de los compuestos aislados y obtuvieron que los compuestos **22**, **24** y **25** presentaron la mayor actividad inhibitoria de radicales libres.⁵¹

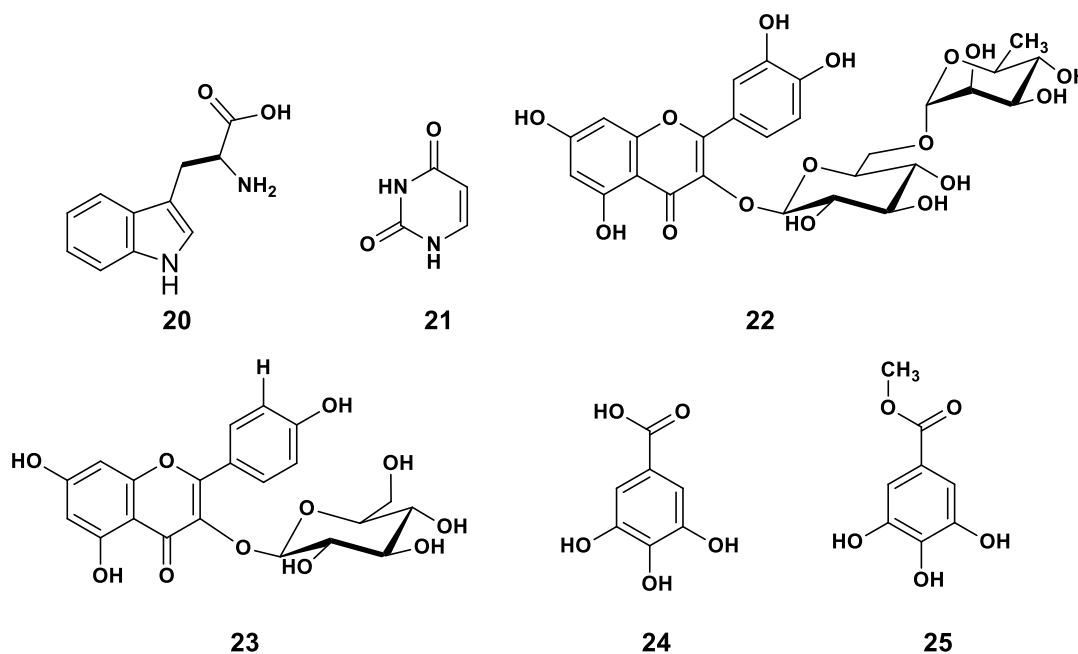


Figura 12. Estructuras de los compuestos presentes en las partes aéreas de *I. hirsuta*, del extracto acuoso se aislaron los compuestos **20** y **21**, y del extracto metanólico los compuestos **22-25**. (Tomado de Cândido da Silva, *et al.* 2011)

Rahman, *et al.*, 2018, publicaron una revisión sobre los estudios fitoquímicos y biológicos del género *Indigofera*. Encontraron 65 compuestos identificados y/o aislados. Los componentes químicos aislados son en su mayoría del tipo terpenoides, flavonoides y compuestos que contienen grupos nitro, junto con esteroides, entre otros. Los metabolitos y extractos crudos del género mostraron diversas actividades biológicas, incluidas la antimicrobiana, insecticida, fitotóxica, antiulceragénica, hepatotóxica, teratogénica y citotóxica. Otros constituyentes aislados mostraron actividad inhibitoria contra la enzima lipoxigenasa y actividad gastrointestinal.

Algunos de los metabolitos aislados así como la especie de donde provienen son: rutina (**22**) (*I. kirilowi*), quercetin-3-O-glucosidasa (**26**) (*I. kirilowi*), ácido-3-nitropropanoico (**27**) (*I. spicata*) quercetina (**28**) y kaemferol (**29**) (*I. aspalathoides*), 3-nitropropanoatos o 2,3,4,6-tetrakis-(3-nitropropanoil)- β -D-glucopiranososa (**30**) (*I. suffruticosa* e *I. linnaei*), indigoidin (**31**) (*I. pseudomonas*), indigotin o índigo, 2,2'-bis-indolalcaloide (**1**) (*I. tinctoria*), β -sitosterol (**7**) (*I. pseudotinctoria*), indigin (**32**) (*I.*

oblongifolia Forssk), ácido indigoférico (**33**) (*I. oblongifolia* Forssk), indigoferamida-A (**34**) (*I. heterantha*, figura 13).³⁴

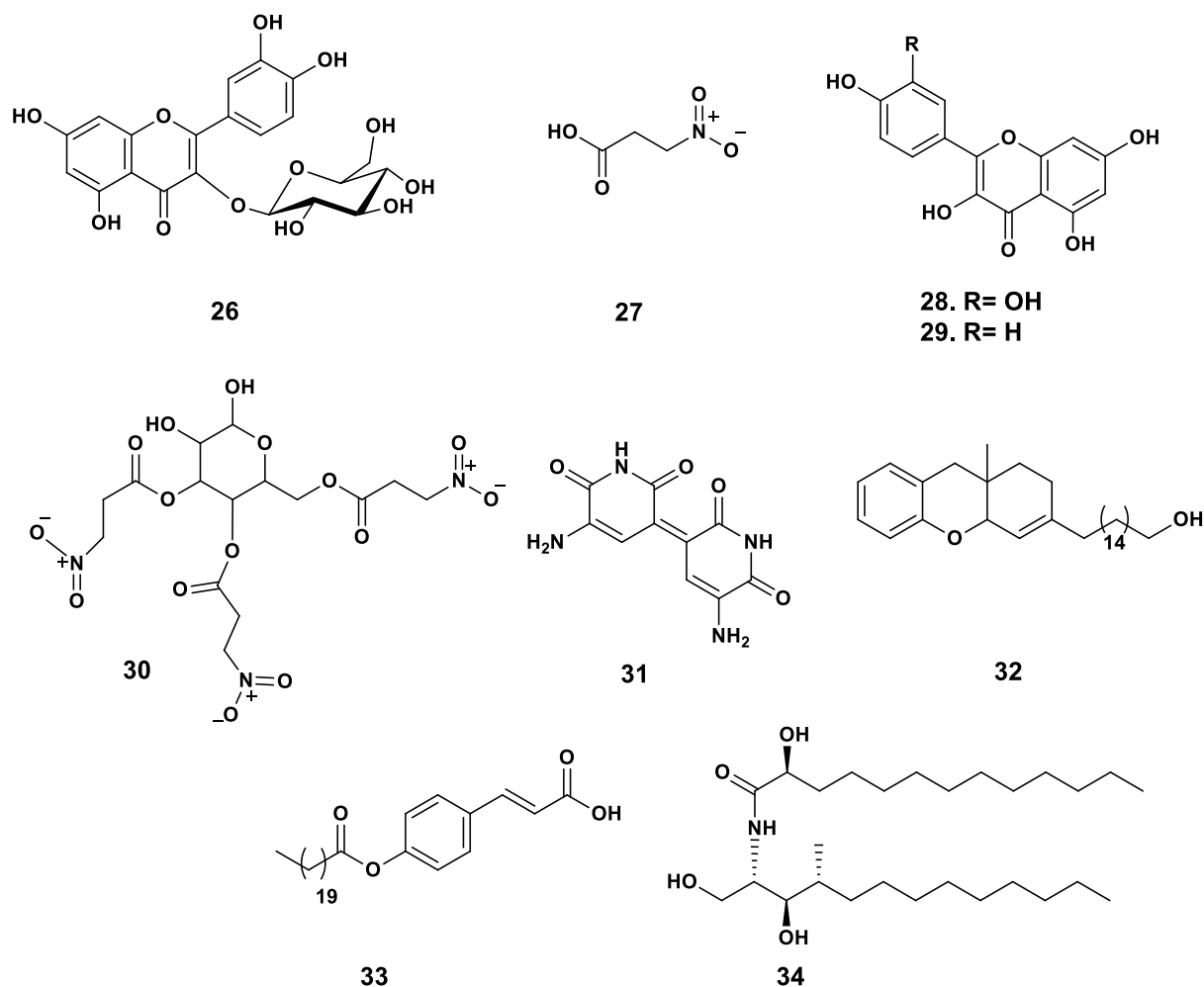


Figura 13. Compuestos aislados en diferentes especies del género *Indigofera*. (Tomado de Rahman, et al. 2018)

4. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

El aislamiento y elucidación de nuevas moléculas o metabolitos secundarios a partir de especies vegetales se ha incrementado en los últimos años, debido a que son las principales fuentes de principios activos para la elaboración de nuevos fármacos, para ello, se hace uso de diferentes métodos de extracción, aislamiento, identificación y caracterización, con el fin de hacer eficiente la obtención de metabolitos secundarios.

4.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU).

El uso de plantas en la medicina tradicional ha generado el interés por conocer los compuestos activos. Tradicionalmente, las hojas o partes de la planta son triturados para reducir su tamaño y así aumentar la eficiencia durante la etapa de extracción.

Las técnicas de extracción comúnmente usadas son: maceración, extracción con fluidos supercríticos, extracción alcalina y/o extracción enzimática, sin embargo, algunos de estos métodos pueden causar la pérdida de compuestos bioactivos debido a las altas temperaturas y tiempos de extracción prolongados.⁵² Es por ello que se han desarrollado nuevos métodos de extracción, tales como el uso de microondas y EAU que aumentan la eficiencia, reducen considerablemente los tiempos de extracción, consumen menos energía y reducen el volumen de los disolventes usados.^{53,54}

Se considera que las principales razones que mejoran la eficiencia de la EAU es el aumento de la velocidad de movimiento molecular y mayor penetración del disolvente.⁵⁵ Otras de las ventajas de la EAU incluyen un tiempo de extracción corto, menor temperatura y menos pérdida de compuestos bioactivos, además, proporciona alta reproducibilidad y fácil manejo.⁵⁶

Se han descritos varios mecanismos que pueden ser activados por el ultrasonido de alta intensidad (20-100 KHz), tales como calentamiento, turbulencia, agitación, fricción, inestabilidad superficial y otros. Aunque no todos están bien estudiados, la mayoría de ellos se pueden atribuir a un fenómeno no lineal y muy complejo conocido como cavitación. Se sabe que cuando la potencia del ultrasonido aumenta, se presentan cambios químicos y físicos en el medio líquido por la generación y posterior destrucción

de burbujas de cavitación. Cuando un líquido se somete a ultrasonido con suficiente potencia, el líquido se comprime y se expande, formando pequeñas burbujas o cavidades (Figura 14).⁵⁷ Estas burbujas crecen y se encogen con los ciclos de expansión y compresión de la onda ultrasónica, cuando alcanzan un tamaño crítico éstas explotan. El colapso de estas burbujas puede ser tan violento, que puede causar daños considerables al medio circundante.⁵⁸

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la EAU en material vegetal seco es un proceso de dos etapas que involucra: (i) remojo del material vegetal en el disolvente para facilitar los procesos de hinchamiento e hidratación; (ii) la transferencia de masa de constituyentes solubles del material al disolvente por difusión y procesos osmóticos. Es así como el ultrasonido puede facilitar la hinchazón y la hidratación y, por lo tanto, causar un agrandamiento en los poros de la pared celular. Esto mejorará el proceso de difusión y la transferencia de masa.⁵⁹

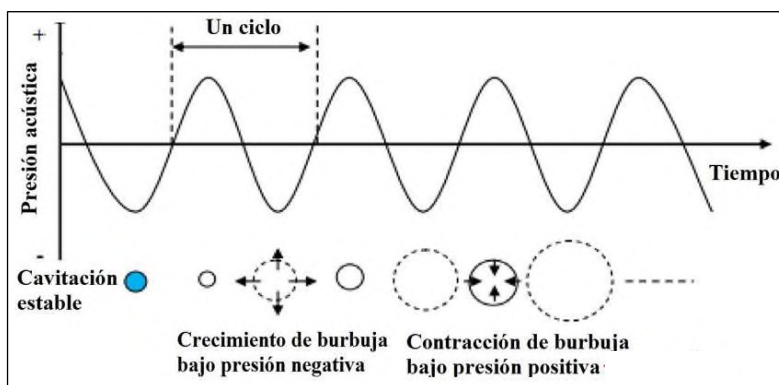


Figura 14. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido, un líquido que es sometido a ultrasonido genera pequeñas burbujas que se comprimen y se expanden hasta la implosión de ellas. (Tomado de Chen C. *et al.* 2015)⁶⁰

4.2 Cromatografía.

La unión internacional de química pura y aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) define a la cromatografía como un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, la fase estacionaria y la fase móvil. La fase móvil se mueve en una dirección definida y pasa sobre la fase estacionaria. Las sustancias que se separan son atraídas a la fase estacionaria por efecto intermolecular; cuanto más fuerte es la atracción, más lento migran a través de

la fase móvil. Todos los métodos cromatográficos dependen de la distribución de los compuestos separados entre la fase móvil y la fase estacionaria.

4.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF).

La CCF es especialmente útil para: a) determinar el número de compuestos en una mezcla, b) establecer si dos o más compuestos son idénticos o no y c) seguir el curso de una reacción. En CCF, las placas están recubiertas con una capa delgada de adsorbente que sirve como fase estacionaria. La fase estacionaria polar más utilizada en la CCF es gel de sílice, partículas de SiO_2 finamente molidas que recubren la placa. Para la fase móvil se utiliza un disolvente puro o una mezcla de disolventes; la composición apropiada de la fase móvil depende de las polaridades de los compuestos en la mezcla que se estén separando.

Una vez aplicada la muestra en la placa cromatográfica se introduce en una cámara saturada de la fase móvil, en donde el disolvente se eleva a través de la fase estacionaria por acción capilar, a medida que el disolvente asciende por la placa, la muestra se distribuye entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuanto más se une un compuesto al adsorbente, más lentamente se mueve en la placa. La placa de CCF se retira y se marca inmediatamente la posición del frente de disolvente antes de que el disolvente se evapore, la placa seca se revela. Por último, se calcula el tiempo de retención (R_f , por sus siglas en inglés, ecuación 1) de el o los compuestos que se hayan separado (Figura 15a,b).⁶¹

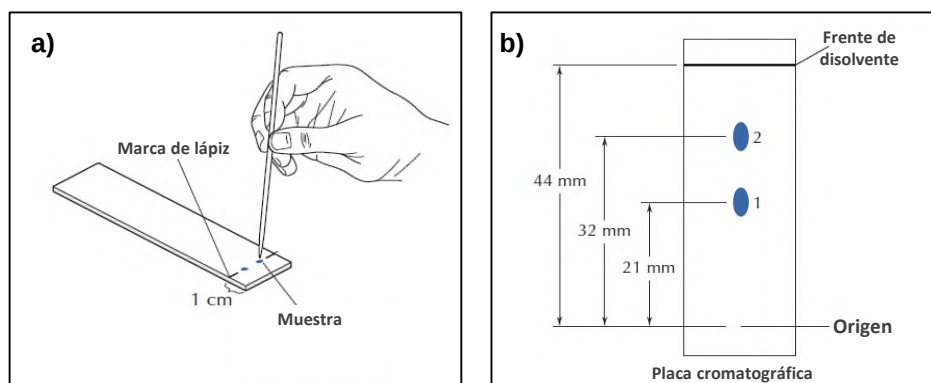


Figura 15. Cromatografía en capa fina, **a)** preparación de la placa y **b)** distancia recorrida por el frente del disolvente y distancia recorrida por los compuestos. (Tomado de Techniques in organic chemistry)

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el frente de disolvente}} \dots\dots\dots \text{Ec. 1}$$

Algunos compuestos absorben a la luz visible y sus bandas son evidentes, sin embargo, son muchos los compuestos que no se observan al visible y es necesario usar diferentes reveladores. Para los compuestos con cromóforos que absorben en el ultravioleta al cuarzo, tales como sistemas aromáticos, carbonilos α , β insaturados y cualquier otro compuesto que contenga sistemas π -conjugados, se utilizan placas impregnadas con un indicador fluorescente (silicato de zinc activado con manganeso o sulfuro de cadmio de zinc), y se observan con una lámpara UV de 254 y 365 nm.⁶²

Alternativamente, se usan reactivos que al contacto con la placa cromatográfica generan bandas de color, entre los más utilizados se encuentra la calcinación previo tratamiento con H_2SO_4 al 50% o vainillina, ambos reveladores son considerados universales. El reactivo con KMnO_4 se usa para ver principalmente alquenos y alquinos, los cuales se observan como una mancha amarilla brillante sobre un fondo púrpura. También se pueden visualizar alcoholes, aminas, sulfuros y otros grupos funcionales fácilmente oxidables, sin embargo, será necesario calentar suavemente la placa después de la inmersión en la solución de KMnO_4 .

4.2.2 Cromatografía en columna (CC).

La CC se usa para separar compuestos no volátiles y se puede llevar a cabo con diferentes cantidades de muestra, que van desde unos pocos miligramos hasta gramos, considerando las características de la columna. En la CC, la fase estacionaria es un adsorbente sólido (generalmente gel de sílice), empaquetado en una columna y una mezcla de disolventes sirve como la fase móvil. La separación ocurre por interacciones selectivas de los compuestos en la muestra con la fase estacionaria y la fase móvil. La elección correcta de los disolventes de elución y las cantidades a usar son, en parte, un proceso de prueba y error realizado mediante CCF. Las polaridades relativas de estas dos fases determinan el orden en que los compuestos en la muestra se eluyen de la columna (Figura 16).⁵⁴

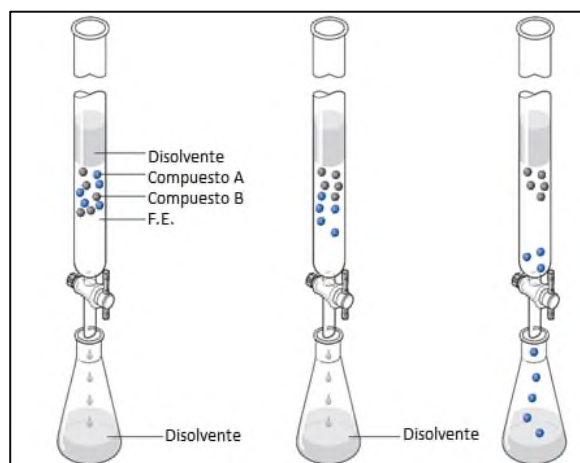


Figura 16. Proceso de separación en cromatografía en columna, donde A y B son compuestos de diferente polaridad interaccionando con la fase estacionaria y con la fase móvil. (Tomado de Techniques in organic chemistry)

En los inicios de la CC, los compuestos eran separados usando la acción de la gravedad, debido a esto, la longitud y diámetro de las columnas eran grandes, los tiempos de separación muy largos y por consecuencia se usaban enormes cantidades de disolvente. Una variable que mejoró considerablemente el método de separación, fue la introducción de presión en la columna para que el proceso de adsorción-desorción fuera más rápido (*cromatografía flash*), con ello se redujeron considerablemente el tamaño de las columnas, los tiempos de separación y la cantidad de disolventes empleados, en la tabla 1 se resumen las condiciones de separación usando presión y considerando las características de la mezcla de los compuestos a separar, se recomienda para cada caso una altura de 5-6 in de sílica gel.⁶³

Tabla 1. Dimensiones de columna y volumen de disolvente para cromatografía flash.

Diámetro de columna (mm)	Volumen de eluyente (mL)	Cantidad de muestra (mg)		Volumen recolectado (mL)
		$\Delta R_f \geq 0.2$	$\Delta R_f \geq 0.1-0.2$	
10	100	100	40	5
20	200	400	160	10
30	400	900	360	20
40	600	1600	600	30
50	1000	2500	1000	50

(Tomado de Still, W.C. *et al.* 1978)

4.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

La espectroscopia de RMN es la herramienta más utilizada en la elucidación de moléculas orgánicas. A diferencia de otras técnicas espectroscópicas, la RMN no es un fenómeno que se lleve a cabo naturalmente, en esta técnica se requiere sumergir a los núcleos con espín diferente de cero en un campo magnético externo (B_0), una vez que se cumple esta condición, se hacen interactuar con radiación electromagnética. La energía necesaria para la RMN es del orden de radiofrecuencias y es de mucho menor energía que la que necesitan otras técnicas espectroscópicas (UV-Vis, IR). El espín nuclear es una propiedad intrínseca a los núcleos y está relacionado con el número atómico y el número de masa; y puede ser 0, 1/2, 1, 3/2, 2, y así sucesivamente. Cualquier isótopo cuyo núcleo tenga un momento magnético diferente de cero es en teoría, detectable por espectroscopia de RMN.

Algunos de los núcleos observables incluyen al ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P (Tabla 2). Los núcleos más importantes para la determinación de estructuras en química orgánica son el ^1H y ^{13}C , ambos tienen un espín de 1/2. Cualquier núcleo con un número atómico par y un número de masa par tiene un espín nuclear de cero. Debido a que ^{12}C y ^{16}O tienen $I = 0$, no producen señales de RMN.⁶⁴

Tabla 2. Núcleos de importancia en espectroscopia de RMN.

Núcleo	Espín (I)	Abundancia (%)	Frecuencia RMN ($B_0=9.39$ T)	Relación giromagnética (γ)
^1H	$\frac{1}{2}$	99.9	400	26.7519
^2H	1	0.01	61.4	4.1066
^{10}B	3	19.5	42.98	2.8746
^{11}B	$\frac{3}{2}$	80.4	128.33	8.5843
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1.1	100.6	6.7283
^{14}N	1	99.6	28.9	1.9338
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0.3	40.5	-2.712
^{17}O	$\frac{5}{2}$	0.03	54.3	-3.6279
^{19}F	$\frac{1}{2}$	100	376.5	25.181
^{29}Si	$\frac{1}{2}$	4.7	79.46	-5.3188
^{31}P	$\frac{1}{2}$	100	162.1	10.841

(Tomado de Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy)

Hay $2I+1$ niveles de energía permitidos para un núcleo espín $\neq 0$. Debido a que el ^1H y ^{13}C tienen $I = \frac{1}{2}$, hay dos niveles de energía posibles para estos núcleos. En ausencia de un campo magnético externo todos los espines tienen la misma energía, sin

embargo, en presencia de un campo magnético los espines nucleares tendrán diferente energía, un nivel α , de menor energía y el otro nivel β , de mayor energía (Figura 17a). La diferencia en la energía entre los niveles (ΔE), está directamente relacionada con la fuerza del campo magnético B_0 aplicado externamente. En espectroscopia, la forma convencional para expresar el cambio de energía está dado por la frecuencia (ν), según lo describe la ley de Planck:⁵⁹

$$\Delta E = h\nu \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

Una vez que los núcleos están inmersos en el campo magnético se establece un estado de pseudoequilibrio, es en este punto donde se irradia a los núcleos con radiofrecuencias y se satura al sistema, cuando se deja de irradiar al sistema de núcleos, este regresa a su estado basal, el estado de mayor energía cae al estado de menor energía a través de mecanismos de relajación, produciéndose una señal de RMN (Figura 17b).⁵⁹

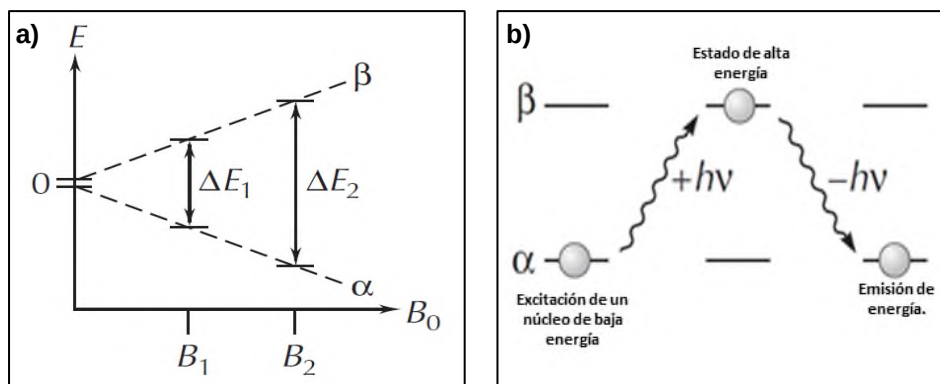


Figura 17. a) Núcleos con espín de $\frac{1}{2}$ bajo la influencia de un B_0 , a mayor intensidad de B_0 mayor es la diferencia de energías de los estados α y β , **b)** proceso de excitación-relajación de un núcleo. (Tomado de Techniques in organic chemistry)⁵⁶

Por lo general, el análisis de los compuestos orgánicos se realiza en solución, para ello se usan disolventes deuterados, de esta forma el disolvente no interfiere en el espectro de ^1H de la muestra a analizar. Aunque la pureza del disolvente deuterado sea muy alta, el ^1H es lo suficientemente sensible para que el disolvente residual no deuterado se observe en el espectro, lejos de ser un inconveniente, estas señales características se pueden usar como referencia, aunado a ello, se utilizan referencias

internas; para el caso de CDCl_3 se hace uso del TMS y se ubica su señal simple en 0 ppm (Tabla 3).⁵⁶

Tabla 3. Espectroscopia de RMN de disolventes deuterados.

Disolvente	Señal del ^1H residual ppm	Señal en ^{13}C ppm
CDCl_3	7.26 (simple)	77.0 (triplete)
$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	2.04 (quíntuple)	29.8 (séptuple)
$\text{DMSO}-d_6$	2.49 (quíntuple)	39.7 (séptuple)

(Tomado de Techniques in organic chemistry)

Como ya se mencionó, la espectroscopia de RMN es la herramienta más poderosa en la elucidación de compuestos orgánicos; proporciona diferentes tipos de datos que en su conjunto determinan la estructura de una molécula. La información que arroja un espectro de RMN se describe a continuación:

a) **Número de señales;** un espectro de una muestra pura tendrá tantas señales como núcleos diferentes tenga la molécula, es decir, si se analiza el espectro de protón de una molécula conocida, se tiene que considerar si sus protones son químicamente equivalentes, lo cual vendrá determinado por su ambiente químico. Para conocer la equivalencia química de los núcleos se utilizan criterios de sustitución y de simetría. En el caso de moléculas desconocidas, se puede hacer el análisis en sentido opuesto, en donde el número de señales será el correspondiente al número de núcleos diferentes en la molécula, pero no al número de núcleos totales.

b) **Desplazamiento químico (δ);** diversos factores influyen en el desplazamiento químico de las señales, los más importantes son los efectos de apantallamiento magnético y la anisotropía magnética.

El campo magnético que siente cada núcleo es ligeramente diferente al campo magnético aplicado B_0 . El campo magnético exterior hace que los electrones alrededor del núcleo circulen, creando unas corrientes electrónicas que a su vez generan un campo magnético que, en general, se opone al campo aplicado. El campo efectivo que siente el núcleo es igual a $B_{\text{efec}} = (1 - \sigma)B_0$, en donde σ es la constante de apantallamiento. Así, los electrones que están en la cercanía del núcleo lo están protegiendo del campo externo. De esta manera, a mayor densidad electrónica alrededor del núcleo mayor será la protección y la señal se desplazará

a campos altos, y si la densidad electrónica disminuye, el núcleo estará desprotegido y la señal se desplazará a campos bajos.

Los enlaces químicos son en general magnéticamente anisotrópicos, debido a que el momento magnético inducido por un campo externo no es igual en las tres direcciones del espacio, es decir, la protección de los núcleos dependerá de la posición geométrica en relación al resto de la molécula. Este efecto se puede explicar en el caso de moléculas aromáticas, en la corriente en el anillo inducida por los electrones π deslocalizados colocados en el campo magnético externo, las líneas de fuerza del campo magnético adicional circulan en sentido opuesto al campo magnético externo, incrementando y reduciendo la protección en los núcleos vecinos del anillo aromático (Figura 18).⁵⁶

La densidad electrónica alrededor de los núcleos se ve afectada por los grupos vecinos, los cuales tienen un efecto de protección o desprotección, en la figura 19 se observan las zonas de desplazamiento químico para algunos de los protones más comunes en los compuestos orgánicos.

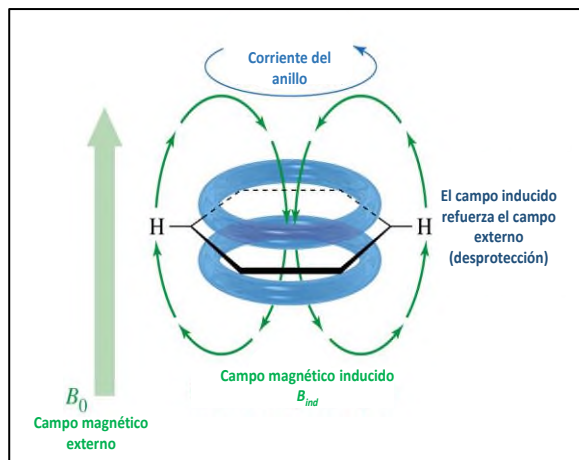


Figura 18. Anisotropía magnética en anillos aromáticos, las líneas de fuerza del campo magnético inducidas por los electrones π deslocalizados circulan en sentido opuesto al campo magnético externo, incrementando y reduciendo la protección en los núcleos vecinos del anillo aromático. (Tomado de <https://orgspectroscopyint.blogspot.com>)⁶⁵

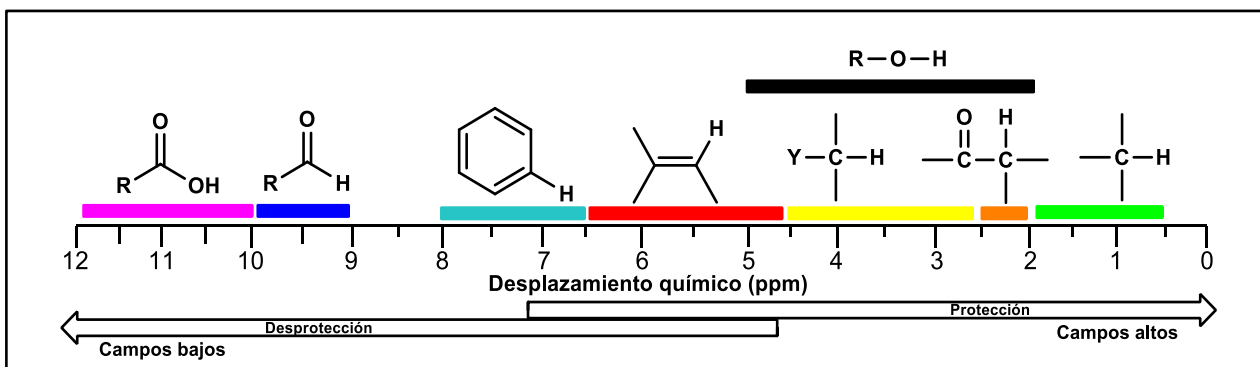


Figura 19. Desplazamientos químicos de protones con diferente ambiente químico. (Tomado de Spectrometric identification of organic compounds)

- c) **Integración**; en espectros de ^1H con más de una señal es posible determinar la proporción de los protones en cada una a través de la medición del área bajo la curva, ya que esta es proporcional al número de protones que genera la señal.
- d) **Multiplicidad**; en RMN un sistema de núcleos químicamente equivalentes se puede observar como una señal simple, doble, triple y hasta múltiple. Lo anterior se debe al acoplamiento espín-espín con los núcleos vecinos a través del enlace químico (acoplamiento indirecto). Si bien las señales pueden ser complejas, existe una regla básica para obtener la multiplicidad del acoplamiento entre los núcleos y está dada por $M = 2nI + 1$; donde I , es el espín del núcleo al que se esté acoplando y n , el número de núcleos vecinos.
- e) **Constante de acoplamiento (J)**; en las señales que se desdoblan, la diferencia en Hz entre los picos que componen la señal se define como constante de acoplamiento (Figura 20). Existe una dependencia directa entre el valor de la constante y el ángulo diedro tal como se observa en la figura 21, además de depender del ángulo diedro el valor de J también depende de la distancia de enlace, a medida que aumenta la distancia, la constante tiende a cero, por lo que es común observar acoplamientos a dos (*geminal*) y tres enlaces (*vecinal*), y si las condiciones geométricas lo permiten es posible observar acoplamientos a cuatro enlaces, tal como el acoplamiento en *meta* en anillos aromáticos (Figura 22).

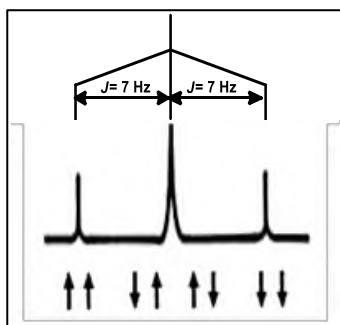


Figura 20. Acoplamiento indirecto espín-espín. La constante de acoplamiento es la diferencia en Hz entre los picos que componen la señal.

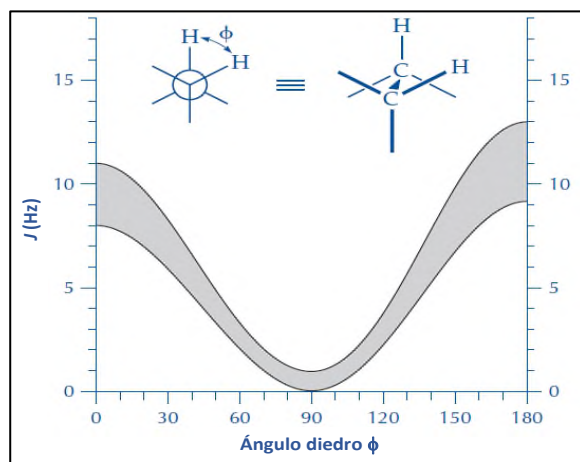


Figura 21. Dependencia de la constante de acoplamiento y el ángulo diedro, relación de Karplus. (Tomado de Techniques in organic chemistry)⁵⁶

Sistema	J (Hz)	Sistema	J (Hz)
	(gem) 6 - 18		4 - 10
	(Vec) Depende del ángulo diedro		(cis o trans) Alílico 0 - 2
	2 - 7		orto : 7 - 10 meta : 2 - 3 para : 0 - 1
	5 - 14		ax - ax: 8 - 10 ax - ec: 2 - 3 ec - ec: 2 - 3
	Libre rotación 7		

Figura 22. Constantes de acoplamiento de sistemas comunes de protones. (Tomado de Spectrometric identification of organic compounds)⁶⁶

4.4 Espectrometría de masas

El análisis de espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) requiere que el analito esté ionizado y en estado gaseoso, lo anterior se logra mediante la interacción entre electrones de alta velocidad o moléculas cargadas con la muestra a analizar, esto implica la destrucción de la muestra. Una vez que se obtienen los iones, se separan de acuerdo a su relación masa/carga (m/z), finalmente pasan al detector para obtener el espectro. La técnica es tan sensible que se requieren cantidades pequeñas de muestra, del orden de μg , y puede tener una alta resolución que proporcione la masa exacta del compuesto.

De acuerdo a las características de la muestra, se puede llevar a cabo la infusión de forma directa o indirecta, para el caso por infusión indirecta la muestra debe pasar por un cromatógrafo ya sea GC o LC.⁶¹

Los compuestos obtenidos en este trabajo se analizaron con un espectrómetro de masas ESI-TOF. A continuación, se describen los componentes del MS ESI-TOF:

- a) **Fuente de ionización;** existen diversos métodos para la ionización de la muestra, la elección del método depende de las características del compuesto a analizar y de la información que se desee obtener. Las fuentes de ionización más utilizadas son la ionización electrónica, ionización química, ionización por desorción láser, ionización térmica y ionización por electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés).

La fuente de ionización utilizada para este trabajo fue ESI, una de las ventajas de este método es que se pueden analizar desde compuestos de baja masa molecular hasta biomoléculas grandes como proteínas, además, abarca un amplio rango de polaridad de las moléculas. En este método la muestra es introducida al espectrómetro en donde se ioniza y después se evapora (Figura 23) para después pasar por el analizador.⁶⁷

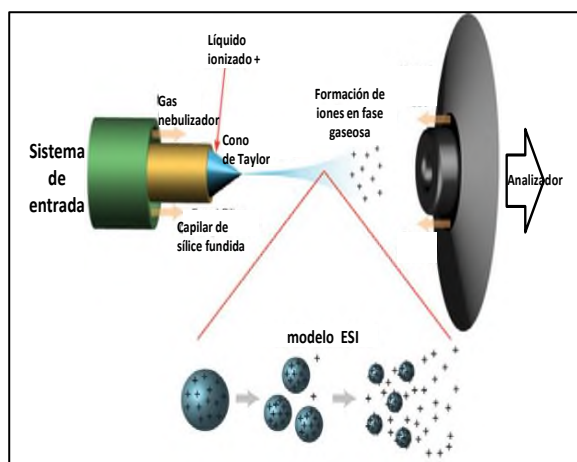


Figura 23. Ionización por electronebulización, el analito disuelto es introducido a un capilar cargado, debido a la repulsión de cargas eléctricas el líquido se sale del capilar y forma pequeñas gotas altamente cargadas (aerosol), conforme el disolvente se evapora la interacción de las moléculas cargadas provoca que las gotas estallen y finalmente los iones se mueven hacia el analizador de masa. (Tomado de <http://www.cbm.uam.es>)⁶⁸

b) **Filtro de masas;** durante la ionización se puede generar una mezcla compleja de iones moleculares (M^{+}) que se deben separar para realizar el análisis correctamente. Una de las herramientas que se utilizan para analizar los M^{+} es el cuadrupolo, este consta de polos o varillas que se encuentran en estricta alineación entre sí, en determinadas condiciones de operación permite el paso de iones de una determinada relación m/z , los demás se neutralizan y eliminan como moléculas sin carga. Variando las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores en relación de m/z transmitidos, haciendo así posible el barrido espectral (Figura 24).⁶¹

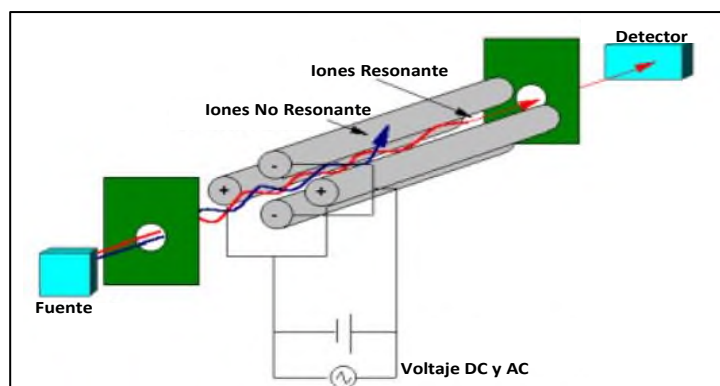


Figura 24. Sistema cuadrupolo, con la variación de las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores m/z transmitidas haciendo posible el barrido espectral, además es posible la eliminación selectiva de iones. (Tomado de <http://ramontxrf.260mb.net>)⁶⁹

- c) **Analizador de masas**; El tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) es utilizado como un detector debido a la conexión matemática entre los movimientos físicos de los iones y sus valores de m/z , ya que los iones que reciben la misma energía inicial tendrán velocidades que son proporcionales a sus valores de m/z , esto aumenta la eficiencia al obtener el ion molecular de una determinada molécula.

Si bien, es importante conocer la masa exacta del analito, esto no define su estructura química, los isómeros presentan la misma relación m/z . Una herramienta adicional de la MS, es el uso de la espectrometría de masas tándem (MS/MS), en ella la ionización es seguida de la fragmentación del $M^{+\bullet}$, los iones fragmentados son característicos de la estructura. Los iones productos formados a menudo sufren una fragmentación característica adicional antes de abandonar la fuente de iones. Esta es la razón por la que la espectrometría de masas, especialmente cuando se combina con técnicas de separación tales como GC o LC, es una forma altamente específica para identificar compuestos orgánicos. Cuando se cuenta con una muestra previamente aislada y purificada, se puede realizar infusión directa al espectrómetro de masas.⁶¹

4.5 Espectrofotometría de UV-Vis.

Una de las técnicas espectroscópicas que más se utiliza es la espectrofotometría UV-Vis. La energía asociada a estas regiones del espectro electromagnético excita a los electrones de valencia a un nivel energético mayor. La región del ultravioleta (UV) usada en el análisis de las muestras abarca de 200 a 380 nm (UV al cuarzo) y la región visible (Vis) va de 380 a 780 nm (región detectable para el ojo humano).

Para el análisis por UV-Vis la radiación emitida por la fuente pasa al monocromador donde se seleccionan las frecuencias que serán incididas en forma de barrido a la solución. La luz incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I_1 por la muestra, esta fracción de radiación que ha logrado traspasar se denomina transmitancia ($T=I_1/I_0$), sin embargo, en los espectros de UV-Vis los resultados se expresan en valores de absorbancia (Figura 25). La absorbancia (A) es directamente proporcional a la concentración (C) y a la longitud (l) de la celda como lo expresa la ley Lambert-Beer

(Ecuación 3) y la intensidad de la absorción se expresa generalmente en términos de absorbancia molar o coeficiente de extinción molar (ϵ).

$$A = \epsilon C l \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

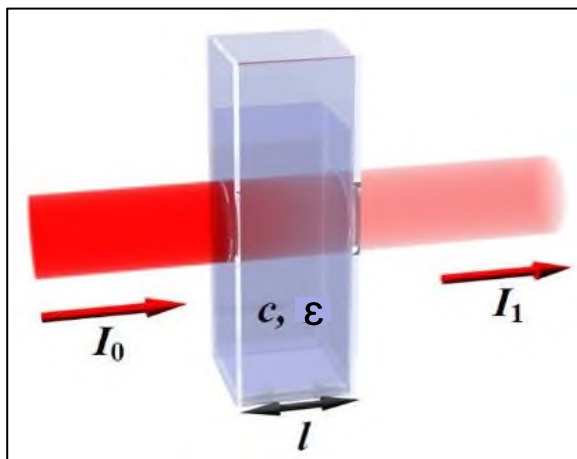


Figura 25. Representación de la ley de Lambert-Beer, relaciona la intensidad de luz entrante (I_0), en un medio con intensidad saliente (I_1) después de que en dicho medio se produce la absorción. Hay una relación directa de la absorción de la luz con la concentración (C), el coeficiente de absorción (ϵ) y la longitud de la celda (l) (Tomado de <http://www.edym.net>)⁷⁰

Cuando se incide radiación electromagnética en el rango de UV-Vis a compuestos orgánicos, ocurren transiciones electrónicas producidas por la excitación de un electrón en el orbital molecular ocupado de más energía (HOMO, por sus siglas en inglés) al orbital molecular no ocupado de más baja energía (LUMO, por sus siglas en inglés, figura 26). Las transiciones electrónicas que se llevan a cabo son de $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ y de $n \rightarrow \sigma^*$, sin embargo, estas transiciones son de poca utilidad ya que absorben en el UV al vacío ($\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$) o son transiciones prohibidas ($n \rightarrow \pi^*$ y de $n \rightarrow \sigma^*$). Las regiones útiles de absorción de moléculas orgánicas son el UV al cuarzo y visible, debido a que en este rango absorben los cromóforos con ciertas características estructurales, por ejemplo: dobles enlaces conjugados, doble enlace conjugado a un par de electrones no enlazantes en un heteroátomo, sistemas aromáticos o grupos carbonilos conjugados.⁷¹

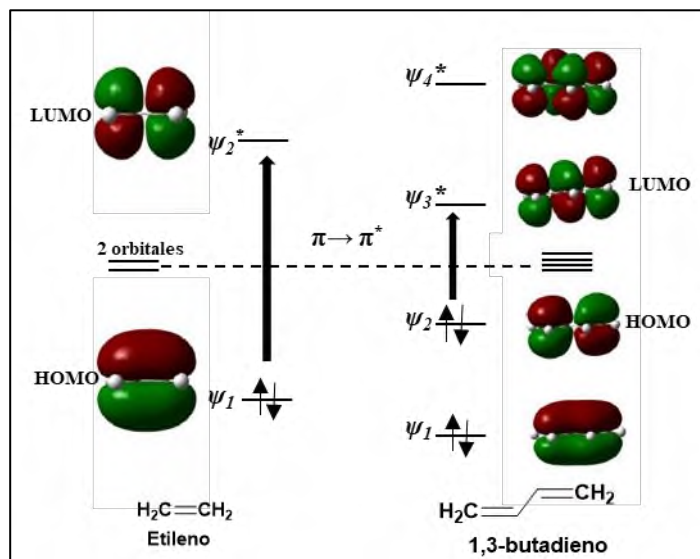


Figura 26. Transiciones electrónicas, los sistemas conjugados absorben a mayores longitudes de onda que los no conjugados. A medida que la conjugación aumenta decrece la diferencia energética entre el HOMO y LUMO y la radiación necesaria para producir la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ aumenta su longitud de onda. (Tomado de Química orgánica)⁷²

4.6 Espectrofotometría de infrarrojo.

En la elucidación estructural de moléculas orgánicas es necesario el uso de técnicas complementarias, una de ellas es la espectroscopia de infrarrojo (IR), siendo esta tan versátil que permite el análisis de muestras líquidas, en disolución, pastas, polvos, películas, fibras y gases.

En esta técnica se incide radiación infrarroja a la muestra, la energía absorbida provoca vibraciones entre los átomos que conforman a la molécula, diferentes grupos de átomos tendrán frecuencias específicas de vibración al absorber la luz IR. Existen dos modos básicos de vibraciones, las que modifican la longitud de enlace (tensión), y las que modifican el ángulo de enlace (flexión). El número de vibraciones en una molécula estará definido por sus grados de libertad, en moléculas poliatómicas este número es de $3N-6$ ($3N-5$ en moléculas lineales).⁷³

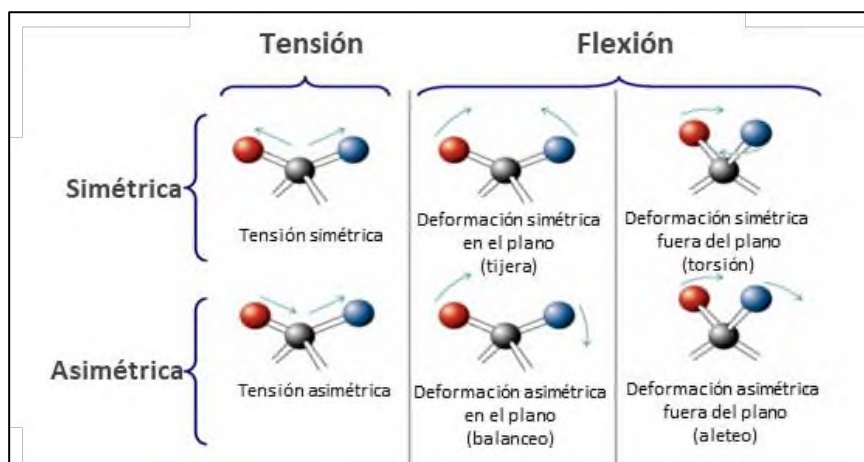


Figura 27. Vibraciones fundamentales simétrica y asimétricas entre átomos que conforman una molécula, provocada por la absorción de energía infrarroja. (Tomado de <https://slideplayer.es>)⁷⁴

Para que la vibración de una molécula presente absorción en el espectro de IR, el momento dipolar de la molécula debe cambiar durante este proceso. Esta es la regla principal de selección para espectroscopia IR, entre mayor sea el momento dipolar, la banda de absorción será más intensa. En moléculas que tengan un plano de simetría interno, la vibración de tensión entre los átomos centrales no presentará banda de absorción ya que su momento dipolar permanece igual sin importar el tipo de enlace (Figura 28).

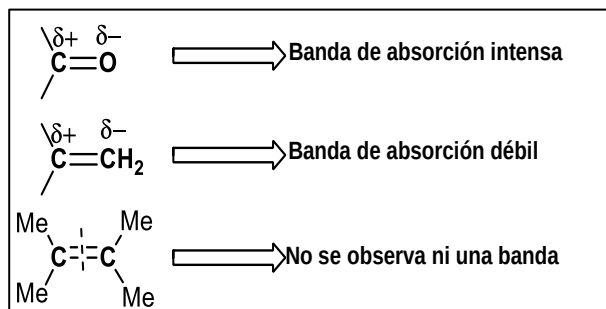


Figura 28. Las vibraciones entre átomos provocan cambios en el momento dipolar, la intensidad de una banda depende de la diferencia del momento dipolar.

La excitación vibracional de dos átomos (A y B) unidos por un enlace puede explicarse comparándolos con dos masas unidas por un resorte que se comprime y se extiende a una frecuencia. En este modelo, la frecuencia de la vibración depende de la fuerza del enlace entre ellos y de sus masas atómicas, cuanto más fuertes o rígidos son los enlaces químicos mayores son las frecuencias observadas, las masas atómicas menores tienden a originar frecuencias mayores. De hecho, puede verse que está

gobernada por la ley de Hooke (Ecuación 4); donde $\tilde{\nu}$ es el número de onda, K es la constante de fuerza y μ es la masa reducida ($\mu = m_1 \cdot m_2 / m_1 + m_2$).

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \dots \text{Ec. 4}$$

Cabe señalar que en los espectros de IR las frecuencias de vibración se expresan en número de onda ($\tilde{\nu}$, inverso de longitud de onda). La región del IR se divide en tres regiones, IR cercano (13 000-4000 cm^{-1}), IR medio (4000-400 cm^{-1}) e IR lejano ($<400 \text{ cm}^{-1}$), siendo el IR medio la zona más utilizada en la caracterización estructural, en el IR medio existen dos zonas, la región de los grupos funcionales (4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1}) y la región dactilar (1300 cm^{-1} a 670 cm^{-1}). La posición de la banda de absorción de los grupos funcionales depende solamente del grupo funcional y no de la estructura molecular completa, en tanto que las bandas en la región dactilar son dependientes de la estructura molecular completa. Debido a las numerosas e interactivas vibraciones de una molécula orgánica, bajo las mismas condiciones, no se conocen dos compuestos diferentes que tengan espectros de IR idénticos (Figura 29).⁶⁵

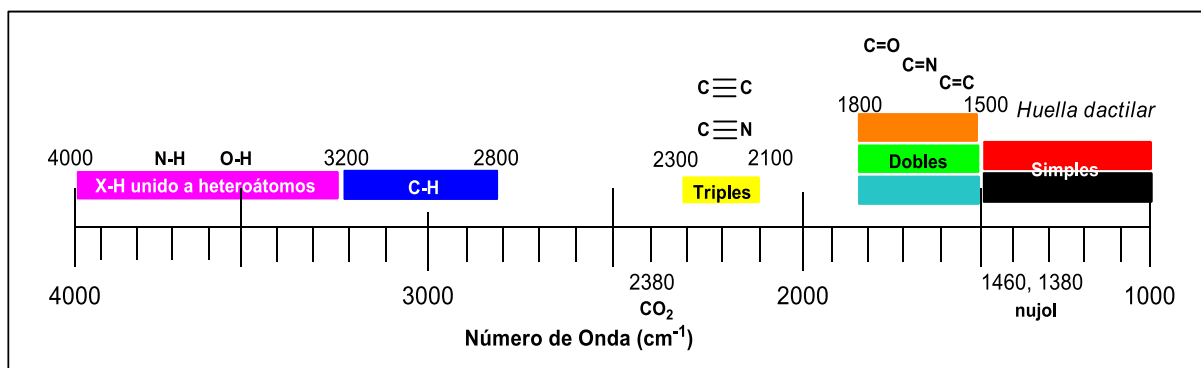


Figura 29. Posición de bandas de absorción para algunos grupos funcionales en la región del IR medio. (Tomado de <https://orgspectroscopyint.blogspot.com>)⁷⁵

Con la introducción de la transformada de Fourier a la espectroscopia infrarrojo (FTIR) ha mejorado significativamente la calidad de los espectros y se ha reducido al mínimo el tiempo requerido para obtener los datos.

Existen diferentes accesorios para el análisis de muestras dependiendo de sus características físicas. En muestras sólidas se prefiere el uso de un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) debido a que no se requiere de una preparación de la muestra. En la práctica, la muestra se coloca en contacto

íntimo con un cristal denso y altamente refractivo. El haz infrarrojo pasa a través del cristal ATR cubierto en la parte superior por la muestra, la onda evanescente penetra en la muestra y es absorbida. El polarizador genera un haz incidente polarizado paralelo y perpendicular, la intensidad se verá atenuada por la muestra en las regiones del espectro de IR donde la muestra absorbe (Figura 30).

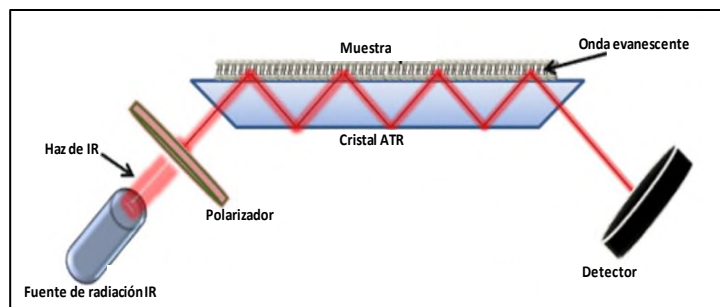


Figura 30. Esquema de una celda de ATR, el haz IR pasa a través del cristal ATR donde la onda evanescente penetra y es absorbida por la muestra, la intensidad se ve atenuada en las regiones del espectro donde la muestra absorbe. (Tomado de Attenuated total reflectance infrared spectroscopy)⁷⁶

Con lo que respecta al uso del IR como herramienta de elucidación estructural, los espectros dan información valiosa sobre las bandas de absorción característica para los grupos funcionales presentes en la molécula y combinando los datos del espectro de IR con información de otras técnicas, como la espectroscopia de RMN, espectrometría de masas y espectrofotometría de UV-Vis se puede proponer la estructura molecular de un compuesto orgánico con un alto grado de certidumbre.

5. JUSTIFICACIÓN

Las condiciones climáticas, geográficas y culturales hacen de Oaxaca el estado con mayor biodiversidad comparado con el resto del país, esto favorece que la medicina tradicional esté ampliamente arraigada entre sus comunidades, sin embargo, el conocimiento que se tiene sobre las propiedades de las plantas es, sobre todo, empírica y limitada a pocas personas. Actualmente, diferentes grupos de investigación realizan trabajos dirigidos hacia la identificación de los metabolitos secundarios presentes en las especies usadas para el tratamiento de enfermedades, y de esta manera contribuir al conocimiento que tienen las personas de la región en el manejo de las plantas con propiedades medicinales. A nivel global, la OMS está generando una serie de estrategias en la medicina tradicional y complementaria con el fin de promover y regular su uso, debido a que la población cada vez está recurriendo más a los productos naturales para tratar enfermedades.

Este trabajo pretende contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en *Indigofera suffruticosa*, planta que se usa en la medicina tradicional de la región, empleada para tratar el estreñimiento, heridas, llagas, sarna, caspa, y los estudios recientes han demostrado que tiene una importante actividad antiepiléptica. Sin embargo, existe poca información sobre los compuestos que le confieren estas propiedades, de aquí la importancia de aislar e identificar estructuralmente a los metabolitos secundarios presentes en la planta, paralelamente, se realizaran pruebas de actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos de la planta.

6. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de las hojas de *Indigofera suffruticosa* presentará actividad antioxidante y antimicrobiana similares a los descritos en plantas del género *Indigofera*, además, el fraccionamiento por extracción líquido-líquido con disolventes de polaridad ascendente permitirá la identificación de los metabolitos presentes y establecer las fracciones que presenten la actividad antioxidante.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general.

Determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Indigofera suffruticosa* y realizar la elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones del extracto crudo.

7.2 Objetivos específicos.

- Determinar la actividad antioxidante del extracto crudo y de las fracciones obtenidas de las extracciones líquido-líquido.
- Determinar la actividad antimicrobiana del extracto crudo.
- Realizar la separación cromatográfica y la elucidación estructural de los metabolitos aislados en las fracciones obtenidas.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Materiales y equipos utilizados.

- Para la obtención del extracto de las hojas de *I. suffruticosa* se utilizó un baño ultrasónico marca Branson 1510-mth de 45 KHz.
- Para las cromatografías en placa fina se utilizaron como fase estacionaria placas de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor, ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 de Macherey-Nagel y para la fase móvil mezclas de disolventes de diferente polaridad como hexano/AcOEt y CH₂Cl₂/MeOH.
- Para el revelado de las placas cromatográficas se utilizó una lámpara UVG-11 de 254 nm y 365 nm y por calcinación previo tratamiento de H₂SO₄ al 50%. Se utilizó también revelado con vainillina y KMnO₄ con calentamiento suave.
- En la cromatografía en columna se utilizó como fase estacionaria gel de sílice de 230-400 mallas, Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, y como fase móvil mezcla de disolventes (hexano/AcOEt y CH₂Cl₂/MeOH).
- El análisis por espectrofotometría UV-Vis se llevó a cabo en un espectrofotómetro ultravioleta visible de doble haz modelo LAMBDA 2S 1600-00BB con software UV WINLAB marca Perkin Elmer.
- Para el análisis estructural de los compuestos aislados se utilizó un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear VARIAN 400MR, de 400 MHz; se utilizaron disolventes deuterados (CDCl₃ y DMSO-*d*₆) y TMS como referencia interna. Los FIDs obtenidos fueron procesados utilizando el programa MestReNova-9.0.1.
- Los compuestos aislados se analizaron por infusión directa utilizando un espectrómetro de masas tandem SYNAPT G2-Si de Waters de alta resolución equipado con fuente de ionización por electronebulización, filtro de masas de cuadrupolo sencillo, celda de colisiones CID y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF). Las muestras se prepararon a una concentración final de 1 µg/mL, utilizando ácido fórmico al 1% (v/v) en MeOH grado LC-MS. Las condiciones de operación fueron: 10 µL/min, ESI en modo positivo y negativo, voltaje de capilar de 3000 V, temperatura de capilar de 120°C, voltaje cono 40, temperatura de desolvatación de 200°C, flujo de gas de desolvatación de 800 L/h. La corrección de los datos espectrales se llevó a cabo infundiendo continuamente el compuesto de

referencia Leucina Encefalina (556.2771 m/z). El análisis de los espectros se realizó con el programa MassLynx (Waters).

- Se complementó la elucidación de cada compuesto con un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro Dynascan Perkin Elmer Spectrum 100 equipado con el accesorio universal ATR.
- Los disolventes utilizados en la extracción y en las cromatografías fueron de grado técnico previa destilación simple. Los disolventes deuterados fueron adquiridos en Sigma Aldrich.

8.2 Metodología.

En la Figura 31 se describe de manera general el proceso utilizado en el desarrollo del proyecto.

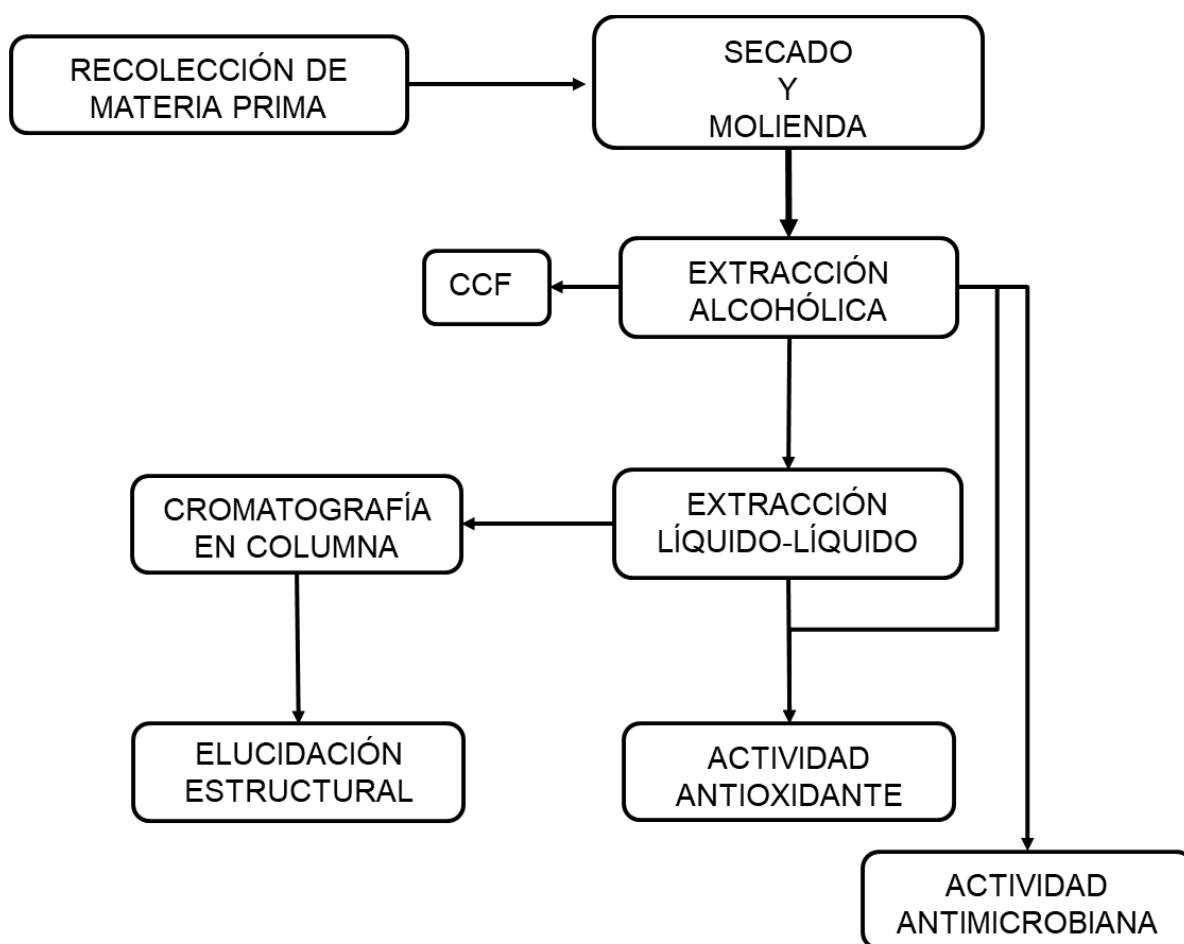


Figura 31. Diagrama de trabajo empleado en la elaboración del proyecto.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Recolección de la planta.

La recolección de la planta *I. suffruticosa* (añil) se realizó en la comunidad General Felipe Ángeles, ubicada en el municipio de San Juan Mazatlán del estado de Oaxaca, en las coordenadas 17.343333 de latitud y -95.318333 de longitud a una altura de 60 msnm y a una distancia de 130 km de San Juan Bautista Tuxtepec.

El material vegetal se recolectó en las instalaciones del CBTa No. 251, en esta institución el Ing. Pedro Guerra ha desarrollado desde hace 20 años el cultivo y comercialización de las hojas secas para el tratamiento de diferentes enfermedades y malestares que incluyen insomnio, Parkinson, epilepsia y migraña. Dicho producto lo comercializan en sobres para preparar infusiones (Figura 32) y cápsulas.

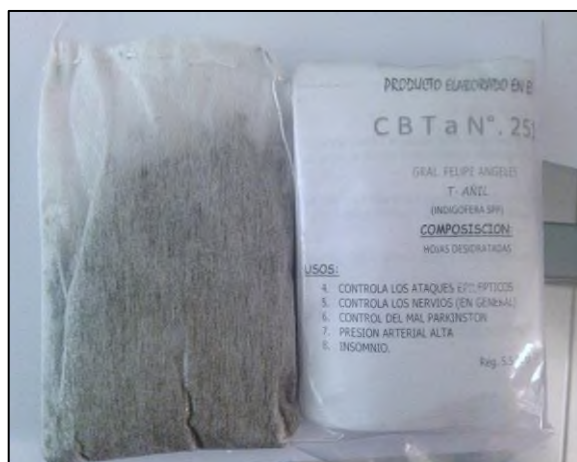


Figura 32. Presentación de los sobres con hojas de añil que se comercializa en la comunidad General Felipe Ángeles, presentación de 15 g.

La recolecta se realizó en abril del 2017, la selección de las plantas se llevó a cabo con la asesoría del Ingeniero Pedro Guerra, se verificó que las plantas no tuvieran plagas ni hojas marchitas, se cortaron las ramas dejando los tallos de aproximadamente 20 cm para su posterior crecimiento, se eliminaron los residuos de tierra y posteriormente se envolvieron en papel periódico. El material vegetal se trasladó a las instalaciones de la UNPA para el proceso de secado con aire forzado.

9.2 Secado y molienda.

El proceso de secado se realizó con aire forzado durante una semana, en este tiempo se mantuvo bajo monitoreo y no se observó descomposición biótica. Una vez que el material vegetal se secó, se desprendieron las hojas y se trituyó, se obtuvo un total de 395 g de hojas pulverizadas las cuales fueron almacenadas en bolsas plásticas para su posterior extracción (Figura 33).



Figura 33. Hojas de *I. suffruticosa* después de la molienda para mejorar el proceso de extracción, se obtuvo un total de 395 g.

9.3 Extracción etanólica asistida por ultrasonido (EEAU).

Diversos trabajos analizan dos técnicas de extracción: maceración y EAU describiendo un mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor actividad antioxidante en el extracto obtenido por ultrasonido.^{77,78}

Considerando lo anterior, en este trabajo se realizó una extracción etanólica asistida por ultrasonido. Para ello se colocaron 90 g de material vegetal seco en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se adicionaron 200 mL de EtOH, se colocó en un baño ultrasónico por 30 min (con intervalos de 10 min), una vez transcurrido este tiempo, el material vegetal se filtró al vacío y se repitió la operación utilizando 200 mL de EtOH. Se juntaron los extractos alcohólicos y se llevaron a sequedad en un rotavapor. Se obtuvo un rendimiento de 23% con respecto al material seco.

9.4 Extracción líquido-líquido.

La extracción es una técnica utilizada para separar selectivamente un compuesto de una mezcla. Por ejemplo, un compuesto orgánico relativamente insoluble en agua puede separarse de una mezcla acuosa extrayéndolo con un disolvente orgánico insoluble en agua.⁷⁹

Para el proceso de extracción líquido-líquido se seleccionaron diferentes disolventes con base a sus propiedades y a sus diferencias en polaridad (Tabla 4).

Tabla 4. Disolventes utilizados para la extracción líquido-líquido.

Disolvente	Punto de ebullición °C	Constante dieléctrica (ϵ) (25°C)	Densidad (ρ) g/mL
Hexano	69.0	1.89	0.65
CHCl₃	61.2	4.80	1.49
AcOEt	77.1	6.02	0.9
<i>n</i>-BuOH	117.7	17.50	0.8
Agua	100.0	81.00	1.0

(Tomado de techniques in organic chemistry)

Para la extracción líquido-líquido se utilizó la siguiente metodología: el extracto crudo se resuspendió en 100 mL de agua y se colocó en un embudo de separación de 500 mL, se le agregaron 100 mL de disolvente orgánico, posteriormente la mezcla se agitó y se dejó en reposo para que se separaran las fases, la fase orgánica se recolectó en un matraz Erlenmeyer y a la fase acuosa se le realizaron dos extracciones más con la misma cantidad de disolvente, finalmente se juntaron las fases orgánicas y se llevaron a sequedad en un rotavapor.

De la misma manera, la fase acuosa se sometió a biparticiones con los disolventes CHCl₃, AcOEt y *n*-BuOH (3 X 100 mL). Cada una de las fracciones fue concentrada en un rotavapor por separado y se calculó el rendimiento en porcentaje de m/m (Figura 34).

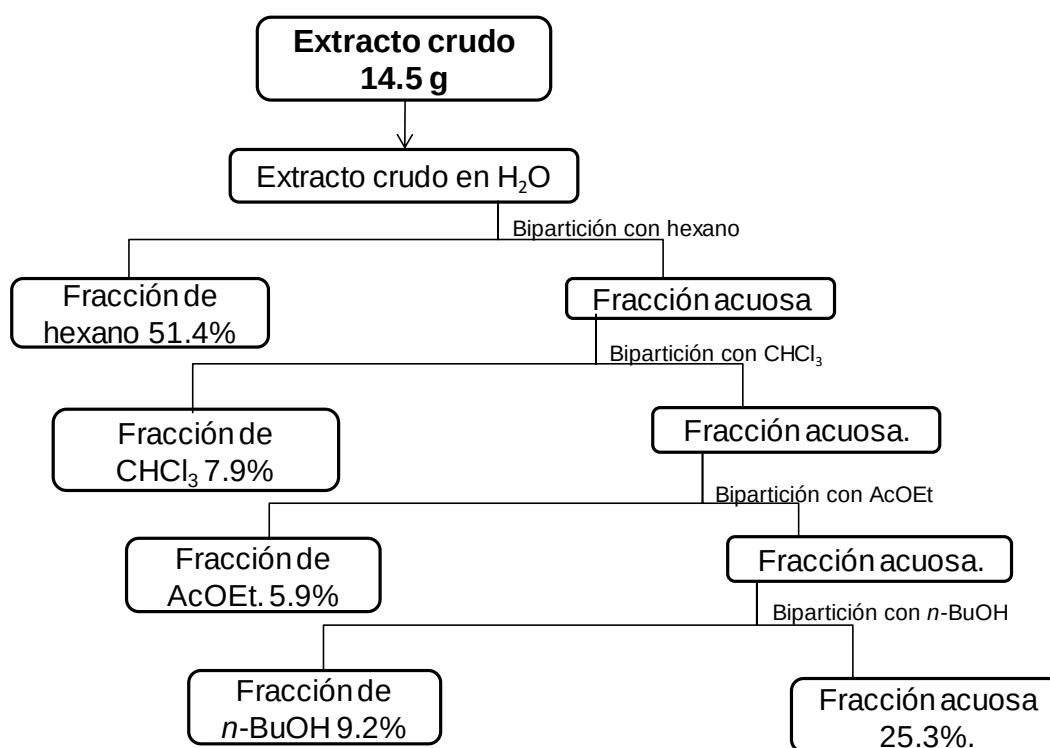


Figura 34. Diagrama del proceso de extracción líquido-líquido, se muestra el rendimiento en porcentaje para para cada una de las fracciones orgánicas y de la fracción acuosa.

9.5 Pruebas de actividad antioxidante y antimicrobiana.

Una vez realizada la EEAU y la extracción líquido-líquido con cada disolvente, la siguiente etapa consistió en la evaluación antimicrobiana del extracto crudo y la evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo y de las fracciones obtenidas. Para llevar a cabo las evaluaciones, el extracto crudo y las fracciones de hexano, CHCl_3 , AcOEt, n -BuOH y la fracción acuosa se mantuvieron en refrigeración. Se utilizó Tween 80® al 1% como disolvente para todos los casos y se realizó el análisis estadístico en Minitab Statistical Software con un nivel de confianza de 95%.

9.5.1 Actividad antioxidante del EEAU y de las fracciones de *I. suffruticosa*.

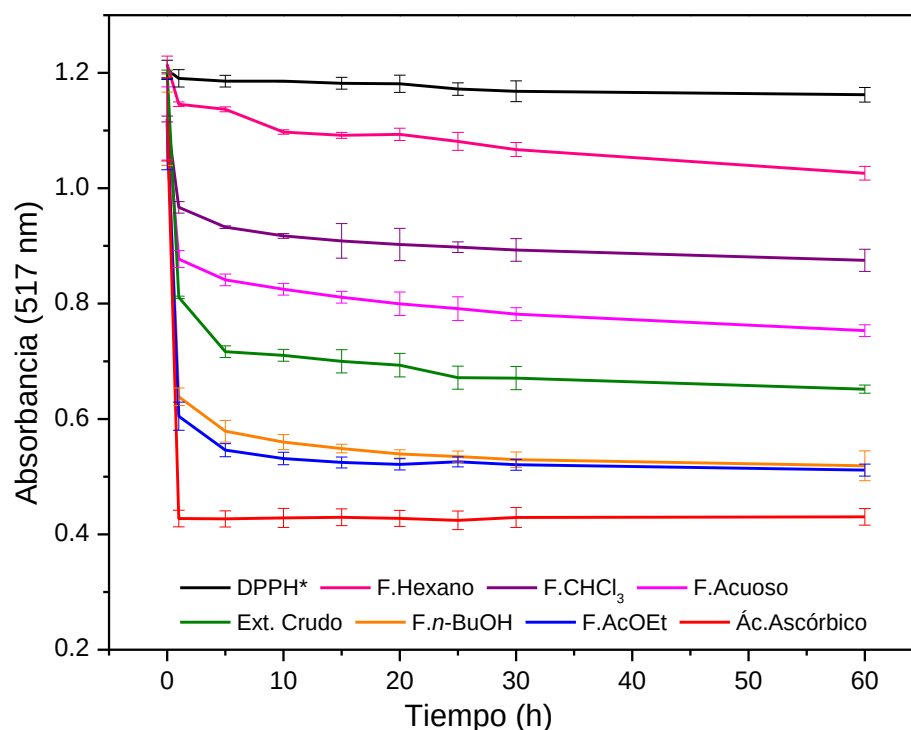
Ensayo del radical DPPH.

Se determinó según el método de Brand-Williams⁸⁰ y modificado de acuerdo a Guerra-Ramírez *et al.*, 2009 quienes propusieron disminuir el volumen utilizado de 4 a 1 mL y el tiempo de espera para las lecturas.⁸¹

Se preparó el stock del DPPH• en MeOH destilado y para la solución de trabajo se diluyó hasta tener una absorbancia de 1.3 medido con un espectrofotómetro a 517 nm.

El ensayo se realizó de dos formas; de forma cualitativa y se hizo en función del tiempo para observar el comportamiento del extracto crudo y de las diferentes fracciones (hexano, CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH y acuoso) y de forma cuantitativa para obtener los valores de IC₅₀.

Para el ensayo en función del tiempo se prepararon las soluciones iniciales del extracto crudo y de las fracciones de hexano, CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH y acuoso a una concentración de 1 mg/mL con Tween 80® al 1%. Para las lecturas se prepararon las muestras con 800 µL de la solución de trabajo y 200 µL de cada una de las muestras. Para el ensayo se realizaron dos réplicas cada una por triplicado y se midió la inhibición del DPPH• a los 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min en un espectrofotómetro a 517 nm, se utilizó ácido ascórbico a una concentración de 0.1 mg/mL como referencia, los resultados se muestran en la gráfica 2.



Gráfica 2. Inhibición del DPPH• por 0.2 mg/mL del extracto crudo y por las fracciones de hexano, CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH y acuosa, utilizando 0.1 mg/mL de ácido ascórbico como referencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos al medir la inhibición del DPPH• en función del tiempo (Gráfica 2) se observa que la capacidad antioxidante (reducción en la absorbancia) de las fracciones *n*-BuOH y AcOEt y del extracto crudo es significativamente mayor que en las fracciones de hexano, CHCl₃ y acuoso, ya que desde el minuto 0 hay una reducción en la absorbancia y conforme el tiempo transcurre la tendencia se hace constante, lo que indica que el DPPH• se mantiene estable durante el tiempo que se incuban las muestras, razón por la cual se realizó una última lectura a los 60 min.

Por otra parte, se midió la inhibición del DPPH• del extracto crudo y de las mismas fracciones preparando cada muestra a diferentes concentraciones (0.125, 0.25, 0.37, 0.5, 0.75 mg/mL), con los valores de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición usando la ecuación 5 para al final obtener los valores de IC₅₀ en cada caso:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{abs del DPPH} - \text{abs de la muestra}}{\text{abs del DPPH}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 5}$$

Una vez graficado los porcentajes de inhibición se obtuvo la ecuación de la recta, mediante la cual se calcularon los valores de IC₅₀, que refleja la cantidad de extracto necesario para reducir en un 50% la concentración inicial del DPPH•. Se realizaron 2 réplicas del ensayo, cada una por triplicado y se utilizó ácido ascórbico como control. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en parámetros de µg de extracto/mL.

Tabla 5. Valores de IC₅₀ obtenidos del extracto crudo y de las fracciones de la extracción líquido-líquido.

Curva estándar	R ²	IC ₅₀ (µg/mL)	% de inhibición máx.
Ac. Ascórbico	0.97	7.88 ± 0.13	74.04 ± 9.9
Muestra			
Ext. Crudo	0.99	104.28 ± 8.2 ^{AB}	69.18 ± 4.9
F. Hexano	-	ND	17.09 ± 0.69
F. CHCl ₃	-	ND	32.65 ± 1.19
F. AcOEt	0.98	108.21 ± 5.37 ^A	66.47 ± 0.94
F. <i>n</i> -BuOH	0.98	97.95 ± 6.99 ^B	64.36 ± 1.90
F. Acuoso	-	ND	26.98 ± 2.53

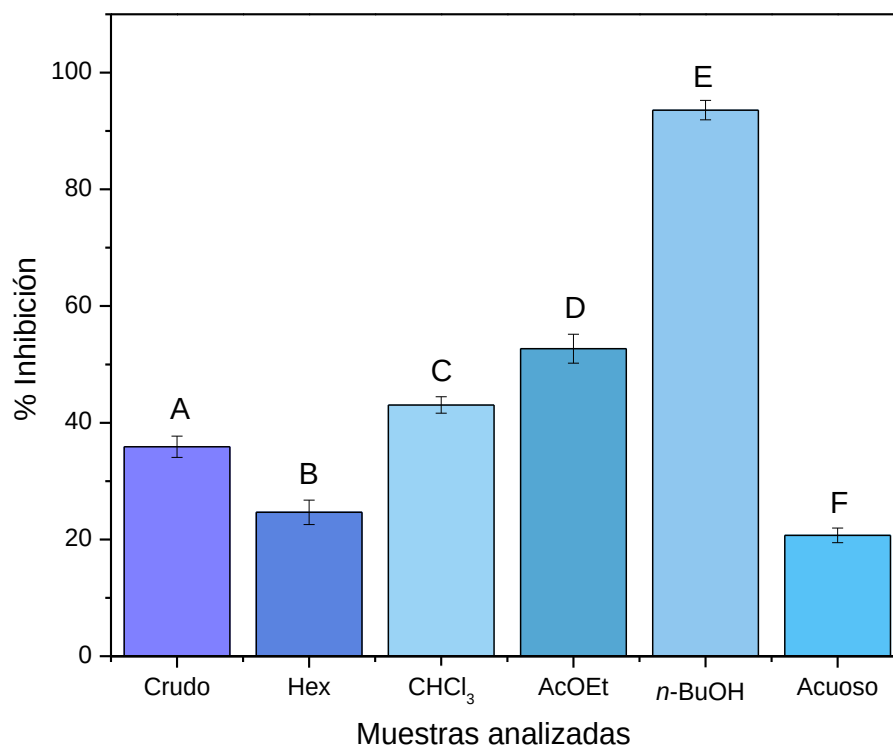
Las medias ± desviación estándar que no comparten una letra son significativamente diferentes. ^Ap ≤ 0.05 B; ^{AB}p ≤ 0.05 A,B; ^Bp ≤ 0.05 A; n=6; **ND**=No determinado.

Al obtener los resultados que se muestran en la tabla 5, se observa que las fracciones de *n*-BuOH, AcOEt y el extracto crudo presentaron significativamente mayor actividad antioxidante con valores de IC₅₀ de 97.95, 108.21 y 104.28 µg/mL respectivamente (el valor de IC₅₀ para el ácido ascórbico fue de 7.88 µg/mL) que las fracciones de hexano, CHCl₃ y acuoso. En cuanto a estas últimas fracciones no se determinaron los valores de IC₅₀ ya que a las concentraciones que fueron evaluadas no llegaron a inhibir el 50% del DPPH•. Todos estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis preliminar mostrados en la gráfica 2.

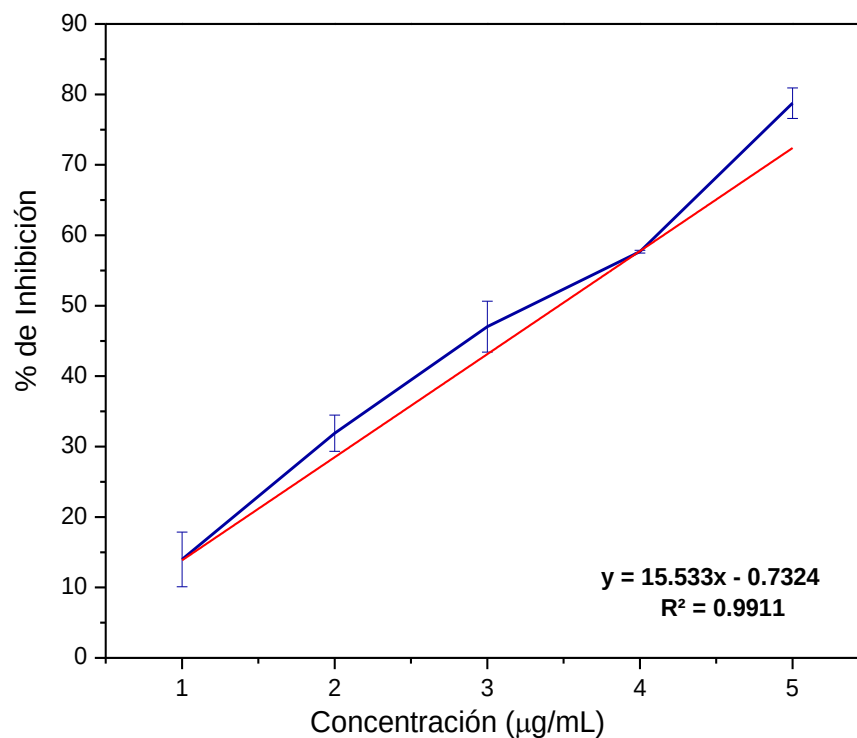
Ensayo del radical catiónico ABTS.

Para medir la actividad antioxidante por el método del ABTS^{•+}, se activó 17 h antes del ensayo de acuerdo a Re *et al.*⁸² Se preparó la solución de trabajo con buffer de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) pH de 7.5, se diluyó la solución previamente activada hasta llegar a una absorbancia de 0.8 ± 0.02 leída a 734 nm. Por otra parte, se preparó el stock inicial del extracto crudo y las fracciones a analizar a una concentración de 2.5 mg/mL, se tomaron 990 µL de la solución de trabajo y se agregó 10 µL de cada una de las muestras y se incubó durante 6 min; las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro a 734 nm. Para este ensayo se realizaron dos réplicas cada una por triplicado del extracto crudo y de las fracciones hexano, CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH y acuoso. Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de inhibición para cada una de las muestras (Ecuación 5) y los resultados se graficaron, se observa en la gráfica 3 que la fracción de *n*-BuOH llega a inhibir el 93.5% del ABTS^{•+} seguido de la fracción de AcOEt con 52.6%, estos resultados concuerdan con lo obtenido en el ensayo de inhibición del DPPH• ya que ambas fracciones fueron las más activas. Por otro lado, se realizó una curva estándar con el ácido ascórbico a concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 µg/mL, (Gráfica 4) para calcular los valores equivalentes de ácido ascórbico (VEAC, ecuación 6) para el extracto crudo y para las fracciones de hexano, CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH y acuoso, los resultados obtenidos se observan en la tabla 6 y se expresan como mg de ácido ascórbico por g de extracto seco.

$$VEAC(x) = \frac{\% \text{ de inhibición} - b}{m} \dots \text{Ec. 6}$$



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición del ABTS•+ por 25 µg/mL del extracto crudo y cada una de las fracciones. Las medias $\pm$ desviación estándar que no comparten una letra son significativamente diferentes; $^{\wedge}p \leq 0.05$ B,C,D,E,F; $n=6$.



Gráfica 4. Inhibición del ABTS•+ por el ácido ascórbico a diferentes concentraciones.

Tabla 6. VEAC obtenidos de la inhibición del ABTS^{•+}.

Extracto/Fracción	VEAC/g extracto seco
E. Crudo	94.28 ± 0.008
F. Hexano	65.38 ± 0.033
F. CHCl ₃	112.72 ± 0.038
F. AcOEt	137.59 ± 0.156
F. <i>n</i> -BuOH	240.55 ± 0.039
F. Acuoso	55.20 ± .0.046

Con base a los resultados obtenidos (Gráfica 3) se observa que la fracción *n*-BuOH es significativamente más potente que el resto de las muestras analizadas, además, se obtuvieron los VEAC (Tabla 6) para cada una de las muestras, y se corrobora que la fracción con mayor potencial antioxidante es la fracción de *n*-BuOH con VEAC de 240.55, seguido de la fracción de AcOEt con VEAC de 137.59 mg/g extracto seco.

Se realizó el análisis estadístico por el método de Tukey y una confianza de 95% donde se confirmó que estadísticamente la fracción *n*-BuOH es significativamente más potente que la fracción de AcOEt, por tanto, se considera a la fracción de *n*-BuOH como la fracción que posee la mayor actividad antioxidante seguido del extracto crudo y la fracción de AcOEt, y que las fracciones de hexano, CHCl₃ y acuoso, no presentan actividad antioxidante significativa a las concentraciones que fueron evaluadas.

Son pocos los estudios de la actividad antioxidante en especies del género *Indigofera*, en uno de ellos se realizó el estudio en el extracto metanólico de *I. cassioides* mediante el ensayo del DPPH[•], como resultado, obtuvieron valores de IC₅₀ de 13.97 µg/mL comparado con el ácido ascórbico (9.03 µg/mL), los autores atribuyen dicho resultado a los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en las hojas de *I. cassioides*.⁸³ Otro estudio realizado en los extractos de hojas de *I. caerulea* obtenidos con éter de petróleo, AcOEt y MeOH, mediante el ensayo del DPPH[•], obtuvieron valores de IC₅₀ de 140 µg/mL de la fracción de éter y 52.5 µg/mL en la fracción de MeOH, sin embargo, en la fracción de AcOEt se obtuvieron valores de IC₅₀ por arriba de 1000 µg/mL, cabe mencionar que en el mismo estudio se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos siendo el extracto metanólico el que mostró mejores resultados.⁸⁴

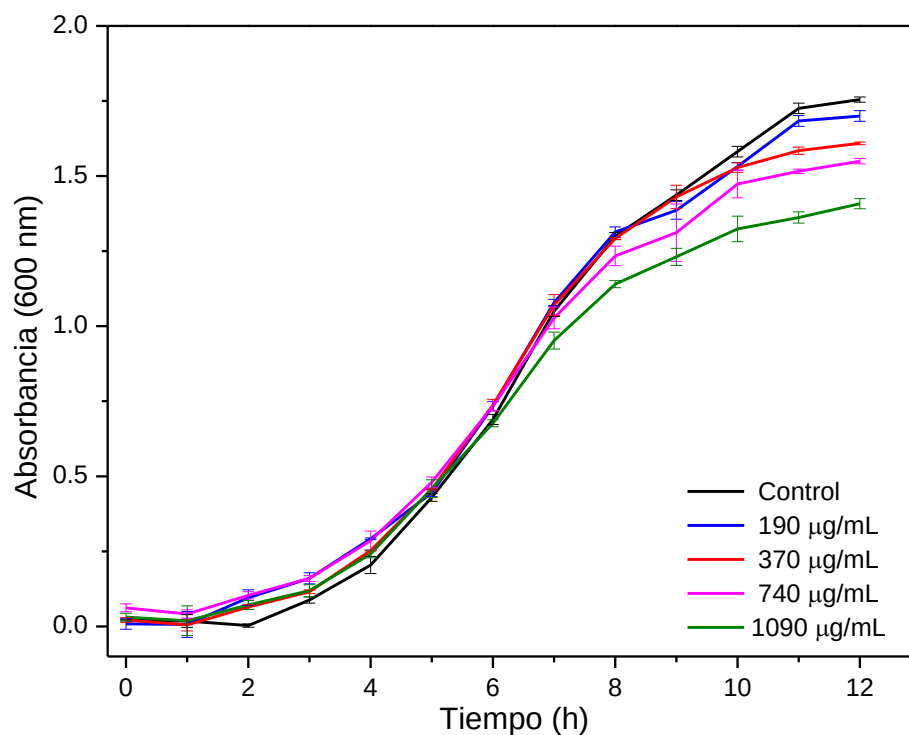
Los valores de IC₅₀ obtenidos en el extracto crudo de las hojas de *I. suffruticosa* (104.28 µg/mL) se encuentran por arriba de los resultados descritos en los estudios mencionados anteriormente, esto debido a que se utilizó un disolvente de menor polaridad y por tanto no se extrajeron todos los compuestos de mayor polaridad, como los compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros, que son los compuestos a los que se le atribuyen la actividad antioxidante.⁸⁵ Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo es posible proponer que el EtOH extrajo la concentración necesaria de flavonoides y polifenoles para inhibir los radicales libres en los ensayos de DPPH• y ABTS•⁺, pero no se obtuvieron las cantidades suficientes de ellos para que fueran aislados e identificados.

9.5.2 Actividad antimicrobiana del extracto crudo de *I. suffruticosa*.

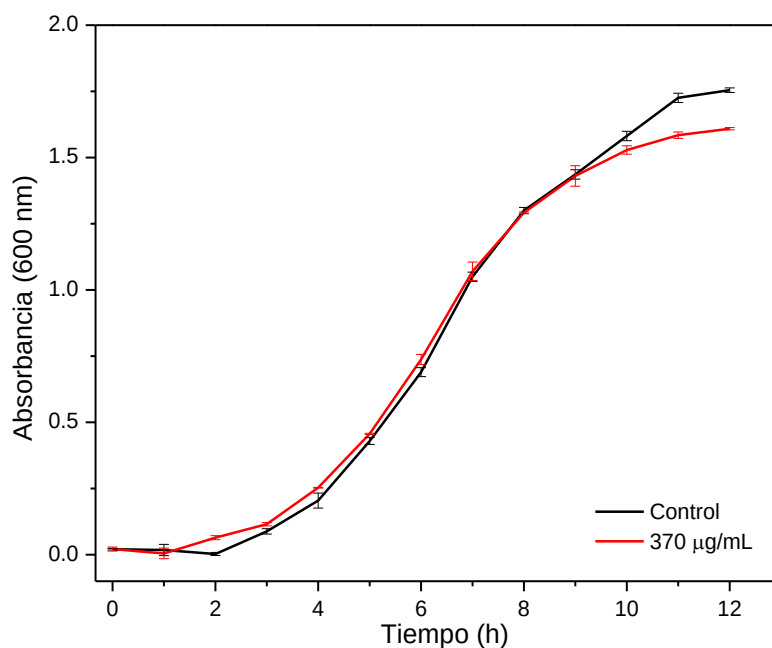
Se realizó la actividad antimicrobiana del extracto crudo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés). Como primera etapa, se reactivó la cepa de *Escherichia coli* mediante inoculación por estriado en medio sólido de agar nutritivo a temperatura de 37 ± 2°C por 24 h. Se tomaron colonias de igual morfología y se emulsionaron en solución salina hasta obtener 0.5 de densidad óptica medido a 600 nm.

Posteriormente se preparó el stock del extracto crudo (20 mg/mL) y se prepararon diluciones a diferentes concentraciones, por otra parte, se colocaron 5 mL de medio Luria Bertani (LB) en tubos Falcon, se agregaron 200 µL del inóculo y 200 µL de las muestras para obtener concentraciones finales de 190, 370, 740, 1090 µg/mL y un blanco. Todas las muestras se incubaron a 37°C con agitación de 120 rpm.

Se realizó la cinética de crecimiento y efecto inhibitorio del extracto crudo sobre el crecimiento de *E. coli* midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm, tomando lecturas cada 60 min (se realizaron dos réplicas cada una por triplicado), los resultados se muestra en la gráfica 5 y con base a ello se realizó el análisis estadístico por el método de Tukey con una confianza de 95%, se observó que en la hora 11 a una concentración de 370 µg/mL, los valores obtenidos con respecto al control presentaron una diferencia significativa, lo que significa que la MIC del extracto crudo es de 370 µg/mL (Gráfica 6).

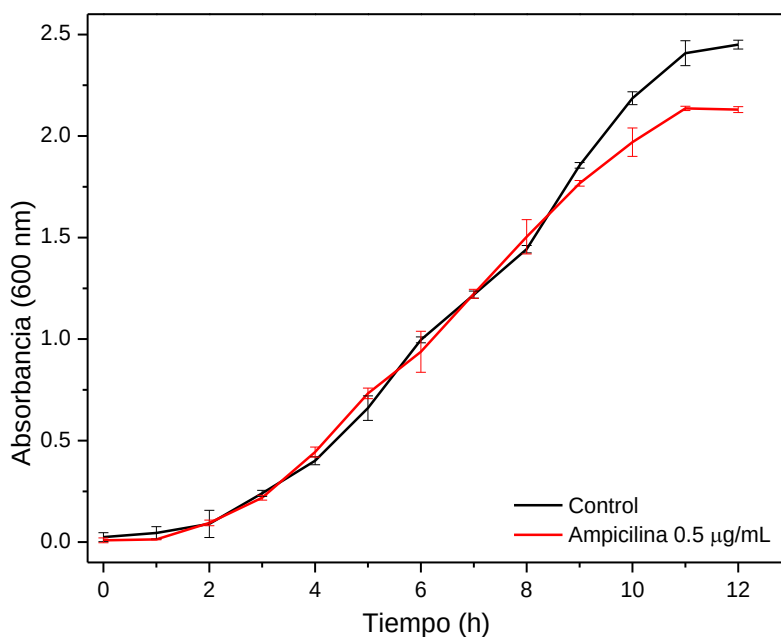


Gráfica 5. Actividad antimicrobiana del extracto crudo sobre el crecimiento de *E. coli*, a una concentración de 190 µg/mL la inhibición es nula comparado con el control, se observa inhibición en el crecimiento de la bacteria a partir de 370 µg/mL del extracto crudo en la hora 10, a una mayor concentración la inhibición de *E. coli* es más evidente.



Gráfica 6. Concentración mínima inhibitoria del extracto crudo (370 µg/mL) en el crecimiento de *E. coli*, con base al análisis estadístico se obtuvo diferencia significativa respecto al control en la hora 11.

Los resultados de inhibición del extracto crudo fueron comparados con un antibiótico (ampicilina) usado como control negativo, para ello se utilizó la misma metodología descrita anteriormente en concentraciones de 0.1, 0.2 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, se realizaron dos réplicas cada una por triplicado. Los resultados fueron tratados estadísticamente y se observó que a la hora 11 los resultados de la ampicilina con respecto al control presentan una diferencia significativa, la MIC fue de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfica 7).



Gráfica 7. Concentración mínima inhibitoria de ampicilina (0.5 $\mu\text{g/mL}$) en el crecimiento de *E. coli*, con base al análisis estadístico se encontró diferencia significativa respecto al control en la hora 11.

Pereira *et al.*, publicaron en 2006 un estudio de la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *I. suffruticosa*, midieron la actividad inhibitoria en varios microorganismos, los resultados muestran actividad contra bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* (MIC=5000 $\mu\text{g/mL}$) y en cepas de dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis* (MIC=2500 $\mu\text{g/mL}$), mientras que los ensayos en bacterias gram negativas como la *E. coli* no mostraron actividad inhibitoria.⁴⁴ A diferencia de lo descrito por Pereira *et al.*, en este trabajo se realizó un extracto etanólico de las hojas de *I. suffruticosa* y el extracto crudo mostró actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *E. coli* (MIC=370 $\mu\text{g/mL}$). Este resultado se debe a que los metabolitos secundarios aislados en EtOH son de naturaleza menos polar que los aislados en un medio acuoso.

Como se mencionó anteriormente se han identificado algunas familias de compuestos en la planta *I. suffruticosa* como flavonoides, alcaloides, cumarinas, triterpenos, flavonas, entre otros, que pueden ser los responsables de la actividad inhibitoria. Aunado a ello, en este trabajo se describe el aislamiento y elucidación estructural de ocho compuestos, de los cuales, los alcaloides triptantrina (**38**) e indican (**3**), presentan actividad antibacterial según los resultados de la revisión bibliográfica.

9.6 Cromatografía en capa fina.

Una vez que se llevaron a cabo las biparticiones con los disolventes de diferente polaridad, se realizaron las CCF de las fracciones obtenidas.

En las fracciones de hexano y CHCl_3 la fase móvil utilizada para las CCF fue un sistema hexano/AcOEt en diferentes proporciones. Mientras que para las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y agua, debido a la polaridad de los compuestos presentes en estas fracciones, se utilizaron sistemas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$.

En la figura 35 se muestran las placas cromatográficas donde se observan los compuestos presentes en cada fracción. Para visualizar los compuestos se usaron los siguientes reveladores: luz visible, lámpara de UV de 365 y 254 nm, KMnO_4 , vainillina y calcinación con H_2SO_4 al 50%. Los compuestos que se observan al visible tienen como característica la presencia de un gran número de insaturaciones conjugadas; cuando se observa un color en la CCF se puede conocer el rango de longitudes de onda a la cual absorbe dicho compuesto, por ejemplo: si se observa de color naranja significa que el compuesto absorbe entre 440 y 470 nm, como es el caso del β -caroteno. Considerando que, a medida que disminuye el número de insaturaciones conjugadas aumenta la energía de absorción de las moléculas, fue necesario el uso de una lámpara de ultravioleta (365 y 254 nm) que permitiera visualizar los compuestos con cromóforos que absorben a esas longitudes de onda. Además, se utilizaron reveladores considerados universales, como la vainillina y el H_2SO_4 que permiten ver un amplio número de compuestos no volátiles; en el caso del KMnO_4 se observan aquellos compuestos que tienen en su estructura grupos que se oxidan, como alcoholes, alquenos, alquinos, entre otros.

Después de que se revelaron las placas cromatográficas se observan alrededor de 15 compuestos, sin embargo, con la información que proporciona la CCF no se pueden proponer estructuras químicas, para ello se requiere de estándares. En este caso, las CCF se utilizaron para conocer el comportamiento de los compuestos en sistemas de diferente polaridad con el fin de establecer las condiciones para la cromatografía en columna.

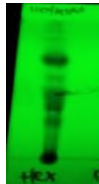
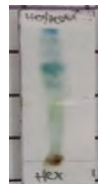
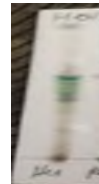
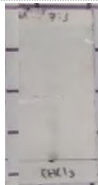
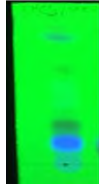
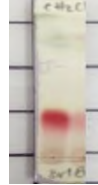
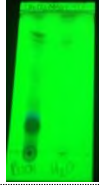
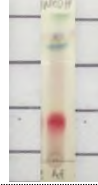
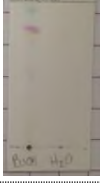
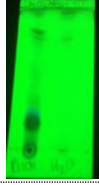
Fracción Sistema de elución	visible	UV 365 nm	UV 254 nm	KMnO₄	Vainillina	H₂SO₄
Hexano (hex/AcOEt 9:1)						
CHCl₃ (hex/AcOEt 7:3)						
AcOEt (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1)						
<i>n</i>-BuOH (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1)						
H₂O (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 7:4)						

Figura 35. CCF de las fracciones obtenidas de la bipartición líquido-líquido del extracto crudo, en sistemas de hexano/AcOEt para las fracciones de hexano y CHCl₃; sistemas de CH₂Cl₂/MeOH para las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y acuoso. Se utilizaron como reveladores lámpara de UV de 365 y 254 nm, KMnO₄, vainillina y H₂SO₄.

9.7 Cromatografía en columna.

De acuerdo al diagrama de trabajo planteado, una vez que se obtuvieron las cinco fracciones del extracto crudo, se procedió a realizar la separación cromatográfica de cada una de ellas. De forma general las CC se realizaron de la siguiente manera:

La selección del tamaño de columna se hizo en función de la cantidad de muestra a separar, en todos los casos la fase estacionaria fue gel de sílice y para la fase móvil se usaron mezclas de disolventes de diferente polaridad. La fracción a purificar se disolvió y se soportó en gel de sílice y se llevó a sequedad en el rotavapor, una vez homogeneizada la mezcla se colocó en la columna previamente empacada y se eluyó con la fase móvil adecuada y se recolectaron fracciones. Se siguió el curso de la cromatografía en columna por CCF y se seleccionaron las fracciones puras para su concentración y posterior elucidación estructural. En la tabla 7 se resumen los compuestos que fueron aislados y/o identificados en las diferentes CC de las fracciones obtenidas por bipartición líquido-líquido.

Tabla 7. Compuestos aislados de las fracciones del extracto etanólico por CC.

Fracciones	Compuestos aislados/identificados
Hexano	β-caroteno β-sitosterol Fitol Índigo Indirubina
CHCl ₃	Índigo Indirubina
AcOEt	Triptantrina Índigo Indirubina Indican Glucósido de ácido antranílico
<i>n</i> -BuOH	Indican Glucósido de ácido antranílico
Acuoso	Indican Glucósido de ácido antranílico

9.7.1 β -caroteno.

Después de realizar la separación por CC de la fracción de hexano, se obtuvo un compuesto que absorbe la luz visible y en CCF presenta un $R_f=0.58$ en un sistema hexano/AcOEt (9:1). Debido a la polaridad de la muestra y principalmente por su color (amarillo-naranja), se consideró la estructura de un compuesto con un sistema altamente conjugado. Por tanto, el compuesto aislado se comparó por CCF con un estándar de β -caroteno comercial (Figura 36a) en el mismo sistema y se observó que presentan el mismo R_f (Figura 36b). Además, en el análisis por espectrofotometría de UV-Vis se observan tres bandas de absorción en 425, 450 y 477 nm (Figura 37a) característicos para lo descrito para el β -caroteno en solución con hexano (Figura 37b).⁸⁶,

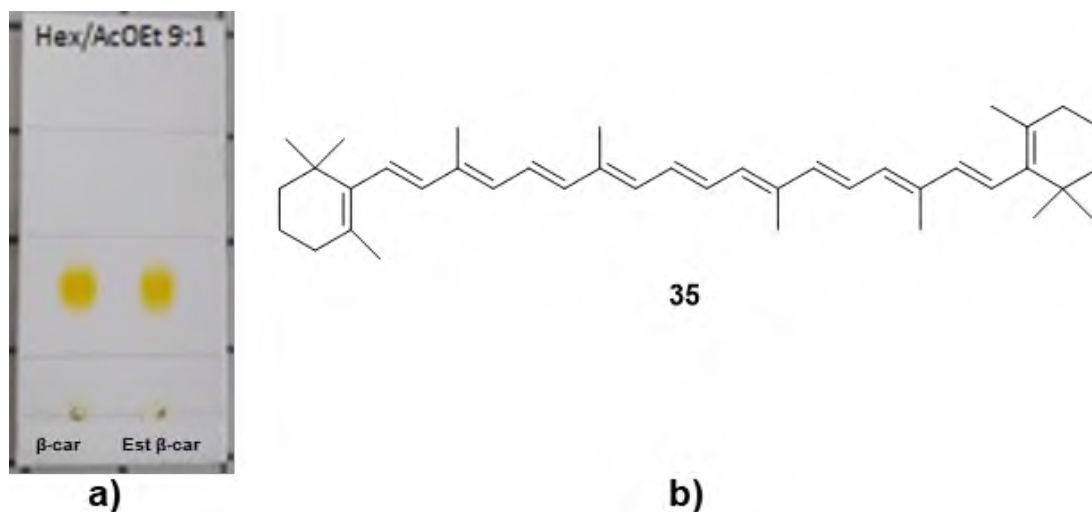


Figura 36. Identificación del compuesto aislado de la fracción de hexano, en un sistema hexano/AcOEt (9:1), se observa en **a)** la CCF del compuesto aislado contra β -caroteno (**35**) comercial y **b)** estructura del compuesto identificado como β -caroteno (**35**).

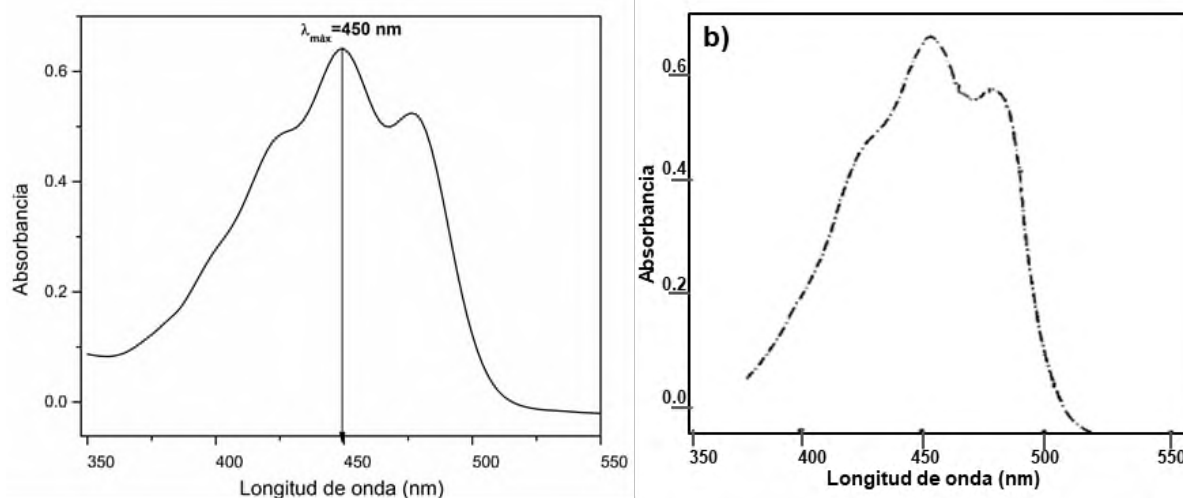


Figura 37. Comparación del **a)** espectro de UV-Vis del β -caroteno (**35**) aislado; en solución con hexano y del **b)** espectro de UV-Vis para el β -caroteno (**35**) descrito en la literatura; en hexano.⁸⁷

En el espectro de RMN de ^1H del β -caroteno (**35**) se distinguen las señales de los protones vinílicos en la región de 6-7 ppm. Debido a la simetría de la molécula (C2) solo se observan las señales de siete protones vinílicos (H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-14 y H-15), mismas señales que coinciden con las descritas en la literatura (Figura 38).⁸²

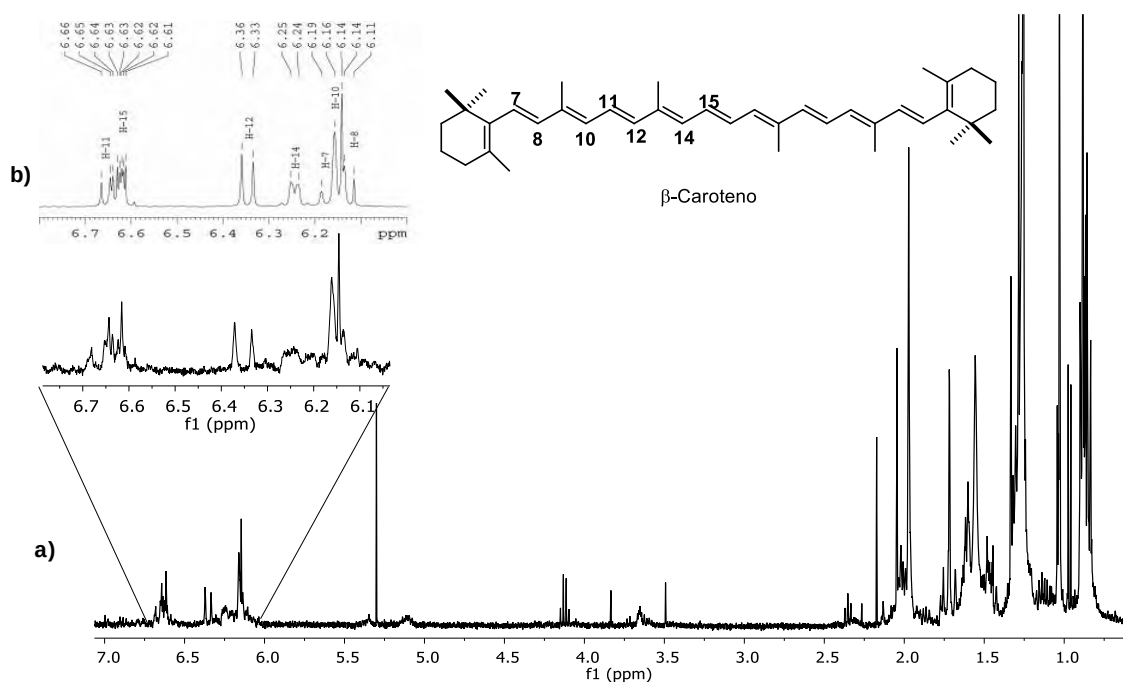


Figura 38. Espectro de ^1H del **a)** β -caroteno (**35**) aislado; RMN de 400 MHz en CDCl_3 , **b)** expansión de los protones vinílicos del β -caroteno (**35**) descrito en la literatura en CDCl_3 .⁸⁸

Si bien el β -caroteno (**35**) es un compuesto bastante recurrente en las plantas debido a que están involucradas en la fotosíntesis, hay un creciente interés sobre esta molécula debido a las propiedades biológicas que exhibe. Es importante conocer sus características físicas, químicas, entre otros, puesto que está presente en una planta que se utiliza en la medicina tradicional y que se mantiene en las hojas después de los procesos de secado y extracción.

El β -caroteno es un tetraterpeno construido a partir de ocho unidades isoprénicas, unidas de tal forma que la secuencia se invierte en el centro. Una característica distintiva, es su extenso sistema de dobles enlaces conjugados, que sirve como el cromóforo absorbente de la luz responsable del color amarillo, naranja o rojo que estos compuestos transmiten a muchos alimentos.⁷⁷

Es conocido como un pigmento natural presente en la mayoría de las frutas y vegetales, plantas, algas y bacterias fotosintéticas. Una de las principales funciones del β -caroteno es ser pro vitamina A. Estructuralmente, la vitamina A (retinol) es esencialmente una mitad de la molécula de β -caroteno (**35**) con una molécula de agua añadida al final de la cadena lateral del polieno. Los carotenoides acíclicos y las xantófilas (en las que los anillos β tienen sustituyentes hidroxilo, epoxi y carbonilo) no son provitaminas A.⁷⁸ Cabe resaltar que los seres humanos no pueden sintetizar carotenoides y deben ingerirlos en los alimentos o mediante la administración de suplementos.

Existe evidencia de que los carotenoides, además de los efectos beneficiosos sobre la salud ocular, también producen mejoras en la función cognitiva, cardiovascular y pueden ayudar a prevenir algunos tipos de cáncer.⁸⁹

9.7.2 β -sitosterol y fitol.

En la fracción de hexano se observó por CCF una mezcla compleja de compuestos, que fue necesario usar varios reveladores para poder distinguirlos. Dada la complejidad de la mezcla se utilizaron dos estándares (β -sitosterol y fitol) de naturaleza no polar que se conocen son comunes en las plantas. En la CCF de las muestras analizadas, en un sistema hexano/AcOEt (8:2) revelada por calcinación previo

tratamiento con H_2SO_4 al 50%, se identificó la presencia de estos compuestos, β -sitosterol con $R_f=0.63$ y fitol con un $R_f=0.45$ (Figura 39).

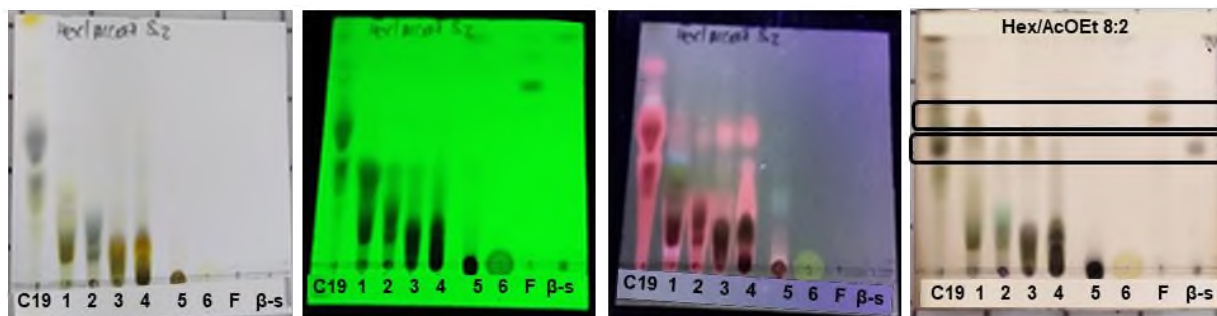


Figura 39. CCF de las fracciones 1-6 usando como referencia: **F** fitol y **β-s** β -sitosterol, en un sistema hexano/AcOEt (8:2), las placas se revelaron a **a)** luz visible, **b)** en lámpara de UV de 254 nm, **c)** UV 365 nm y **d)** H_2SO_4 al 50% y calcinación.

El β -sitosterol (**7**, Figura 40) es el más abundante de los fitoesteroides, pertenece al grupo de esteroides producidos por las plantas.⁹⁰ Existen estudios de que el consumo de β -sitosterol (**7**) disminuye los niveles de colesterol en sangre al evitar su absorción intestinal.⁹¹ También se ha demostrado en ensayos *in vivo* que tiene actividad antiinflamatoria, analgésica, antihelmíntica y antimutagénica.⁹² Además, ensayos clínicos en humanos demostró un efecto significativo en la reducción de los síntomas de hiperplasia prostática benigna.⁹³

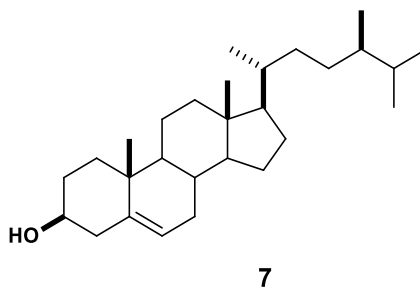


Figura 40. Estructura de β -sitosterol (**7**) identificado en la fracción de hexano.

Se ha especulado que los fitoesteroides inhiben la producción de carcinógenos, el crecimiento de células cancerígenas, la invasión, la metástasis y promueven la apoptosis de células cancerosas. En resumen, la creciente evidencia respalda el papel de los fitoesteroides en la protección contra el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, los fitoesteroides podrían incorporarse a la dieta no solo para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, sino también para prevenir el desarrollo del cáncer.⁹⁴

Por otra parte, el fitol (**36**, Figura 41) abunda en la naturaleza debido a que es parte de la molécula de la clorofila.⁹⁵ Desde el punto de vista farmacológico, el fitol y sus derivados han demostrado tener actividad ser antimicrobiano,⁹⁶ citotóxico, antitumoral, antimutagénico, antitetagénico, antibiótico-quimioterapéutico, antidiabético, reductor de lípidos, antiespasmódico, anticonvulsivo, antinociceptivo, antioxidante, antiproliferativo,⁹⁷ antiinflamatorio, ansiolítico, antidepresivo, inmunoadyuvante y facilitador del crecimiento del cabello.⁹⁸ Por último, estudios *in vivo* en roedores han demostrado una importante actividad anticonvulsiva.⁹⁹

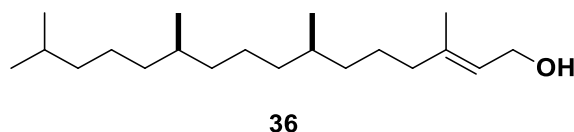


Figura 41. Estructura de fitol (**36**) identificado en la fracción de hexano.

9.7.3 Índigo e indirubina.

Inicialmente de la separación en CC de las fracciones de hexano y CHCl_3 se obtuvieron fracciones que absorben al visible, en CCF se observan dos bandas de color azul y rosa. Después de realizar CC sucesivas para separar estos compuestos, las fracciones puras se llevaron a sequedad, sin embargo, la cantidad de muestra no fue suficiente para realizar el análisis por RMN.

Al realizar una revisión bibliográfica del género *Indigofera* se encontró un estudio sobre la producción del colorante índigo (**1**) por fermentación en dos plantas de diferentes géneros, y concluyen que en dicha fermentación ocurre la formación del colorante añil y de un isómero llamado indirubina (**37**). El análisis de la formación de los dos compuestos se llevó a cabo en cromatografía en capa fina y describen valores de $R_f=0.69$ para el índigo (**1**) y un $R_f=0.49$ para indirubina (**37**) en un sistema hexano/ CHCl_3 /MeOH (7:4:1, figura 42a).¹⁰⁰ Con base a esta información, se usó el mismo sistema para la mezcla de los dos compuestos aislados de las columnas de hexano y CHCl_3 , y se observó que tienen un comportamiento similar en R_f y color a lo descrito previamente (Figura 42b). Con estos resultados se concluyó que dichos compuestos pertenecen al índigo (**1**), compuesto azul e indirubina (**37**), compuesto de color rosa (Figura 42c-d).

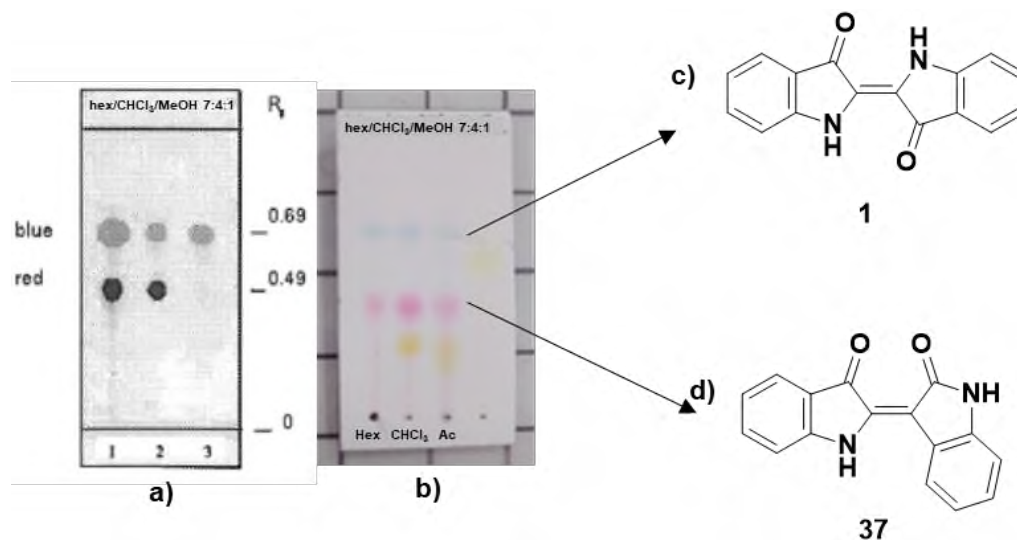


Figura 42. Identificación de los compuestos aislados de la fracción de hexano y CHCl₃, **a)** CCF del análisis realizado sobre la producción del índigo en donde: **1** es la mezcla obtenida de *B. cusia* Brem, **2** la mezcla obtenida de *I. tinctoria* Linn y **3** representa al estándar de índigo, **b)** CCF de los compuestos aislados, **c)** estructura del compuesto identificado como índigo (**1**) y **d)** estructura de indirubina (**37**).

Siguiendo con el análisis de las fracciones aisladas, las muestras se llevaron al espectrofotómetro de UV-Vis, en los espectros obtenidos se observó absorción con una $\lambda_{\text{máx.}}=600$ nm que coincide con lo descrito para el compuesto **1** (Figura 43a,b)¹⁰¹ y $\lambda_{\text{máx.}}=560$ nm que coincide a su vez con lo descrito para el compuesto **37** (Figura 44a,b).¹⁰²

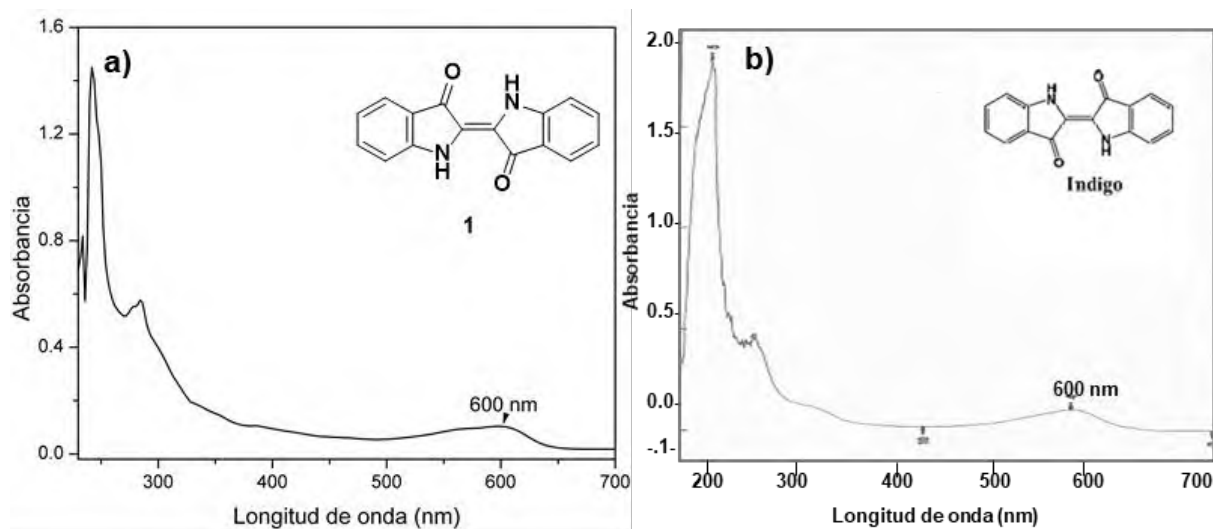


Figura 43. Comparación de los espectros de UV-Vis del compuesto aislado de la fracción de hexano, **a)** espectro del índigo (**1**) aislado; en CHCl₃ y **b)** espectro del índigo (**1**) descrito en la literatura; en CHCl₃.¹⁰¹

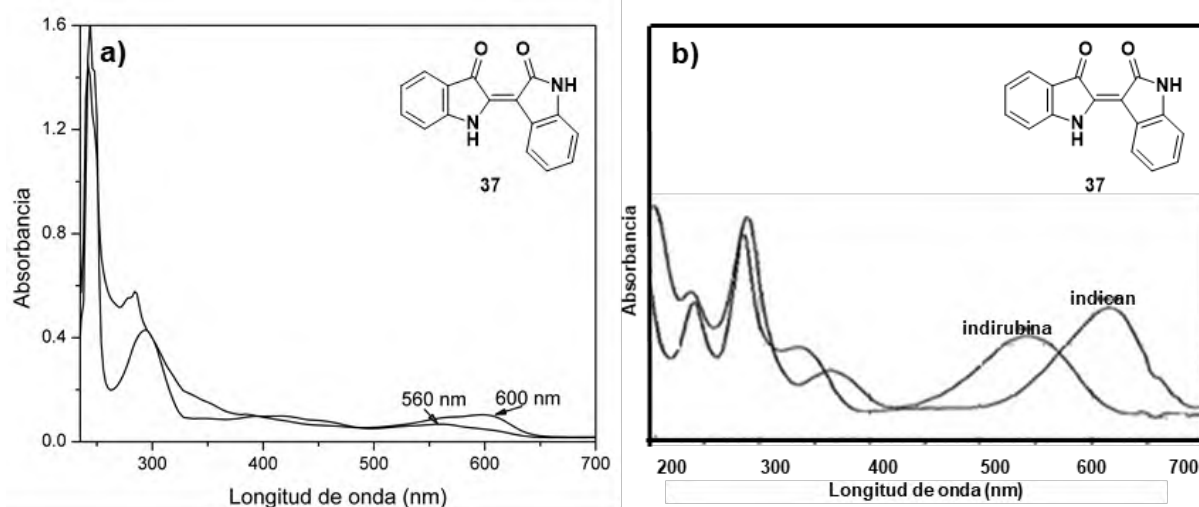


Figura 44. Comparación de los espectros de UV-Vis del compuesto aislado de la fracción de hexano, se observa en el **a)** espectro de indirubina (**37**) aislado; en CHCl_3 , **b)** espectro de indirubina (**37**) descrito en la literatura; en CHCl_3 .¹⁰²

Como se mencionó previamente, el género *Indigofera* y, sobre todo, la especie *suffruticosa* (añil) es una de las principales fuentes del colorante índigo (**1**), de igual forma, existen estudios de que la indirubina (**37**) es ampliamente utilizada como un pigmento por su color rosa-rojo, es por ello que su identificación en las fracciones obtenidas fue relativamente sencilla.

El índigo (**1**), es uno de los colorantes naturales más conocidos y antiguos, se forma a partir del indican (**3**) por fermentación de material vegetal seguido de la oxidación del indoxil cuando se expone al aire, una de las razones de su popularidad y de su uso intensivo se puede deber a su alta fotoestabilidad.¹⁰³

Una de las principales fuentes del colorante añil son *Baphicacanthus cusia* Brem, *Indigofera suffruticosa*, *Indigofera tinctoria*, *Polygonum tinctorium* e *Isatis indigotica*.¹⁰⁴ Se considera que el índigo (**1**) no es un metabolito secundario, sin embargo, se ha estudiado su uso en el tratamiento de la psoriasis, y se encontró que en mezcla con indirubina y triptantrina tiene buenos resultados.¹⁰⁵ Además, presenta actividad inmunoestimulante y actividad citotóxica frente a líneas celulares de adenocarcinoma de mama (LM2) y de pulmón (LP07).¹⁰⁶

Por otro lado, indirubina (**37**), es un pigmento rosa-rojo similar a la estructura del compuesto **1**; se ha aislado de *Polygonum tinctorium*, *Baphicacanthus cusia* Brem y

de *Indigofera tinctoria*.¹⁰⁷ Estudios *in vivo* demuestran que la indirubina (**37**) posee actividad como antiviral,¹⁰⁸ antiinflamatoria,¹⁰⁹ antiproliferativa frente a células de cáncer de mama humano (MCF-7)^{110,111} y se describe su uso en el tratamiento de leucemia mielocítica crónica.¹¹²

9.7.4 Triptantrina.

Al hacer la separación por CC de la fracción de AcOEt se aisló un compuesto de color amarillo que absorbe al visible (Figura 45d), en CCF con un sistema hexano/AcOEt (7:3) se observa en la lámpara de UV a 254 nm y en 365 nm con un $R_f=0.6$ (Figura 45a-c). Se concentraron las fracciones y se obtuvo 16.2 mg del compuesto puro, posteriormente se realizó el análisis de la muestra por RMN, MS, UV-Vis y FTIR.

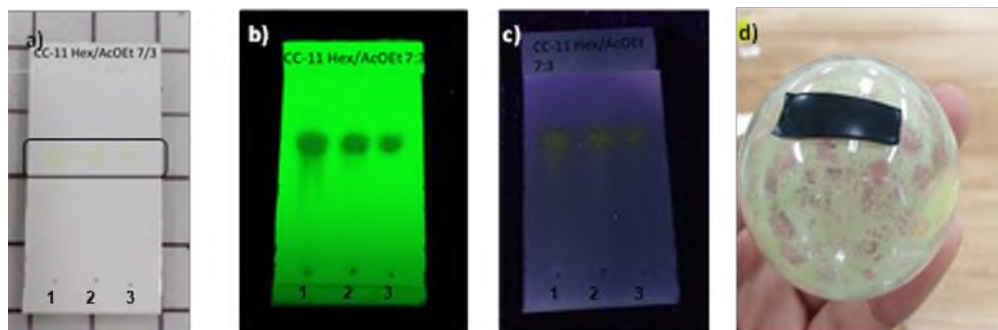


Figura 45. CCF de las fracciones obtenidas de la separación por CC de la fracción de AcOEt, en un sistema hexano/AcOEt (7:3), se observan a **a)** luz visible, **b)** en lámpara de UV a 234 nm y **c)** UV de 354 nm, **d)** después de retirar el disolvente.

El análisis de los espectros de RMN del compuesto aislado de la CC de la fracción de AcOEt, llevó a proponer la estructura del indol[2,1-b]quinazolin-6,12-diona (triptantrina (**38**), figura 46). En el espectro de ^1H del compuesto **38** se observan 8 señales que tienen la misma integral en el rango de 7.2 a 8.7 ppm, que corresponden a los protones aromáticos. Fue posible establecer la sustitución de los anillos aromáticos a través de la multiplicidad y de las constantes de acoplamiento. Se pudieron reconocer dos sistemas aromáticos disustituídos, los patrones de multiplicidad revelan la disustitución en *orto*. Por ejemplo, para H-1 se observa una multiplicidad doble de doble de doble con constantes de 7.9, 1.5 y 0.5 Hz característicos de los acoplamientos en *orto*, *meta* y *para*, en tanto que para H-3 se observa una multiplicidad doble de doble de dobles, con constantes de 8.1, 7.3 y 1.5 Hz característicos de dos acoplamientos en *orto* y uno

en *meta* (Figura 46). Los protones H-2 y H-4 presentan el mismo patrón de multiplicidad que H-1 y H-3, y el otro anillo aromático presenta el mismo patrón en las cuatro señales, lo que indica que también está disustituido en *orto*.

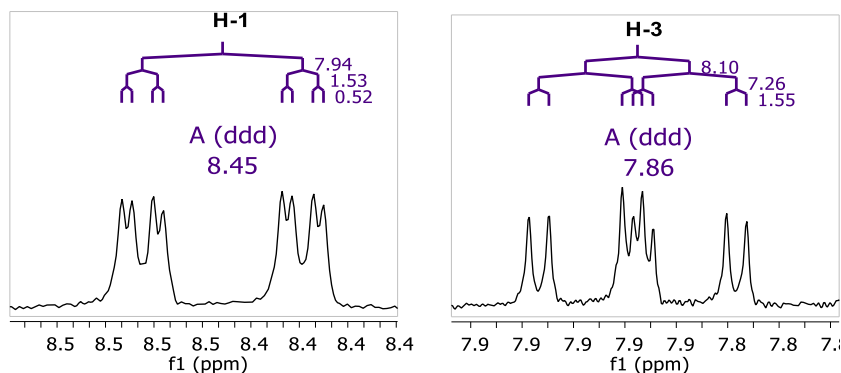


Figura 46. Multiplicidad y constante de acoplamiento de los protones H-1 y H-3 de triptantrina (**38**).

Con los resultados de los espectros *g*COSY y TOCSY se confirmó la correlación de los dos sistemas aromáticos disustituídos en posición *orto* (Figura 48 y 49). En el espectro de ^{13}C se observan 15 señales correspondientes a los carbonos de la estructura de triptantrina (**38**), de los cuales el C-6 y C-12 presentan los desplazamientos típicos de carbonilos y 5 señales corresponden a los carbonos cuaternarios: C-4a, C-10a, C-5a, C-12a, y C-6a, el resto son los carbonos de los dos sistemas del anillo aromático.

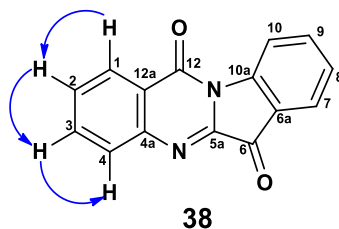


Figura 47. Estructura de triptantrina (**38**) y correlación de los protones en *g*COSY.

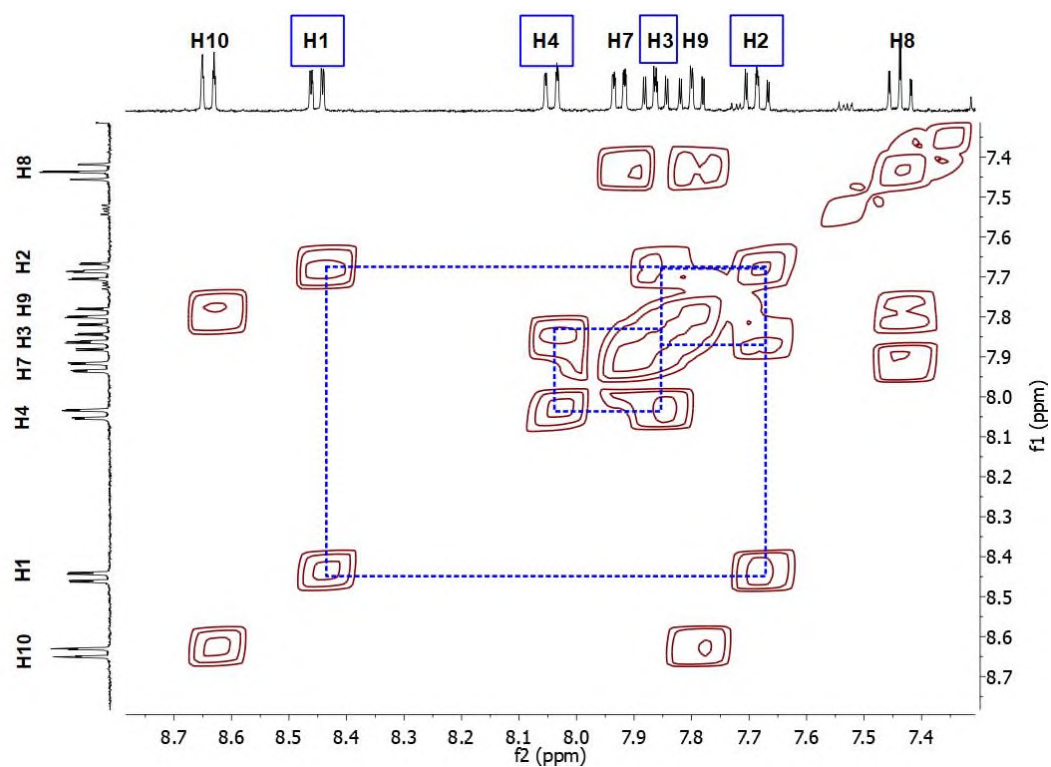


Figura 48. Espectro gCOSY de triptantrina (**38**); se resalta la correlación de un sistema aromático disustituido en *orto* correspondiente a la estructura **38**. RMN de 400 MHz; CDCl₃.

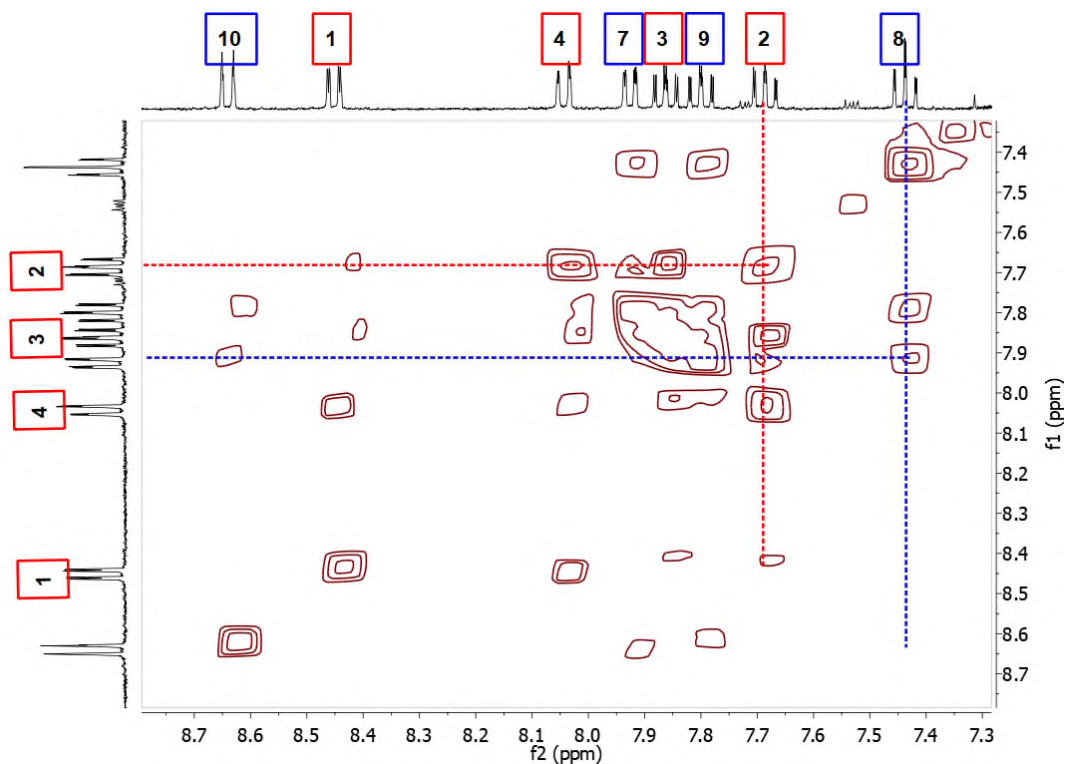


Figura 49. Espectro TOCSY de triptantrina (**38**); se observa de color rojo y azul los dos sistemas aromáticos correspondientes a la estructura **38**. RMN de 400 MHz; CDCl₃.

Con el experimento de *g*HSQC, se obtuvo la correlación de los protones con sus respectivos carbonos (Figura 51), los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del compuesto **38** se describen en la tabla 8 y se comparan con lo descrito en la literatura, para cada caso se observan los mismos desplazamientos químicos. En el experimento de *g*HMBC los protones H-1 y H-7 correlacionan con un grupo carbonilo diferente C-12 y C-6 respectivamente, además que H-1 correlaciona con C-3 y C-4a, mientras que H-7 correlaciona con C-9, C-6 y C-10a. Siguiendo con el análisis se observó que H-2 correlaciona con C-4 y con el carbono cuaternario C-12a; H-3 correlaciona con C-1 y con C-4a y H-4 con C-2 y C-12a, además, en la parte indólica, se observa la correlación de H-10 con C-6a y C-8 (Figura 50 y 52).

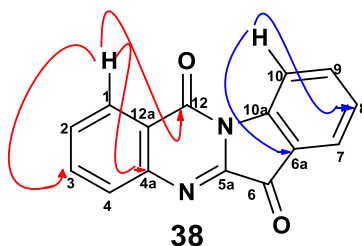


Figura 50. Estructura de triptantrina (**38**) y correlación de sus protones con los carbonos en *g*HMBC.

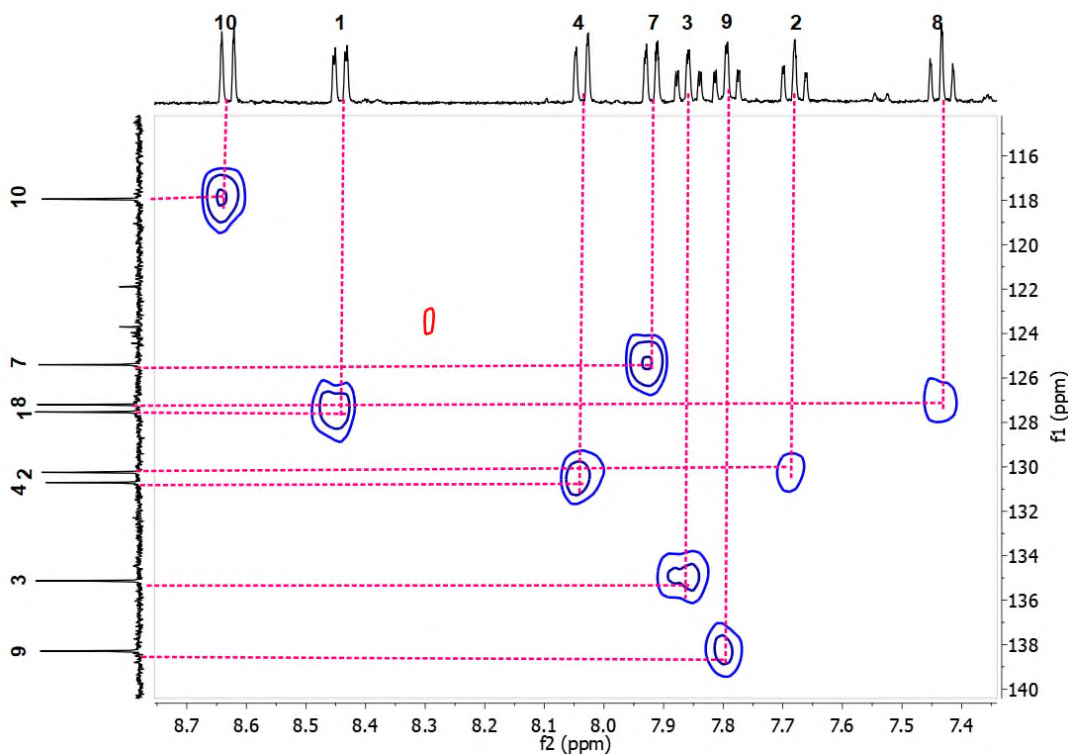


Figura 51. Espectro *g*HSQC de triptantrina (**38**); se observa con líneas punteadas la correlación directa de los protones con los carbonos a los que están unidos. RMN de 400 MHz; CDCl_3 .

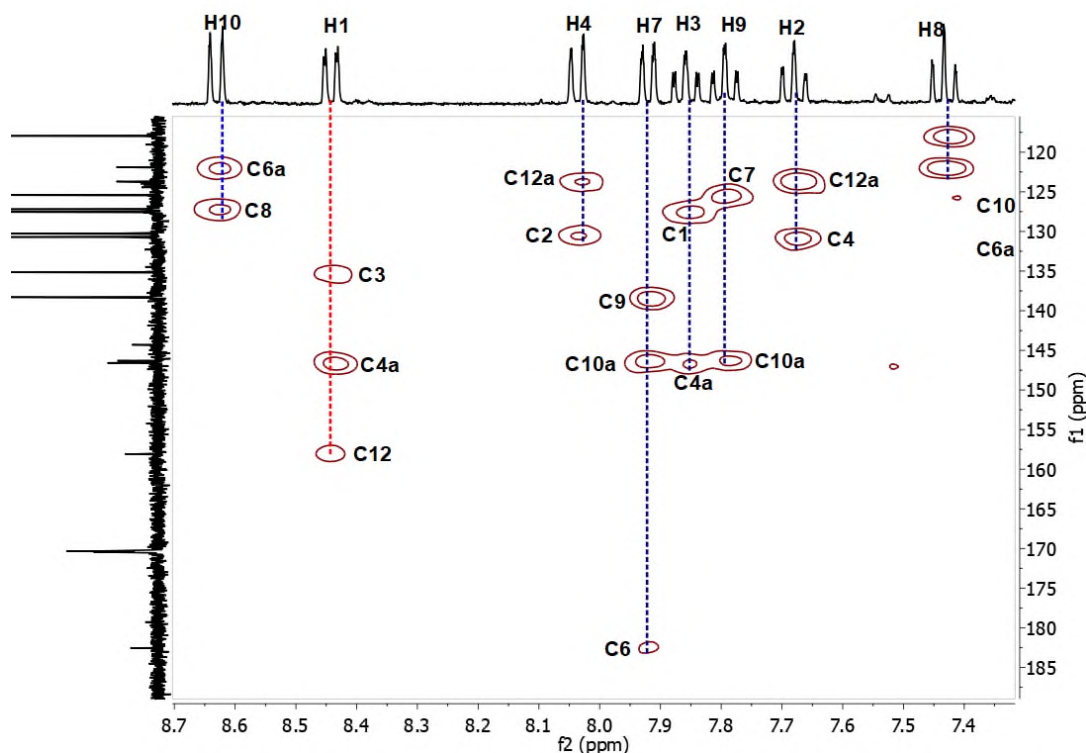


Figura 52. Espectro gHMBC de triptantrina (**38**); Se observan con líneas punteadas las correlaciones a tres enlaces entre los protones y los carbonos. RMN de 400 MHz; CDCl_3 .

Tabla 8. Desplazamientos de ^1H y ^{13}C para triptantrina (**38**); RMN de 400 MHz; CDCl_3 .

No.	$\delta\ ^1\text{H}$	Referencia	$\delta\ ^{13}\text{C}$	Referencia ¹⁰³
1	8.44 (ddd, $J=7.9, 1.5, 0.5$ Hz)	8.42	127.5	127.5
2	7.68 (ddd, $J=8.1, 7.9, 1.2$ Hz)	7.66	130.2	130.2
3	7.84 (ddd, $J=8.1, 7.2, 1.5$ Hz)	7.84	135.1	135.1
4	8.04 (ddd, $J=7.2, 1.2, 0.5$ Hz)	8.02	130.7	130.7
4a			146.5	146.6
5a			144.3	144.3
6			182.5	182.6
6a			121.8	121.9
7	7.92 (ddd, $J=7.6, 1.4, 0.6$ Hz)	7.9	125.4	125.4
8	7.44 (ddd, $J=7.6, 7.6, 0.9$ Hz)	7.42	127.2	127.2
9	7.8 (ddd, $J=8.1, 7.6, 1.4$ Hz)	7.78	138.2	138.3
10	8.6 (ddd, $J=8.1, 0.9, 0.6$ Hz)	8.62	117.9	118.0
10a			146.3	146.3
12			158.0	158.1
12a			123.7	123.7

Una vez que se tuvo como propuesta la triptantrina (**38**) fue necesario corroborar la fórmula molecular mediante MS ESI-TOF en modo positivo, se obtuvo un espectro con un ión molecular cuya relación m/z fue de 249.0659 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y una fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ lo cual coincide con la masa exacta y fórmula molecular esperada para

el compuesto **38**, además, para contribuir a la identificación del compuesto, se fragmentó la molécula operando el equipo en modo MS/MS utilizando una energía de colisión de 25 eV (Figura 53), sin embargo, en las bases de datos (METLIN, HMDB, MASSBANK) no se encontraron registros experimentales del compuesto **38** para ser comparados, así que con los datos obtenidos se puede contribuir a la base de datos.

También se caracterizó a la triptantrina (**38**) por espectrofotometría UV-Vis y FTIR. Para cada caso, la muestra se disolvió en CHCl_3 . El espectro de UV-Vis se obtuvo con un barrido en el rango de 700 a 200 nm; como resultado se observan las bandas de absorción en 254 nm, 313 nm, 335 nm y 398 nm (Figura 54). En el espectro de infrarrojo destacan las bandas de vibración de los grupos carbonilos, en 1735 cm^{-1} se observa al carbonilo de amida y en 1689 cm^{-1} la banda correspondiente al grupo carbonilo de cetona (Figura 55). Todos estos datos son consistentes con los descritos para el alcaloide indolquinazolínico triptantrina (**38**).¹¹³

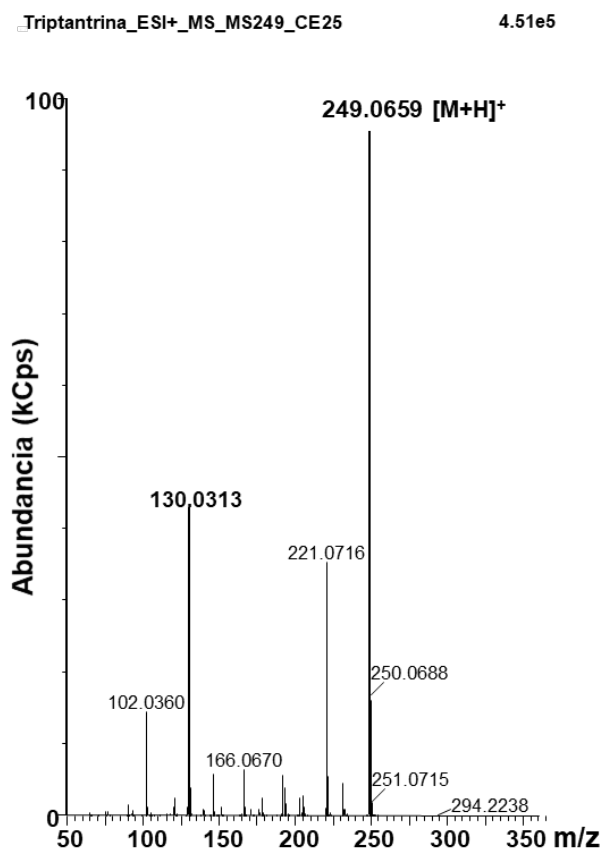


Figura 53. Espectro de MS/MS-ESI en modo positivo de triptantrina (**38**).

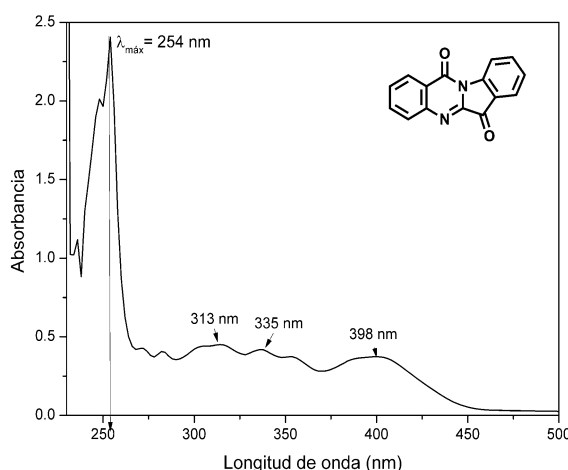


Figura 54. Espectro de UV-Vis de triptantrina (**38**); en CHCl_3 .

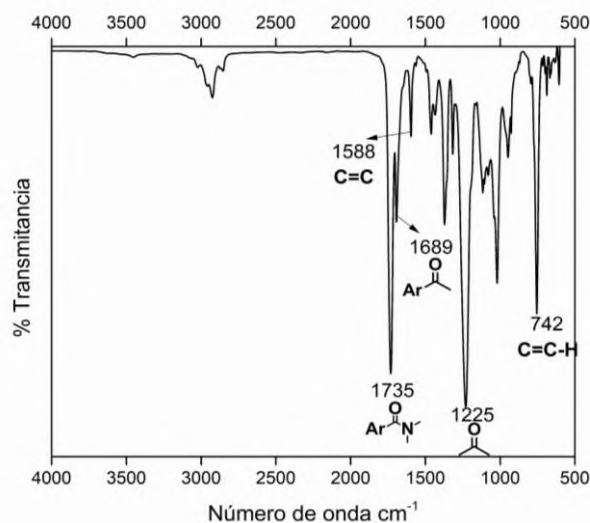


Figura 55. Espectro de IR de triptantrina (**38**).

El alcaloide indolquinazolínico **38** se ha aislado/identificado anteriormente en materiales vegetales utilizados tradicionalmente como colorantes, incluido el algodón chino (*Isatis tinctoria*), añil japonés (*Polygonum tinctorium*), Assam índigo (*Strobilanthes cusia*), Índigo naturalis (*Strobilanthes formosanus*) y la Adelfa tintórea (*Wrightia tinctoria*). También se ha aislado de los frutos del árbol de bala de cañón (*Couroupita guaianensis*) y de las orquídeas *Phaius mishmensis* y *Calanthe discolor*.¹¹⁴

Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que la triptantrina (**38**) posee actividad como: agente antiproliferativo,¹¹⁵ antitumoral ante células de leucemia monocítica y promielocítica (U-937 y HL-60)¹¹⁶, quimiopreventivo,¹¹⁷ antiparasitario (contra *Plasmodium falciparum* y *Leishmania*)¹¹⁸ antifúngico,¹¹⁹ antiinflamatorio, antibacteriano y es un inhibidor dual de la COX-2 y de la 5-LOX.¹²⁰

En los últimos años, el compuesto **38** y sus derivados han atraído mucho la atención como agentes anticancerígenos,¹¹⁰ estudios *in vitro* demostraron su acción contra varias líneas celulares, por ejemplo: de mama (MCF-7), de colon (SW620), de ovarios (SKOV3), de próstata (DU141), de pulmón (NCIH460), gástrico (HGC), entre otros.¹²¹ En un estudio realizado frente a fibroblastos dérmicos normales en humanos la triptantrina (**38**) no tiene ningún efecto citotóxico.¹²²

9.7.5. Glucósido del ácido antranílico (GAA).

Se llevó a cabo la CC de la fracción de *n*-BuOH y se siguió mediante CCF con un sistema CH₂Cl₂/MeOH (9:1), cuando se reveló con la lámpara de UV de 365 nm se observó una banda fluorescente con un $R_f=0.2$, además, cuando se revela con una solución de vainillina/H₂SO₄ y calentamiento ligero, se observa una banda con el mismo R_f que cambió a color amarillo después del tratamiento (Figura 56). Con base a los resultados obtenidos se concentraron las fracciones y se obtuvieron 14.4 mg del compuesto. Por la polaridad del compuesto se disolvió en DMSO-*d*₆ para su análisis por RMN.

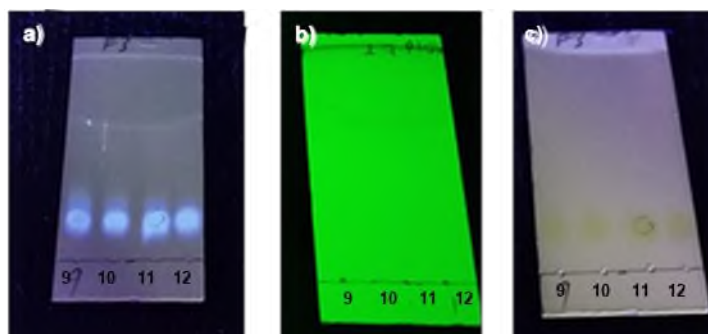


Figura 56. CCF de las fracciones obtenidas de la CC de la fracción de *n*-BuOH en un sistema CH₂Cl₂/MeOH (9:1), revelado con **a)** lámpara de UV de 365 nm, **b)** UV de 254 nm y **c)** revelado con vainillina.

En el análisis del espectro de ¹H se observan 4 señales en la región aromática con multiplicidad característica de un sistema aromático disustituido en posición *orto*, en 6.69 ppm se observa una señal simple que integra para dos protones y que no correlaciona con ningún carbono y que corresponde al grupo amino (Figura 57). Además, en 5.52 ppm se aprecia una señal doble del protón anomérico del glúcido (H-1' $J=7$ Hz, espectro 12). En el experimento de *g*COSY se observa la correlación de los protones del sistema aromático (Figura 59) del glucósido del ácido antranílico (**39**, figura 58)

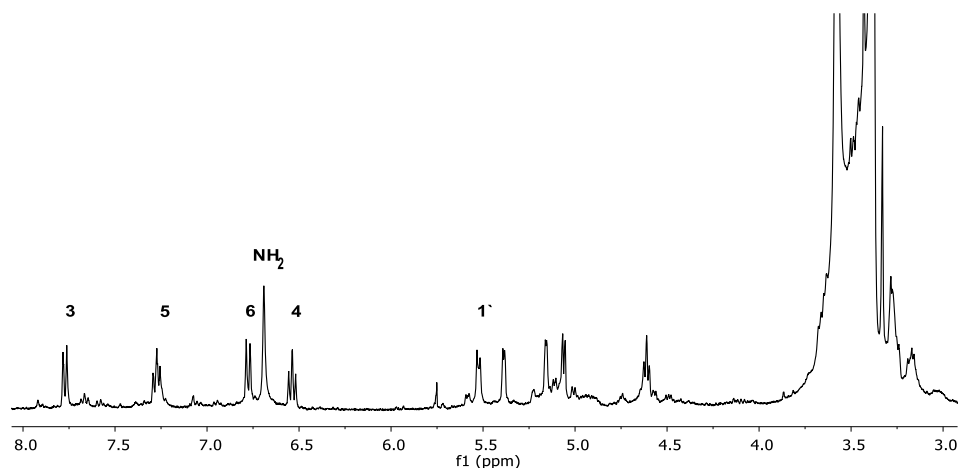


Figura 57. Espectro de ^1H del glucósido del ácido antranílico (**39**). RMN de 400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$.

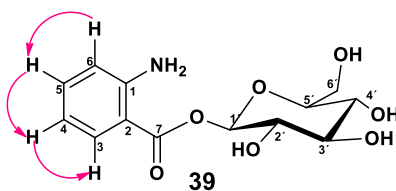


Figura 58. Estructura del glucósido del ácido antranílico (**39**) aislado de la fracción de *n*-BuOH y correlación de los protones aromáticos en *g*COSY.

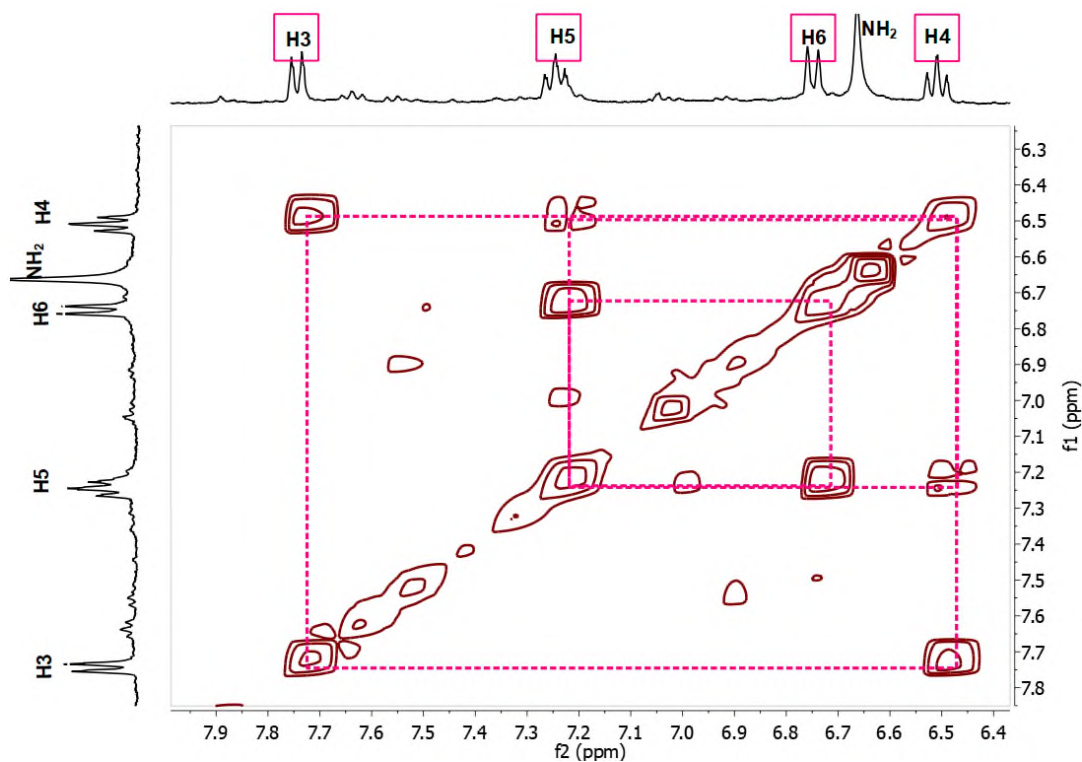


Figura 59. Experimento *g*COSY del glucósido del ácido antranílico (**39**), se observa la correlación de los protones del sistema aromático correspondiente a la estructura **39**. RMN de 400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$.

En el espectro de ^{13}C se observan las 13 señales correspondientes a la molécula, y con el experimento de $g\text{HSQC}$ se obtuvo la correlación directa de éstos con cada uno de sus protones (Figura 61). Mediante el experimento de $g\text{HMBC}$ se observa la correlación de H-6 con C-4 y C-2; H-5 muestra correlación con C-3 y C-1, a su vez H-4 correlaciona con C-6 y con el carbono cuaternario 2, mientras que H-3 correlaciona con C-5, C-1 y con el carbonilo C-7. Siguiendo al N-H se observa la correlación con C-2 y C-6. El protón anomérico del glúcido presente en la molécula correlaciona con el carbonilo C-7 uniendo así ambos fragmentos de la molécula (Figura 60 y 62), con estos datos se confirma la estructura del compuesto **39**. En la tabla 9 se describen los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del compuesto **39**.

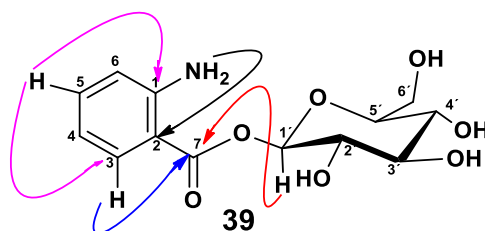


Figura 60. Estructura del glucósido del ácido antranílico (**39**) y la correlación de algunos protones con los carbonos, en $g\text{HMBC}$.

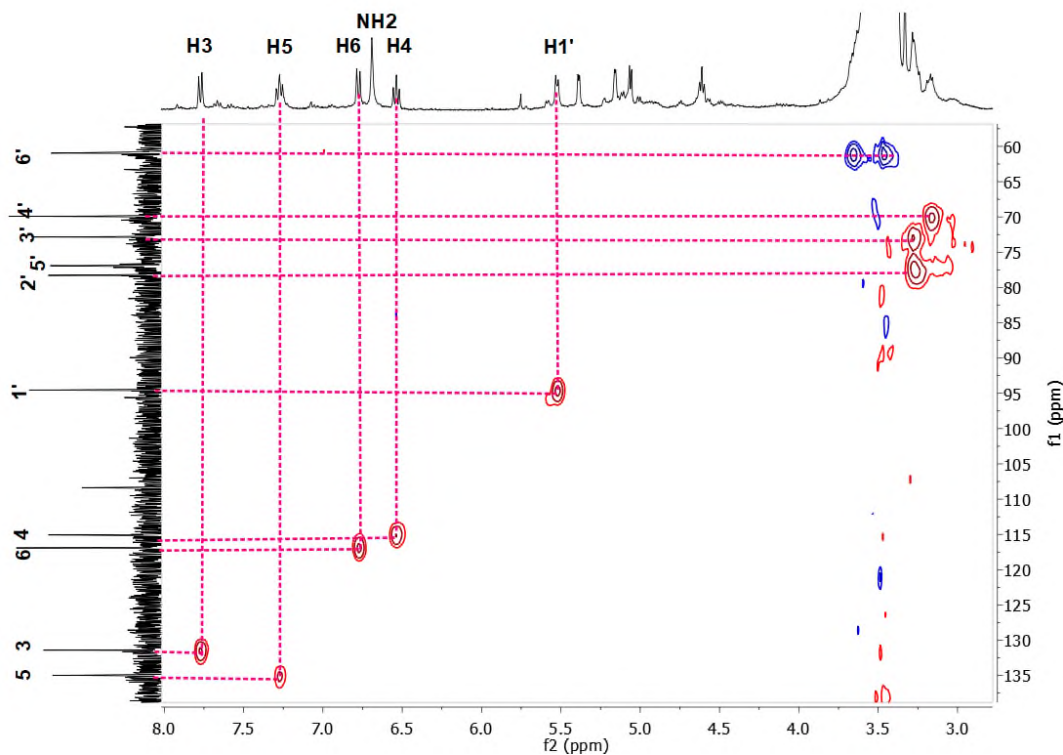


Figura 61. Espectro $g\text{HSQC}$ de glucósido del ácido antranílico (**39**), se observa con líneas punteadas la correlación directa de los protones con los carbonos a los que están unidos. RMN de 400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$.

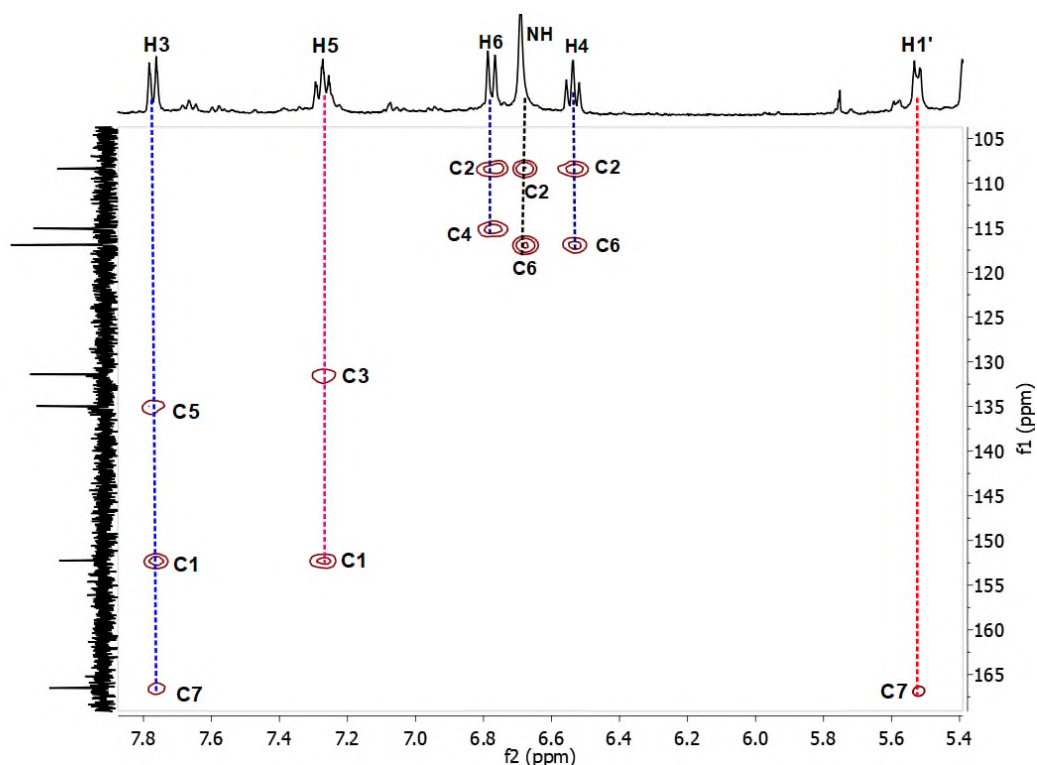


Figura 62. Espectro gHMBC del glucósido del ácido antranílico (**39**); se observan con líneas punteadas las correlaciones a tres enlaces entre los protones y los carbonos. RMN de 400 MHz; DMSO- d_6 .

Tabla 9. Desplazamientos de ^1H y ^{13}C del GAA (**39**); RMN de 400 MHz; DMSO- d_6 .

No.	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1	-	152.24
2	-	108.37
3	7.77 (dd, $J=8.1, 1.5$ Hz)	131.41
4	6.54 (ddd, $J=8.1, 7.2, 1.1$ Hz)	115.08
5	7.27 (ddd, $J=8.4, 7.2, 1.5$ Hz)	134.96
6	6.78 (dd $J=8.4, 1.1$ Hz)	116.72
7		166.51
1'	5.52 (d, $J=7$ Hz)	94.53
2'	3.26 (m)	78.28
3'	3.29 (m)	72.85
4'	3.17 (m)	69.90
5'	3.11 (m)	76.90
6'	3.68 (m)	60.96
6'	3.41 (m)	60.96
NH ₂	6.69 (Sa)	-

Una vez que los espectros de RMN llevaron a proponer la estructura del GAA (**39**) se analizó la muestra por MS ESI-TOF en modo positivo para corroborar la masa del compuesto. En el espectro se observa un ión molecular con relación m/z de 322

$[M+Na]^+$, lo anterior coincide con la relación m/z esperada de 299 para $C_{13}H_{16}NO_7$ formando aducto con Na, se obtuvo así la masa nominal del compuesto **39** (Figura 63). Al realizar la búsqueda en las bases de datos (METLIN, HMDB, MASSBANK) no se encontraron registros experimentales del compuesto **39**.

En el análisis de la muestra por espectrofotometría de UV-Vis, se observa en el espectro una $\lambda_{\text{máx}}$ de 338 nm; cabe mencionar que no se encontraron datos sobre la $\lambda_{\text{máx}}$ del GAA (**39**), sin embargo, la longitud de absorción máxima coincide con un estudio del ácido antranílico, con esto se puede concluir que la estructura propuesta es correcta, ya que la unidad de glucosa presente en el compuesto **39** no genera ninguna modificación en la absorción de energía (Figura 64a,b,c).¹²³ Para concluir con el análisis se llevó la muestra a un espectrofotómetro FTIR, el espectro obtenido muestra una banda ancha en 3360 cm^{-1} característica de grupos hidroxilos presentes en el glúcido y una banda en 1062 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión C-O; en 1696 cm^{-1} se observa una banda de intensidad media propia del grupo carbonilo del éster, la señal en 1240 cm^{-1} corresponde al acetal del glúcido unido al carbonilo y en 752 cm^{-1} aparece una banda característica del anillo aromático disustituido en *orto* (Figura 65).

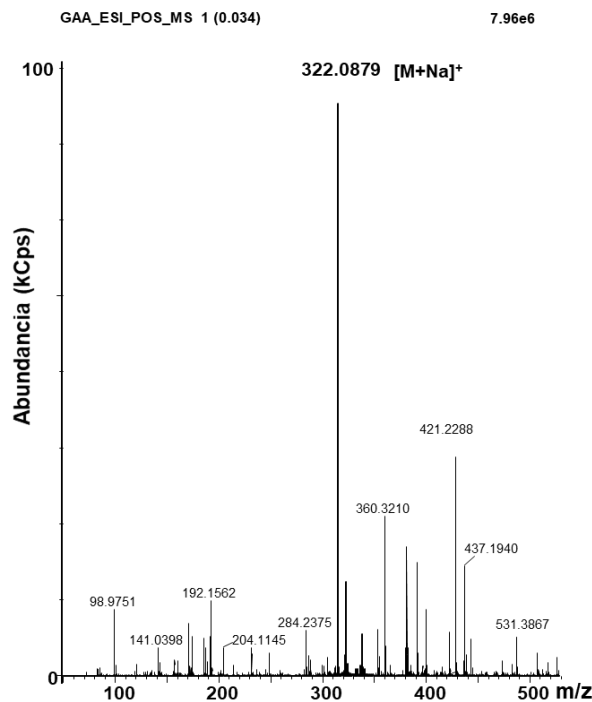


Figura 63. Espectro de MS-ESI en modo positivo del glucósido del ácido antranílico (**39**).

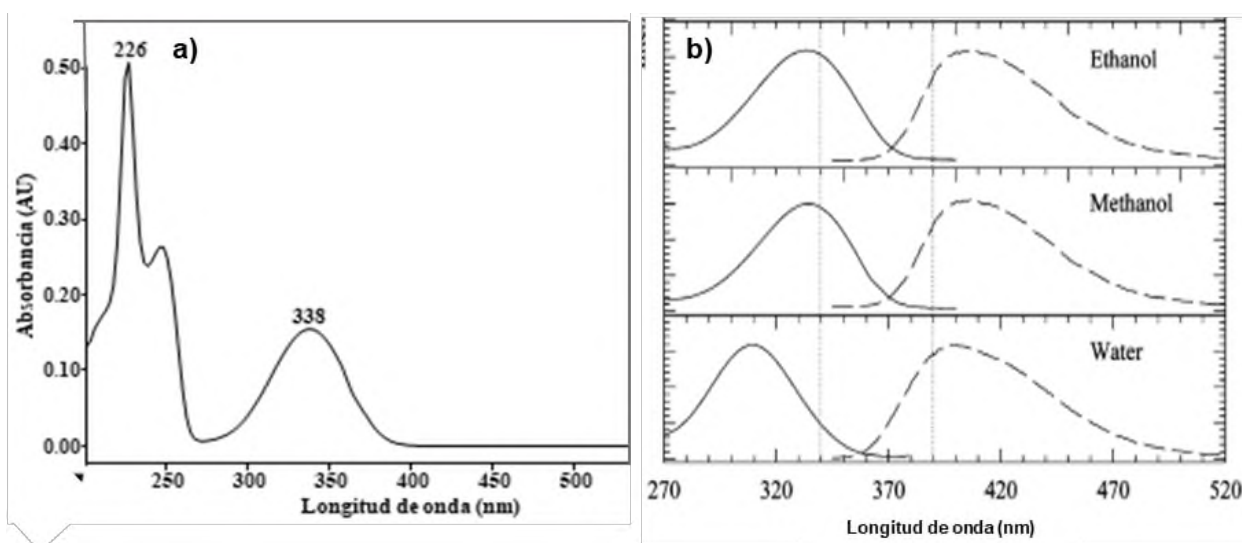


Figura 64. a) Espectro de UV-Vis del GAA (39), en MeOH, c) Espectro de UV-Vis del ácido antranílico descrito en la literatura.

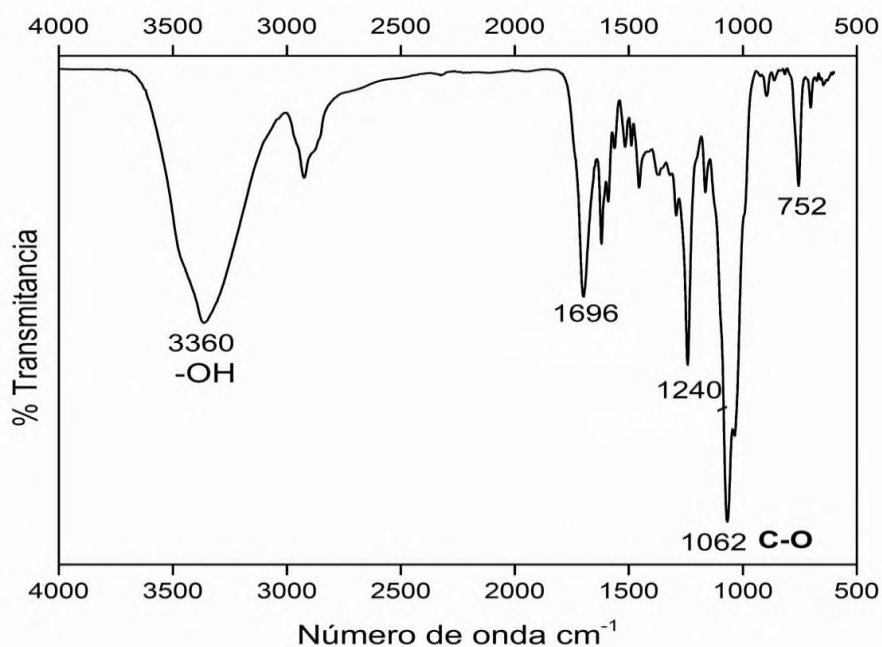


Figura 65. Espectro de IR del glucósido del ácido antranílico (39).

El GAA (39) es considerado un precursor de alcaloides indólicos y como tal no se ha estudiado su actividad biológica, sin embargo, el ácido antranílico conocido como vitamina L es importante en la lactancia para los seres humanos y sus derivados son usados en la producción de fármacos antipiréticos y antiinflamatorios. También es un metabolito intermediario en la producción del neurotransmisor serotonina.¹²⁴

9.7.6 Indican (indolil- β -D-glucopiranosido).

En la separación por CC de la fracción de *n*-BuOH se aisló un compuesto que se observa en la lámpara de UV a 254 nm en un sistema CH₂Cl₂/MeOH (8:2), presentó un $R_f=0.6$ muy parecido al GAA (**39**), sin embargo, este compuesto presenta características diferentes ya que no se visualiza con la lámpara de UV de 365 nm y en cambio, se ve de color rosa cuando se calentó, previo tratamiento con vainillina/H₂SO₄ (Figura 66). Se concentraron las fracciones obteniendo 6.5 mg de compuesto puro y se llevó a RMN usando DMSO-*d*₆. Se obtuvieron además los espectros de MS, UV-Vis y FTIR.

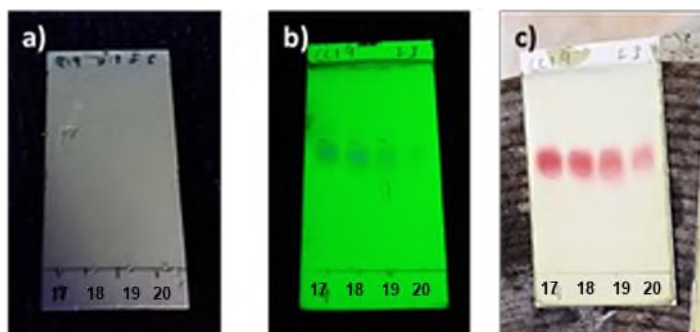


Figura 66. CCF del indican (**3**) aislado de la fracción de *n*-BuOH en un sistema CH₂Cl₂/MeOH (8:2), se reveló con **a)** lámpara de UV a 365 nm, **b)** UV de 254 nm y **c)** con vainillina.

El compuesto se caracterizó por RMN con experimentos en 1D y 2D. En el espectro de ¹H se observan 5 señales con desplazamientos de 7.07 a 7.59 ppm, además de una señal simple en 10.55 ppm; se observa también una señal doble en 4.57 ppm característica de un protón anomérico ($J=7.1$ Hz). Con los experimentos de *g*COSY y TOCSY se observan las correlaciones entre los protones H-7, H-4, H-5 y H-6 pertenecientes al anillo aromático, los patrones de multiplicidad y constantes de acoplamiento evidencian la disustitución en *orto* (Figura 67), y se observa también la correlación del N-H con el H-2 lo cual indica que ambos protones son vecinos (Figura 69 y 70), los datos llevaron a proponer una estructura con base indólica y posteriormente al indolil- β -D-glucopiranosido (**3**, figura 68).

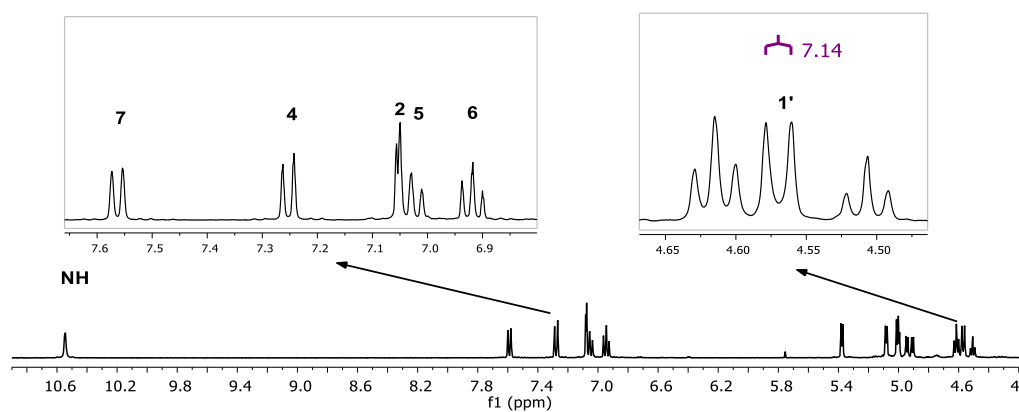


Figura 67. Espectro de ^1H del indican (**3**), se observan en la expansión los protones aromáticos y el protón anomérico 1' correspondientes a la estructura **3**. RMN de 400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$

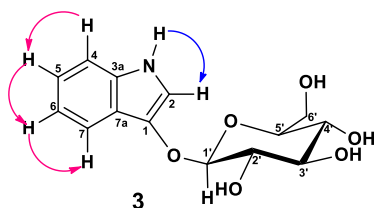


Figura 68. Estructura del indican (**3**) y la correlación de los protones aromáticos en $g\text{COSY}$, además de la correlación de N-H con H-2.

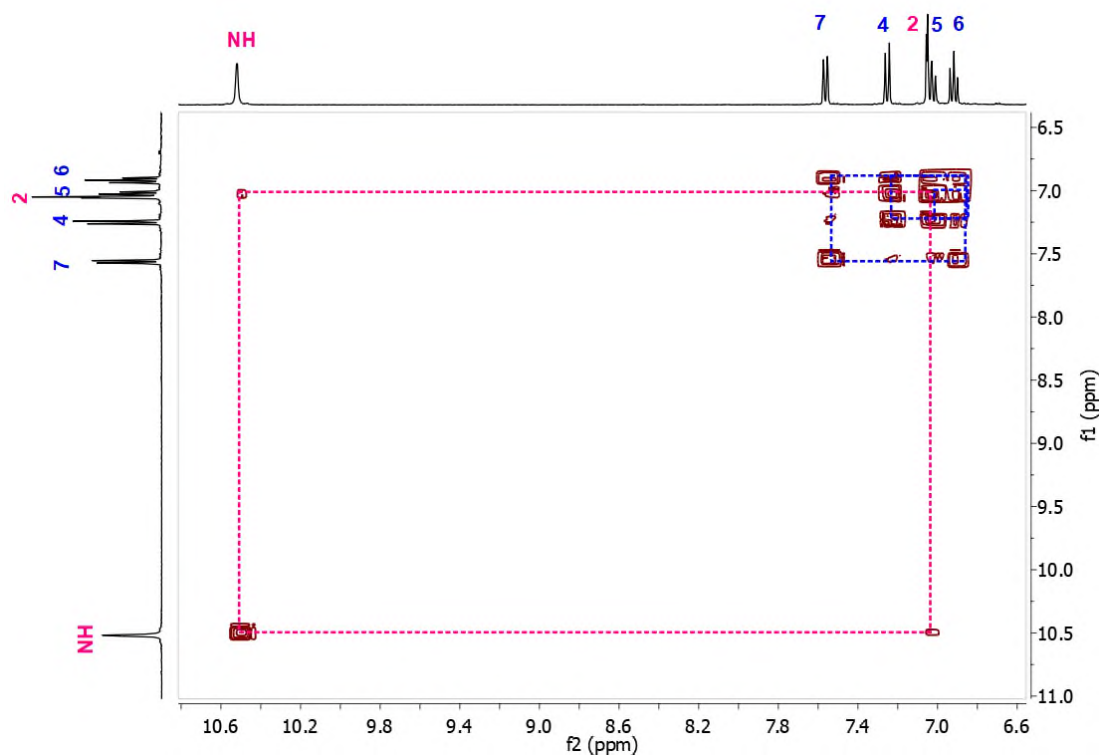


Figura 69. Espectro $g\text{COSY}$ del indican (**3**) se observa de color rojo la correlación de los protones aromáticos y de azul el protón de N-H con H-2. RMN de 400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$

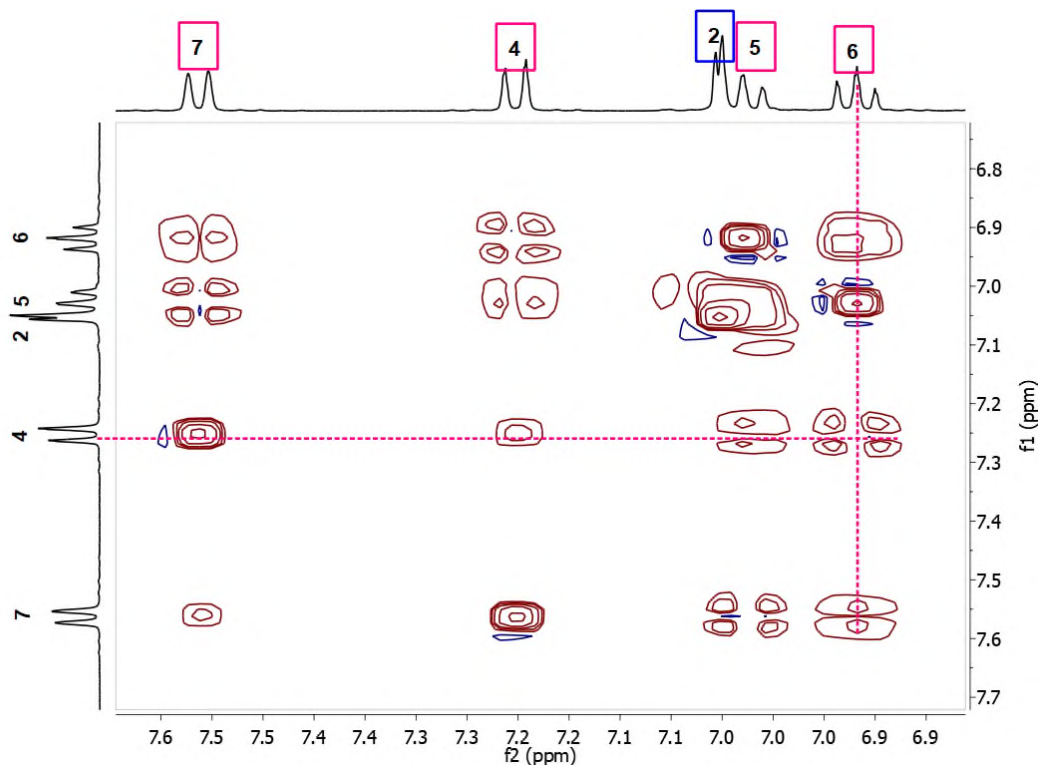


Figura 70. Espectro TOCSY del indican (**3**), se observa de color rosa la correlación de los protones aromáticos. RMN de 400 MHz; DMSO- d_6

En el espectro de ^{13}C se observan las 14 señales correspondientes a la estructura propuesta, con el experimento gHSQC se pudieron identificar los carbonos protonados a través de la correlación directa de las señales de los ^{13}C con ^1H (Figura 72). En el experimento gHMBC se observa la correlación de H-2 con 3a y 7a y la de H-4 con 7a lo que permitió establecer la estructura del anillo indólico. Mientras la correlación del protón anomérico H-1' con C-1 ubica al glúcido como parte de la estructura (Figura 71 y 72). En la tabla 10 se describen los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del indican (**3**).

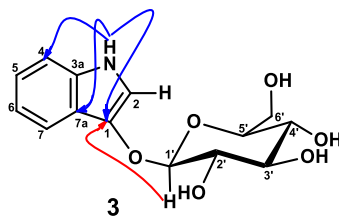


Figura 71. Estructura del indican (**3**) y correlación de N-H y del H-1' con los carbonos, en gHMBC.

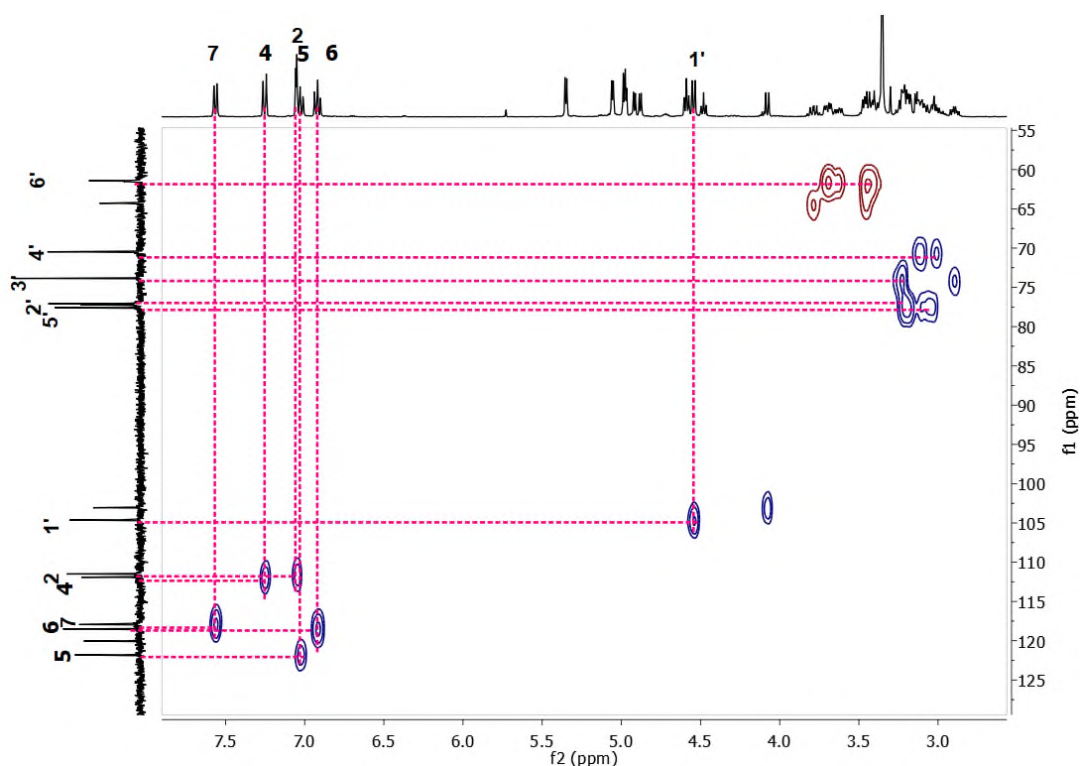


Figura 72. Espectro *g*HSQC del indicán (**3**); se observa con líneas punteadas la correlación directa de los protones con los carbonos a los que están unidos. RMN de 400 MHz; DMSO-*d*₆

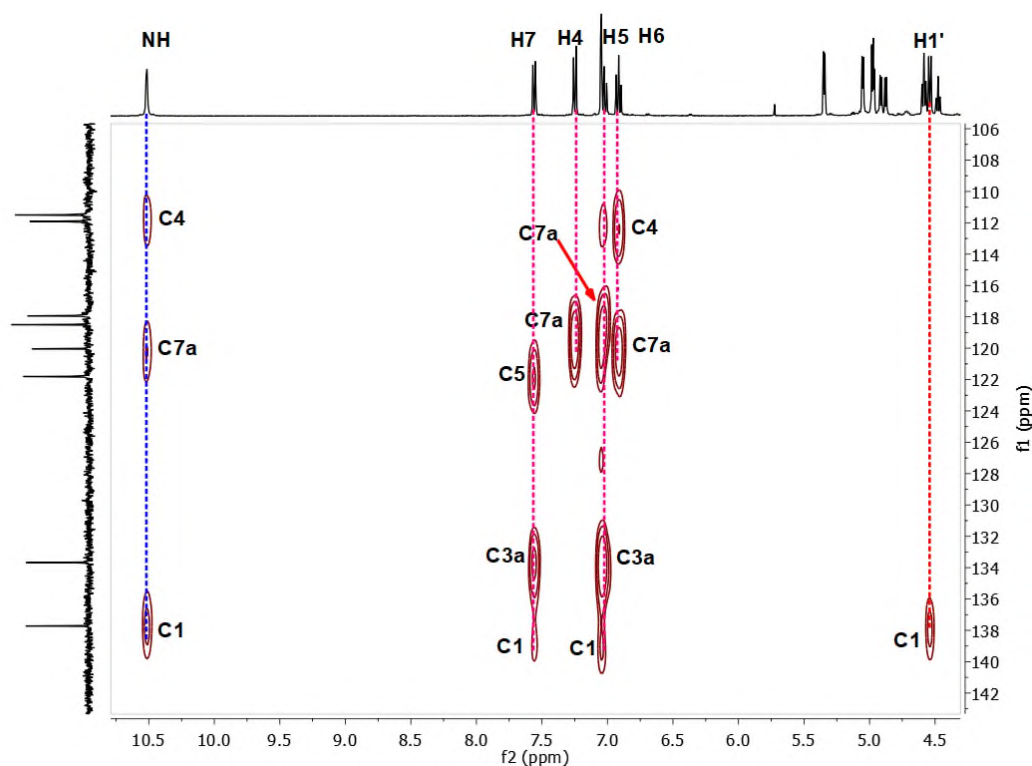


Figura 73. Espectro *g*HMBC del indicán (**3**); se observan con líneas punteadas las correlaciones a tres enlaces entre los protones y los carbonos. RMN de 400 MHz; DMSO-*d*₆

Tabla 10. Desplazamientos de ^1H y ^{13}C del indican (**3**); RMN de 400 MHz; DMSO- d_6 .

No.	$\delta\ ^1\text{H}$	$\delta\ ^{13}\text{C}$
1	-	137.72
2	7.04 (s _a)	111.50
3a		133.68
NH	10.50 (s _a)	-
4	7.25 (dd, $J=8.2, 0.8\text{ Hz}$)	111.92
5	7.02 (ddd, $J=8.9, 8.2, 0.7\text{ Hz}$)	121.81
6	6.92 (ddd, $J=8.9, 7.8, 0.8\text{ Hz}$)	118.50
7	7.56 (dd, $J=7.8, 0.7\text{ Hz}$)	117.94
7a		120.04
1'	4.57 (d $J=7.1\text{ Hz}$)	104.63
2'	3.07 (m)	77.15
3'	2.90 (m)	73.86
4'	3.12 (m)	70.48
5'	3.20 (m)	77.60
6_a'	3.69 (m)	61.47
6_b'	3.43 (m)	61.47

Con los resultados del análisis por MS ESI-TOF en modo negativo se obtuvo la masa exacta de la molécula con un ion molecular con relación de m/z de 294.0932 $[\text{M-H}]^-$ y fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_6$, estos datos coinciden para lo esperado para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ menos un protón (Figura 74).¹²⁵ Siguiendo con la elucidación del indican (**3**) se realizaron los análisis por espectrofotometría UV-Vis y FTIR. Para el caso de UV-Vis se realizó un barrido desde 700 a 200 nm y en el espectro se observan dos bandas de absorción máxima en 246 y 310 nm (Figura 75). En el espectro de IR se observa una banda ancha en 3360 cm^{-1} característica de grupos hidroxilos, una banda en 1029 cm^{-1} debido a las vibraciones C-O; se observan además dos bandas en 1355 cm^{-1} y 1237 cm^{-1} características de las vibraciones del grupo amino secundario y del C-H (Figura 76). Todos estos datos fueron concluyentes para definir la estructura del indolil- β -D-glucopiranosido (indican).

El indican (**3**) es un precursor del compuesto **1** (tinte azul índigo), se encuentra en especies de *Indigofera* ya que es uno de los principales productores de este colorante; también está presente en grandes cantidades en hojas de *Polygonum tinctorium* L.¹²⁶ En cuanto a las actividades biológicas para este compuesto, estudios *in vitro* demuestran que el indican (**3**) presenta actividad antifúngica, antibacteriana, anticancerígena y hepatoprotectora.¹²⁷

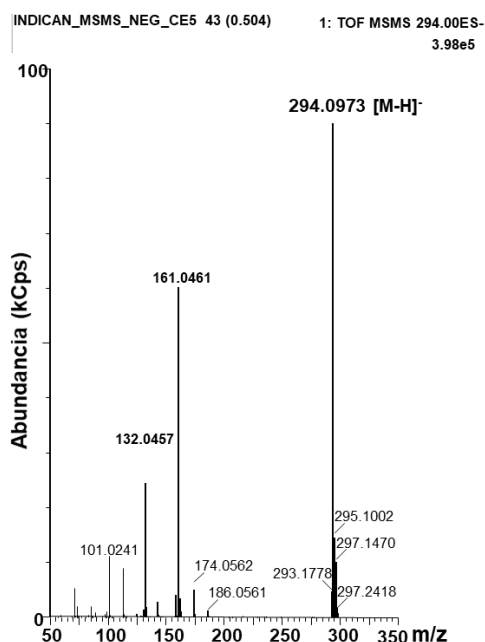


Figura 74. Espectro de MS/MS-ESI en modo negativo del indican (3).

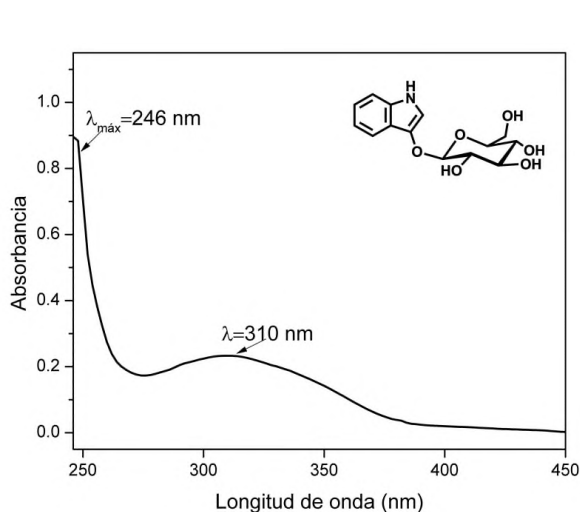


Figura 75. Espectro de UV-Vis del indican (3); en MeOH.

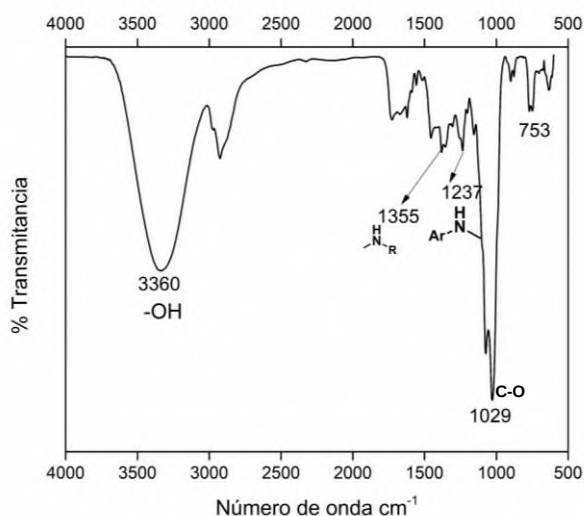
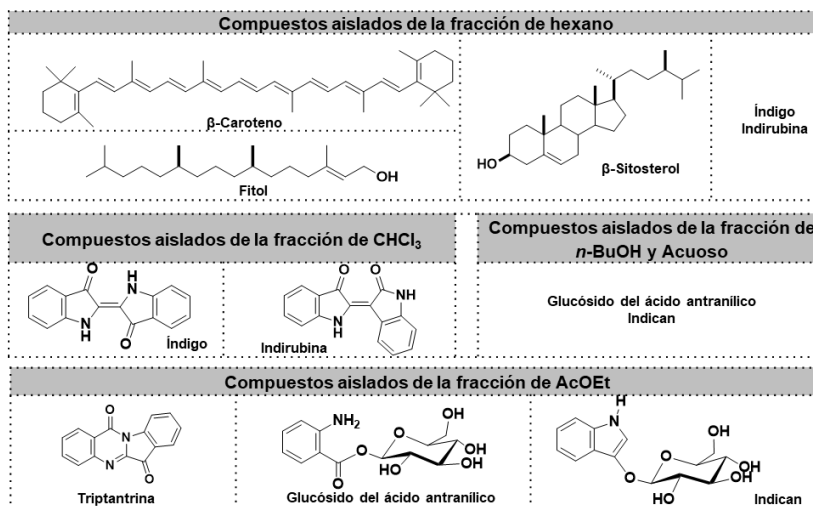


Figura 76. Espectro de IR del indican (3).

Las plantas son capaces de sintetizar una gran cantidad de metabolitos secundarios que le confieren propiedades medicinales, en ocasiones la actividad que presentan se debe a una relación sinérgica entre los metabolitos presentes, no obstante, hay estudios que demuestran la actividad que tienen los compuestos puros, es por ello que, el aislamiento y elucidación de los compuestos presentes en una planta es de suma importancia, para conocer los metabolitos responsables de las actividades que se le atribuyen, y así, generar una nueva fuente de tratamiento hacia enfermedades específicas.



11. REFERENCIAS

1. Llorente-Bousquets, J., Ocegueda, S. Estado del conocimiento de la biota, en capital natural de México. *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México. 2008
2. Vega, A, E., Espejo, S, A., Alarcón, A, F., Velasco-Lezama, R. Cytotoxic activity of four mexican medicinal plants. *Western Pharmacology Society Proceedings*. **2009**, 52, 78-82.
3. Meckes, M., Mata, R., Lozoya, X. La Investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana en investigación farmacológica de plantas medicinales. Secretaria de Salud México. México City, DF. 1993
4. Ordóñez, M. D. J., Rodríguez, P. Oaxaca, el estado con mayor diversidad biológica y cultural en México y sus productores rurales. *Ciencias*. **2008**, 91, 54-64.
5. Heinrich, M. Ethobotany and natural products: The search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2003**, 3(1), 29-42.
6. WHO. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. *Genebra*. 2013.
7. Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B., Kinghorn, A. D. Drug discovery from natural sources. *Journal American Association Pharmaceutical Scientists*, **2006**, 8(2), 239-253.
8. Pérez, E, B.E., Casasola, M, P. Plantas medicinales de la Matamba y el Piñonal municipio de Jamapa, Veracruz. México. Instituto de Ecología A. C. (INECOL). 2015.
9. Biblioteca digital de la medicina tradicional. (s.f.) Recuperado de www.medicina-tradicionalmexicana.unam.mx
10. Covarrubias, G.H.C. Plantas que curan. Editorial Visión Libros. 2012, pp 30-31
11. Seppala, M.D., Rose, M.E. Prescription pain killers. History, pharmacology and treatment. Minessota, USA. 2010.
12. Dewick, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons. 2002.
13. Rivas, M.C., Oranday, C, M.A., Verde, S, M.J. Investigación en plantas de importancia médica, *Omnia Science*. 2016.
14. Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal Natural Product*, **2016**, 79(3), 629-661.
15. Zulkipli, I. N., David, S.R., Rajabalaya, R., Idris, A. Medicinal plants: a potential source of compounds for targeting cell division. *Drug Target Insights*. **2015**, 9, 9.
16. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D. GUO, Z. Bulletin WHO. **1985**, 63, 965-981
17. WHO. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. *Genebra*. 2002.
18. Fomina T. H. Medicinal plants and their importance. Estado de Rusia universidad agraria-icca. 2014.
19. Ringuelet, J. A. y Viña, S. Z. Productos naturales vegetales. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 2013.
20. Hanson, J. R. Natural products: the secondary metabolites Vol. 17. Royal Society of Chemistry. 2003.

21. Vanderauwera, S., Hoeberichts, F. A., Van Breusegem, F. Hydrogen peroxide-responsive genes in stress acclimation and cell death. In reactive oxygen species in plant signaling. 2009, (pp. 149-164).
22. del Río, L. A. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal Experimental Botany*. **2015**, 66(10), 2827-2837.
23. Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. **2008**, 41(1), 1-15.
24. Benzie, I. F., Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. **1996**, 239(1), 70-76.
25. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **2001**, 49(10), 4619-4626.
26. Sánchez-Moreno, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Scienc Technology International*. **2002**, 8(3), 121-137.
27. Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M.A., Ponce-Pardo, J., Zarzosa-Norabuena, E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar la capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*. **2015**, 15(1), 57-60.
28. Apak, R., Capanoglu, E., Shahidi, F. Measurement of antioxidant activity and capacity: recent trends and applications. John Wiley & Sons. 2017.
29. Re, R., Pellegrini, N., Preteggente, A., Pannala, A., Yang, M. Rice, E, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS^{•+} radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biology Medicine*. **1999**, 26(9-10), 121-37
30. Poondi, T. Antimicrobial activity of *Indigofera glandulosa* (Wild). *Asian Journal Plant Science Research*. **2011**, 1(2), 18-25.
31. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal Pharmaceutical Analysis*. **(2016)**, 6(2), 71-79.
32. Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **1999**, 12(4), 564-582.
33. Naturalista. (s.f.). Recuperado de <http://www.naturalista.mx/taxa/83365-Indigofera>.
34. Castro, A. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. 1991.
35. Kewensis, I. Instituto de Ecología. 1988.
36. de Kort, I., Thijsse, G. A revision of the genus *Indigofera*. *Blumea*, **1984**, 30(1), 89-151.
37. Zolla, C. y Argueta, A. 2009. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Landsteiner Scientific, Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas, Programa Universitario México Nación Multicultural, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
38. Rahman, T.U., Zeb, M.A., Liaqat, W., Sajid, M., Hussain, S., Choudhary, M. I., Kosar, M. Phytochemistry and pharmacology of genus *Indigofera*: A review. *Records Natural Products*. **2018**, 12(1), 1.

39. Chen, C. C., Liu, C. S., Li, C. C., Tsai, C. W., Yao, H. T., Liu, T. C., Liu, K. L. *Indigofera suffruticosa* Mill extracts up-regulate the expression of the π class of glutathione S-transferase and NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 in rat Clone 9 liver cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2013**, 59, 610-617.
40. Chen, T. Y., Sun, H. L., Yao, H. T., Lii, C. K., Chen, H. W., Chen, P. Y., Liu, K. L. Suppressive effects of *Indigofera suffruticosa* Mill extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. *Food Chemical Toxicology*. **2013**, 55, 257-264.
41. Luiz, F. A., Cola, M., Barbastefano, V., Farias, S. E., Calvo, T. R., de Almeida, A. B. A., Souza, B. A. R. M. *Indigofera suffruticosa* Mill as new source of healing agent: Involvement of prostaglandin and mucus and heat shock proteins. *Journal Ethnopharmacology*. **2011**, 137(1), 192-198.
42. Wong, B. M., Rodríguez, S. N., Alejo, P. L. J., Perez, F. M. Actividad de la *Indigofera suffruticosa* Mill en la epilepsia crónica experimental y su relación con aminoácidos neurotransmisores. *Revista Cubana Plantas Medicinales*. **1999**, 1(4), 18-21.
43. Wong, B. M., Rodríguez, S. N., Alejo, P. L. J., Perez, F. M. Actividad de la *Indigofera suffruticosa* Mill en la epilepsia crónica experimental y su relación con aminoácidos neurotransmisores. *Revista Cubana Plantas Medicinales*. **1999**, 1(4), 18-21.
44. Pereira, L. S., Vieira, J. R. C., de Medeiros, P. L., Leite, R. M. P., de Menezes Lima, V. L., Xavier, H. S., de Oliveira, L. E. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*. **2006**, 3(2), 261-265.
45. Sánchez, G. E., Pérez, L. A. M., Chávez, F. D., Rodríguez, F. C. A., Gámez G. M., Reyes, A. M. Caracterización farmacognóstica de *Indigofera suffruticosa* Mill (añil cimarrón). *Revista Cubana Plantas Medicinales*. **2006**, 11, 3-4.
46. Kumar, R. S., Raj Kapoor, B., Perumal, P. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of methanolic leaf extract of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. *Journal Acute Disease*. **2013**, 2(4), 322-326.
47. Lopes, F. C., Calvo, T. R., Colombo, L. L., Vilegas, W., Carlos, I. Z. Immunostimulatory and cytotoxic activities of *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). *Natural Product Research*. **2011**, 25(19), 1796-1806.
48. Garcez, W. S., Garcez, F. R., Honda, N. K., da Silva, A. J. A nitropropanoyl- glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*. *Phytochemistry*. **1989**, 28(4), 1251-1252.
49. Domínguez, X. A., Martínez, C., Calero, A., Hinojosa, M., Zamudio, A., Watson, W. H., Zabel, V. Mexican medicinal plants XXXI Chemical Components from "Jiquelite" *Indigofera suffruticosa* MILL. *Planta Medica*. **1978**, 34(06), 172-175.
50. Bueno Pérez, L., Li, J., Lantvit, D. D., Pan, L., Ninh, T. N., Chai, H. B., Kinghorn, A. D. Bioactive constituents of *Indigofera spicata*. *Journal Natural Products*. **2013**, 76(8), 1498-1504.
51. Moura, A. C. D. S., Vilega, W., Santos, L. C. D. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. *Química Nova*. **2011**, 1136-1140.

52. Liu, C.T., Wu, C.Y., Weng, Y.M., Tseng, C.Y. Ultrasound-assisted extraction methodology as a tool to improve the antioxidant properties of herbal drug Xiao-chia-hu-tang. *Journal Ethnopharmacology*. **2005**, 99(2), 293-300.
53. Chemat, F., Khan, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2011**, 18(4), 813-835.
54. Wu, J., Lin, L., Chau, F., Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2001**, 8(4), 347-352.
55. Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2001**, 8(2), 137-142.
56. Valachovic, P., Pechova, A., Mason, T.J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2001**, 8(2), 111-117.
57. Salazar, J., Chávez, J. A., Turó, A., García-Hernández, M. J. Effect of ultrasound on food processing. en "novel food processing: Effects on rheological and functional properties". CRC Press, Estados Unidos de América. 2010, pp 65-84.
58. Suslick, K. S. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*. **1989**, 2, 80-86.
59. Vinatoru, M., An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2001**, 8(3), 303-313.
60. Ácidos grasos: clasificación e importancia en la salud humana. scientific figure on research gate. Recuperado de: https://www.researchgate.net/Cavitacion-inducida-por-ultrasonido-Chen-et-al-2015_fig7_317275062.
61. Mohrig, J. R., Hammond, C. N., Schatz, P. F. Techniques in organic chemistry. Macmillan. 2010.
62. Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. Thin-layer chromatography. 1995.
63. Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal Organic Chemistry*. **1978**, 43(14), 2923-2925.
64. Friebolin, H., Beconsall, J. K. Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy Weinheim: VCH. 1993, pp. 20-70.
65. Recuperado de: <https://orgspectroscopyint.blogspot.com/2014/11/magnetic-fields-in-aromatic-rings.html>
66. Silverstein, R. M., Webster, F.X., Kiemle, J.D. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & sons. 2005.
67. Herbert, C. G., Johnstone, R. A. Mass spectrometry basics. CRC press. 2002.
68. Recuperado de: http://www.cbm.uam.es/jooamla-rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria_de_masas_ESI-MSMS_enero_2015.pdf
69. Espectrometría de masas (detectores de cromatografía) marzo 2018. Recuperado de <http://callofchemistry.blogspot.com/2018/03/espectrometria-de-masas-detectores-de.html>
70. Fotometría y colorimetría (s.f). Recuperado de http://www.edym.net/Materiaprima_textil_gratis/2p/tintura/cap11-2.htm
71. Field, L. D., Sternhell, S., Kalman, J. R. Organic structures from spectra. John Wiley & Sons. 2012.

72. McMurray, J. Química orgánica. 7ma. Edición. Cengage Learning. 2008.
73. Stuart, B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. JohnWiley & Sons. 2004.
74. Espectroscopia infrarroja (s.f). Recuperado de <https://slideplayer.es/slide/3528146/>
75. Melvin C.A., (s.f) Organic spectroscopy international. Recuperado de: https://orgspectroscopyint.blogspot.com/p/ir_spectroscopy.html
76. Arrondo, J. L. R., Goñi, F. M. Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Progress Biophysics Molecular Biology*. **1999**, 72(4), 367-405.
77. Quiroz-Reyes, C. N., Aguilar-Méndez, M. A., Ramírez-Ortíz, M. E., Ronquillo-De Jesús, E. Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana Ingeniería Química*. **2013**, 12(1).
78. Liu, C. T., Wu, C. Y., Weng, Y. M., Tseng, C. Y. Ultrasound-assisted extraction methodology as a tool to improve the antioxidant properties of herbal drug Xiao-chia-hu-tang. *Journal Ethnopharmacology*. **2005**, 99(2), 293-300.
79. Mohrig, J. R., Hammond, C. N., Schatz, P. F. Techniques in organic chemistry. Macmillan. 2010.
80. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science Technology*. **1995**, 28(1), 25-30.
81. Guerra Ramírez D, Hernandez lopez A, Guerra Ramírez P, Reyes, Trejo B, Ibarra Vega P, Estudio de la actividad biológica de *Heliocarpus appendiculatus* turcz en *Artemina franciscana*, congreso internacional de productos naturales de Chapingo, México. 2009.
82. Re, R., Pellegrini, N., Preteggente, A., Pannala, A., Yang, M. Rice, E, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS^{•+} radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biology Medicine*. **1999**, 26(9-10), 121-37
83. Senthil, K. R.; Raj Kapoor, B.; Perumal, P. Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. using various in vitro assay models. *Asian Pacific Trop Boimed*. **2012**, 2(4), 256-261
84. Guruviah, P.; Arunachalam, A.; Velan, L. P. T. Evaluation of phytochemical constituents and antioxidant activities of successive solvent extracts of leaves of *Indigofera caerulea* Roxb using various *in vitro* antioxidant assay systems. *Asian Pacific Journal Tropical Disease*. **2012**, 2, S118-S123
85. Mesa, A., Zapata, S., Arana, L., Zapata, I., Monsalve, Z., Rojano, B. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. **2015**, 14(1), 1-10.
86. Craft, N. E., Soares, J.H. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and. β -carotene in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1992** 40(3), 431-434.
87. Rodriguez-Amaya, D. B. *A guide to carotenoid analysis in foods* Washington, DC: ILSI press. 2001 pp. 5-10.
88. Miglietta, M. L., Lamanna, R. ¹H HR-MAS NMR of carotenoids in aqueous samples and raw vegetables. *Magnetic Resonance Chemistry*. **2006**, 44(7), 675-685.

89. Eggersdorfer, M., Wyss, A. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives Biochemistry Biophysics*. **2018**, 652, 18-26
90. Ostlund Jr, R. E. Phytosterols in human nutrition. *Annual review of nutrition*. **2002**, 22(1), 533-549.
91. Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G. V., Gallo, L. L. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *Journal Lipid Research*. **1988**, 29(12), 1573-1582.
92. Villaseñor, I. M., Angelada, J., Canlas, A. P., Echegoyen, D. Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. *Phytotherapy Research: International Journal Devoted Pharmacological Toxicological Evaluation Natural Product Derivatives*. **2002**, 16(5), 417-421.
93. Klippel, K. F., Hittl, D. M., Schipp, B., German BPH-Phyto study group. A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *British Journal Urology*. **1997**, 80(3), 427-432.
94. Woyengo, T. A., Ramprasath, V. R., Jones, P. J. H. Anticancer effects of phytosterols. *European Journal Clinical Nutrition*. **2009**, 63(7), 813.
95. McGinty, D., Letizia, C. S., Api, A. M. Fragrance material review on phytol. *Food Chemical Toxicology*. **2010**, 48, S59-S63.
96. Rajab, M. S., Cantrell, C. L., Franzblau, S. G., Fischer, N. H. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta medica*. **1998**, 64(1), 2-4.
97. Sakthivel, R., Malar, D. S., Devi, K. P. Phytol shows anti-angiogenic activity and induces apoptosis in A549 cells by depolarizing the mitochondrial membrane potential. *Biomedicine Pharmacotherapy*. **2018**, 105, 742-752.
98. Islam, M. T., de Alencar, M. V. O. B., da Conceição Machado, K., da Conceição Machado, K., de Carvalho Melo-Cavalcante, A. A., de Sousa, D. P., de Freitas, R. M. Phytol in a pharma-medico-stance. *Chemico-Biological Interactions*. **2015**, 240, 60-73.
99. Costa, J. P., Ferreira, P. B., De Sousa, D. P., Jordan, J., Freitas, R. M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neuroscience Letters*. **2012**, 523(2), 115-118.
100. Chanayath, N., Lhieochaiphant, S., Phutrakul, S. Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and chemical structure analysis of their major components. *Chiang Mai University Journal*. **2002**, 1(2), 149-160.
101. Warjeet, S.L., Sujata, D.W. Comparative study of the major components of the indigo dye obtained from *Strobilanthes flaccidifolius* Nees. and *Indigofera tinctoria* Linn. *International Journal Plant Physiology Biochemistry*. **2011**, 3(7), 108-116.
102. Wouters, J., Rosario-Chirinos, N. Dye analysis of pre-Columbian Peruvian textiles with high-performance liquid chromatography and diode-array detection. *Journal American Institute Conservation*. **1992**, 31(2), 237-255.
103. Moreno, M., Ortiz-Sánchez, J. M., Gelabert, R., Lluch, J. M. A theoretical study of the photochemistry of indigo in its neutral and dianionic (leucoindigo) forms. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2013**, 15(46), 20236-20246.

104. Chanayath, N., Lhieochaiphant, S., Phutrakul, S. Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem, and chemical structure analysis of their major components. *Chiang Mai University Journal*. **2002**, 1(2), 149-160.
105. Hsieh, W. L., Lin, Y. K., Tsai, C. N., Wang, T. M., Chen, T. Y., Pang, J. H. S. Indirubin, an acting component of indigo naturalis, inhibits EGFR activation and EGF-induced CDC25B gene expression in epidermal keratinocytes. *Journal Dermatological Science*. **2012**, 67(2), 140-146.
106. Lopes, F. C., Calvo, T. R., Colombo, L. L., Vilegas, W., Carlos, I. Z. Immunostimulatory and cytotoxic activities of *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). *Natural Product Research*. **2011**, 25(19), 1796-1806.
107. Laitonjam, W. S., Wangkheirakpam, S. D. Comparative study of the major components of the indigo dye obtained from *Strobilanthes flaccidifolius* Nees. and *Indigofera tinctoria* Linn. *International Journal Plant Physiology Biochemistry*. **2011**, 3(5), 108-116.
108. Mak, N. K., Leung, C. Y., Wei, X. Y., Shen, X. L., Wong, R. N. S., Leung, K. N., Fung, M. C. Inhibition of RANTES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*. **2004**, 67(1), 167-174.
109. Kunikata, T., Tatefuji, T., Aga, H., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *European Journal of pharmacology*. **2000**, 410(1), 93-100.
110. Aobchey, P., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T. Simple purification of indirubin from *Indigofera tinctoria* Linn. and inhibitory effect on MCF-7 human breast cancer cells. *Chiang Mai Journal Science*. **2007**, 34(3), 329-337.
111. Eisenbrand, G., Hippe, F., Jakobs, S., Muehlbeyer, S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*. **2004**, 130(11), 627-635.
112. Gan, W. J., Yang, T., Wen, S., Liu, Y., Tan, Z., Deng, C., Liu, M. Studies on the mechanism of indirubin action in the treatment of chronic myelocytic leukemia (CML). II. 5'-Nucleotidase in the peripheral white blood cells of CML. *Chinese Academy Medical Sciences Beijing*. **1985**, 6, 611-613.
113. Jao, C. W., Lin, W. C., Wu, Y. T., Wu, P. L. Isolation, structure elucidation, and synthesis of cytotoxic tryptanthrin analogues from *Phaius mishmensis*. *Journal of Natural Products*. **2008**, 71(7), 1275-1279.
114. Tucker, A. M., Grundt, P. The chemistry of tryptanthrin and its derivatives. *ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry*. **2012**, (1), 546-569
115. Motoki, T., Takami, Y., Yagi, Y., Tai, A., Yamamoto, I., Gohda, E. Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by tryptanthrin. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. **2005**, 28(2), 260-266.
116. Kimoto, T., Hino, K., Koya-Miyata, S., Yamamoto, Y., Takeuchi, M., Nishizaki, Y., Kurimoto, M. Cell differentiation and apoptosis of monocytic and promyelocytic leukemia cells (U-937 and HL-60) by

- tryptanthrin, an active ingredient of *Polygonum tinctorium* Lour. *Pathology International*. **2001**, 51(5), 315-325.
117. Koya-Miyata, S., Kimoto, T., Micallef, M. J., Hino, K., Taniguchi, M., Ushio, S., Kurimoto, M. Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors by a crude ethyl acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour. *Anticancer Research*. **2001**, 21(5), 3295-3300.
 118. Olson, J. A., Terryn III, R. J., Stewart, E. L., Baum, J. C., Novak, M. J. New insight into the action of tryptanthrins against *Plasmodium falciparum*: Pharmacophore identification via a novel submolecular QSAR descriptor. *Journal Molecular Graphics and Modelling*. **2018**, 80, 138-146.
 119. Honda, G., Tabata, M. Isolation of antifungal principle tryptanthrin, from *Strobilanthes cusia* O. Kuntze. *Planta Medica*. **1979**, 36(1), 85.
 120. Yi-ning, Z.; Yan, Z.; Yun-Qiong, G.; Shi-Yun, W.; Wen-Ying, S.; Ming-Xiong, T. Novel Fe II and Co II complexes of natural product Tryptanthrin: Synthesis and binding with G-Quadruplex DNA. *Bioinorganic Chemistry Applications*. 2016
 121. Shankar, G. M., Antony, J., Anto, R. J. Quercetin and tryptanthrin: two broad spectrum anticancer agents for future chemotherapeutic interventions. *Enzymes. Academic Press*. **2015**, 37, 43-72.
 122. Motoki, T., Takami, Y., Yagi, Y., Tai, A., Yamamoto, I., Gohda, E. Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by tryptanthrin. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. **2005**, 28(2), 260-266.
 123. Abou-Zied, O. K., Al-Busaidi, B. Y., Husband, J. Solvent effect on anthranilic acid spectroscopy. *Journal Physical Chemistry A*. **2013**, 118(1), 103-109.
 124. Rio, G. F., Silva, B. V., Martinez, S. T., Pinto, A. C. Anthranilic acids from isatin: an efficient, versatile and environmentally friendly method. *Annals Brazilian Academy Sciences*. **2015**, 87(3), 1525-1529.
 125. Zou, P., Koh, H. L. Determination of indican, isatin, indirubin and indigotin in *Isatis indigotica* by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2007**, 21(7), 1239-1246.
 126. Angelini, L. G., Campeol, E., Tozzi, S., Gilbert, K. G., Cooke, D. T., John, P. A New HPLC-ELSD method to quantify Indican in *Polygonum tinctorium* L. and to evaluate β -Glucosidase hydrolysis of indican for indigo production. *Biotechnology Progress*. **2003**, 19(6), 1792-1797.
 127. Brito da Silva, I., Lima, R.I., de Leite, L.R.M., Oliveira, L.E., de Madeiros, L.P., Leite, P.S. Antibacterial and antifungal activities of indican (indoxyl β -D-glucoside). *African Journal Pharmacy Pharmacology*. **2016**, 10(11), 200-2005