



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Terra uberrima, mens aperta.

Campus Tuxtepec

División de Estudios de Posgrado

Estudio fitoquímico del extracto etanólico de la planta

Coccocypselum hirsutum

TESIS

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

PRESENTA

Ana Karen Díaz Mora

Director: Dr. Omar Viñas Bravo

Co-directora: Dra. Alma X. Avila Alejandre

San Juan Bautista Tuxtepec, 2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2019/MCQ/002
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 28 de enero de 2019

C. ANA KAREN DÍAZ MORA

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.

Dr. Francisco Daniel Díaz Coutiño	UNPA	Presidente
Dr. Omar Viñas Bravo	UNPA	Vocal
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	UNPA	Secretario
Dr. Lemuel Pérez Picaso	UNPA	1er Suplente
Dra. Hermenegilda Moreno Díaz	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C c.p. Dr. Omar Viñas Bravo – Director de tesis
C c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares
C c.p. Archivo

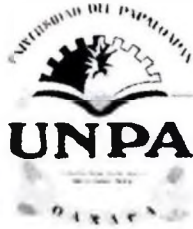
CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/085
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 28 de febrero de 2019

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 en Ciencias Químicas de la **C. Ana Karen Díaz Mora**, matrícula **16130004**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Estudio fitoquímico del extracto etanólico de la planta *Coccocypselum hirsutum***" 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, chi ji jú



Dr. Adolfo López Torres
de la División de Estudios de Posgrado

C c p C Ana Karen Diaz Mora
C c.p. Archivo

A mis queridos hijos Bastian y Dante

Al gran amor de mi vida Omar

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 **615644** 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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Omar Viñas Bravo y a la Dra. Alma X. Avila Alejandre, por su dirección, enseñanza y tiempo dedicado en la realización de este trabajo.

En especial al Dr. Miguel Ángel Peña Rico por todo su apoyo, observaciones, sugerencias y sobre todo paciencia en la determinación de la actividad antiproliferativa presentada en esta investigación.

A los revisores de tesis, los doctores: Hermenegilda Moreno Díaz, Lemuel Pérez Picaso, Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, y Francisco Daniel Díaz Coutiño por todo el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de generación Edgar, Brenda, Yunuen, Tere, Mich, Yureli y Félix, por todos los momentos vividos y experiencias compartidas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	viii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	ix
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. El uso de las plantas medicinales	3
2.2. Metabolitos secundarios	4
2.3. Antioxidantes	5
2.4. Rubiaceae	7
2.5. Género <i>Coccocypselum</i>	8
2.5.1. Descripción taxonómica.....	8
2.5.2. Usos tradicionales del género <i>Coccocypselum</i>	9
2.5.3. <i>Coccocypselum hirsutum</i>	11
3. ANTECEDENTES.....	13
3.1. Antecedentes fitoquímicos de <i>Coccocypselum hirsutum</i>	13
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. HIPÓTESIS.....	15
6. OBJETIVOS	16
6.1. Objetivo general.	16
6.2. Objetivos particulares.....	16
7. EQUIPOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS	17
7.1. Fundamento de los métodos antioxidantes de DPPH y ABTS	19
7.2. Fundamento del método MTT	23
8. METODOLOGÍA.....	25
8.1. Recolección de la planta.....	26
8.2. Secado	27
8.3. Preparación de extractos vegetales.....	27
8.3.1. Extracción etanólica asistida por ultrasonido de frutos.....	29
8.3.2. Extracción etanólica asistida por ultrasonido de hojas, tallos y raíces	31
8.3.3. Extracción líquido-líquido.....	31
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
9.1. Cromatografía en capa fina	33

9.2. Determinación de la actividad antioxidante	36
9.2.1. Método del DPPH'	37
9.2.2. Método del ABTS ^{•+}	41
9.3. Actividad antiproliferativa	43
9.3.2. Método de MTT	43
9.4. Purificación cromatográfica.....	45
9.4.1. Asperulósido (1).....	46
9.4.2. Determinación de la actividad antiproliferativa del asperulósido por MTT	57
9.4.3. Aislamiento e identificación de antocianinas	59
9.4.4. Pentaacetato de glucosa (3) y diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).	69
9.4.5. β -caroteno (5)	76
9.4.6. β -sitosterol (6)	78
10. CONCLUSIONES	81
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras del taxol y artemisinina extraídos de la corteza del tejo del pacífico y del ajeno dulce, respectivamente.	1
Figura 2. Ejemplos de metabolitos secundarios de extraordinaria complejidad y que habitualmente la naturaleza biosintetiza bajo ciertas condiciones de estrés.	5
Figura 3. Metabolitos secundarios que presentan actividad antioxidante y que contrarrestan el efecto de los radicales libres previniendo el estrés oxidativo implicado en diversas enfermedades crónico degenerativas.	6
Figura 4. Morfología general de las plantas del género <i>Coccocypselum</i> , A, rama con inflorescencias. B, nudo con estípula y base de los pecíolos. C-E, flor. F, fruto maduro. G, semilla (cara ventral).....	9
Figura 5. Distribución geográfica del género <i>Coccocypselum hirsutum</i>	11
Figura 6. <i>Coccocypselum hirsutum</i> presente en los jardines de la Universidad del Papaloapan, a) detalle de la inflorescencia, b) aspecto general de la planta, c) característica del tallo y d) detalle de los frutos.	12
Figura 7. a) Absorbancia del DPPH [•] en metanol a 517 nm, b) reducción del DPPH [•] por acción de un antioxidante.	20
Figura 8. Reacción de neutralización del DPPH [•] frente al ácido ascórbico. Dos moléculas de DPPH [•] reaccionan con el AA y forman dos moléculas de DPPH-H y al ácido dehidroascórbico.	21
Figura 9. Mecanismo de activación del ABTS con persulfato de potasio para formar al ABTS ^{•+} y su reacción frente a un agente antioxidante.....	22
Figura 10. a) El ABTS presenta un máximo de absorción a $\lambda = 342$ (fuera de escala), b) el ABTS ^{•+} presenta máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm, c) desactivación del ABTS ^{•+} por acción de trolox a diferentes concentraciones.	23
Figura 11. Mecanismo de reducción del MTT y formación de formazano.....	24

Figura 12. a) Reducción enzimática del MTT por parte de las células presenta máximos de absorción entre 500 y 600 nm, b) El MTT disuelto en PBS presenta un máximo de absorción a 380 nm.	24
Figura 13. Recolección de planta y frutos de <i>Coccocypselum hirsutum</i>	27
Figura 14. EEAU de frutos con etanol grado técnico destilado.	29
Figura 15. Comparación de extractos de frutos obtenidos por EEAU; izquierda, extracto con etanol absoluto; derecha, extracto con EtOH/H ₂ O, 1:1.	30
Figura 16. Diagrama general del procedimiento de extracción líquido-líquido realizado al extracto crudo de hojas, tallos y raíces	32
Figura 17. CCF de la EEAU de frutos con EtOH grado técnico, utilizando un sistema CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 9:1.	33
Figura 18. Análisis por CCF del extracto de frutos con EtOH absoluto frente al extracto EtOH/H ₂ O.	34
Figura 19. Placas cromatográficas (CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 8:2), izquierda revelada a 254 nm; derecha, revelada por calentamiento previo tratamiento vainillina-H ₂ SO ₄ . a) asperulósido puro; b) extracto etanólico de frutos.	47
Figura 20. Estructura del iridoide asperulósido (1) aislado de frutos y planta de <i>Coccocypselum hirsutum</i>	47
Figura 21. Placa cromatográfica de las fracciones de agua (FA) y <i>n</i> -butanol (FB) utilizando como referencia asperulósido, (CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 9:1).	48
Figura 22. Experimento de RMN de ¹ H_Presat del asperulósido (1); para una mejor visualización se expanden las señales de los protones H-3, H-6, H-1', H-10, H-6', H-5 y H-9.	49
Figura 23. Experimento TOCSY del asperulósido (1), se observa a través de las líneas punteadas la correlación de los protones de la cadena carbonada de la glucosa.	49
Figura 24. Experimento de RMN de ¹³ C para el asperulósido (1); Se observan 18 señales de carbono correspondientes para su estructura.	50

Figura 25. Experimento gHSQC para el asperulósido (1); se observan las correlaciones directas entre los protones y sus respectivos carbonos.	51
Figura 26. Correlación de los protones H-10, H-5, H-3 y H-1 del asperulósido (1) que se observan en el experimento gHMBC.	52
Figura 27. Experimento gHMBC de asperulósido (1); se observa con línea azul las correlaciones a dos y tres enlaces entre los protones y carbonos claves para la determinación estructural de 1.	52
Figura 28. Espectro de masas para el asperulósido (1).	55
Figura 29. Espectro de UV-Vis para el asperulósido (1) en MeOH.	55
Figura 30. Espectro de IR para el iridoide asperulósido (1).	56
Figura 32. Izquierda, pigmento en solución hidroalcohólica; derecha, pigmento después de eliminar la mezcla de disolventes.	59
Figura 33. Extracto hidroalcohólico de los frutos de la yerba de guava; a) pH ácido, b) pH neutro.	60
Figura 34. Estructura básica de las antocianinas, ion flavilio.	60
Figura 35. Antocianidinas más comunes en las plantas.	61
Figura 36. Transformaciones estructurales de cianidina-3-glucosa en soluciones ácidas a neutras y las diferentes posibilidades de enlace a iones metálicos (M^{n+})..	63
Figura 37. Izquierda, cromóforos responsables de la absorción en las regiones de UV (260-280 nm) y visible (490-550 nm); Derecha, bandas de absorción características para las antocianidinas, a) pelargonidina, b) cianidina, c) delphinidina, d) luteolinidina, e) apigeninidina, f) robinetinidina..	65
Figura 38. Espectro de absorción UV-Vis del extracto EtOH/H ₂ O de frutos y pigmento azul aislado por CC.	66
Figura 39. Efecto del pH sobre la $\lambda_{m\acute{a}x}$ de absorción (572 nm) del compuesto azul (2) aislado por CC del extracto hidroalcohólico de frutos, desplazándola a 530 nm en presencia de medio ácido.	67

Figura 40. Izquierda, adición de AgNO ₃ al extracto hidroalcohólico de los frutos; derecha, espectro UV-Vis de extracto hidroalcohólico de los frutos (azul, pH neutro; rojo, pH ácido) y posible formación de complejo con Ag ⁺¹ (café).	68
Figura 41. CCF de la mezcla de compuestos extraídos de la purificación por CC del extracto EtOH de frutos.	70
Figura 42. CCF de glucosa esterificada a) UV _{254 nm} , b) calentamiento previo tratamiento con KMnO ₄ y c) con H ₂ SO ₄ , (hexano/AcOEt, 7:3).....	70
Figura 43. Experimento de RMN de ¹ H de la mezcla de anómeros de pentaacetato de D-glucosa (3).....	71
Figura 44. Espectro de masas de la glucosa esterificada (3).	72
Figura 45. Izquierda, placas cromatográficas del compuesto aislado (R _f = 0.7, hexano/AcOEt, 8:2), a) UV _{254 nm} , b) KMnO ₄ y c) H ₂ SO ₄ ; derecha, estructura del diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).....	72
Figura 46. Espectro de RMN de ¹³ C para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).	73
Figura 47. Experimento gHSQC para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4)	74
Figura 48. Experimento gHMBC para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).	74
Figura 49. Espectro MS ESI-TOF para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).	75
Figura 50. Izquierda, CCF del compuesto aislado en la fracción de hexano contra β-caroteno comercial (Hexano/AcOEt, 9.5:0.5); derecha, estructura del β-caroteno (5).....	76
Figura 51. Espectro de absorción del UV-Vis del a) β-caroteno aislado de la fracción de hexano y b) espectro del β-caroteno reportado en la literatura.	77

Figura 52. Izquierda, CCF de la fracción de hexano frente a estándar de β -sitosterol revelada por calentamiento previo tratamiento de H_2SO_4 (Hexano/AcOEt, 8:2); derecha, estructura del β -sitosterol (6).	78
Figura 53. Espectro de 1H del β -sitosterol (6) aislado de las fracciones de hexano y AcOEt.	79
Figura 54. Espectro de ^{13}C del β -sitosterol (6) aislado de las fracciones de hexano y AcOEt.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica encontrados en algunas especies de la familia de las Rubiaceae.....	7
Tabla 2. Algunos usos tradicionales y nombres comunes para especies del género <i>Coccocypselum</i> descritas en la literatura.	10
Tabla 3. Disolventes utilizados en la extracción líquido-líquido.	31
Tabla 4. Análisis por CCF de las fracciones obtenidas de la extracción líquido-líquido.	35
Tabla 5. Resultados obtenidos para la IC ₅₀ de las muestras analizadas, tomando como referencia el ácido ascórbico.....	40
Tabla 6. Resultados obtenidos por el método ABTS de las muestras analizadas, tomando como referencia el ácido ascórbico.	41
Tabla 7. Compuestos aislados y/o identificados de <i>Coccocypselum hirsutum</i>	46
Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN del iridoide asperulósido (1) (CD ₃ OD).....	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cinética de reacción del DPPH [•] frente al extracto crudo de hojas, tallos y raíces y de sus fracciones en función del tiempo a una concentración de 1 mg/mL. $n=3$	38
Gráfica 2. Inhibición del DPPH [•] por el extracto crudo de hojas, tallos y raíces y de sus fracciones en función del tiempo, a una concentración de 1 mg/mL. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar, $^a p < 0.005$ vs E. Crudo, $n=3$	39
Gráfica 3. Curva estándar de ácido ascórbico a diferentes concentraciones: 0.0006, 0.0015, 0.003, 0.0045 y 0.006 mg/mL, en función del tiempo (6 min), $n=3$	42
Gráfica 4. Inhibición de ABTS ^{•+} por el extracto etanólico de frutos y las fracciones derivadas del extracto de hojas, tallos y raíces, a una concentración de 10 mg/mL. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar $^a p < 0.005$ vs b, c, d, e; $^b p < 0.005$ vs a, c, d, e; $^c p < 0.005$ vs a, b, d, e; $n=6$	42
Gráfica 5. Ensayo de viabilidad en células de cáncer de mama (MCF-7) evaluadas frente a las F. AcOEt, F. <i>n</i> -BuOH, y F. Acuosa. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar. a) $^a p \leq 0.05$ vs control, b) $^b p \leq 0.05$ vs control, $n=6$	44
Gráfica 6. Viabilidad del asperulósido (1) frente a la línea celular MCF-7 a una concentración de 1, 0.500, 0,250, 0.125, 0.065, 0.032 mg/mL. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar $^* p \leq 0.05$ vs control, $n=6$	59

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Abs	Absorbancia
AA	Ácido ascórbico
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
AH	Agente antioxidante
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
VCEAC	Capacidad antioxidante equivalente de la vitamina C
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de trolox
CARO	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
CRHF	Capacidad para reducir el hierro férrico
ABTS ^{•+}	Catión radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico)
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CG	Cromatografía de gases
CCF	Cromatografía en capa fina
CCF-FR	Cromatografía en capa fina en fase reversa
CC	Cromatografía en columna
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
δ	Desplazamiento químico

DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
COSY	Espectroscopia de correlación
TOCSY	Espectroscopia total correlacionada
MAE	Extracción asistida por microondas
SFE	Extracción de fluidos supercríticos
EEAU	Extracción etanólica asistida por ultrasonido
R _f	Factor de retención
°C	Grados centígrados
Hz	Hertz
HSQC	Heteronuclear coherencia cuántica única
HMBC	Heteronuclear coherencia de enlaces múltiples
ESI	Ionización por electronebulización
λ	Longitud de onda
CD ₃ OD	Metanol deuterado
nm	Nanómetro
LUMO	Orbital molecular desocupado más bajo
HOMO	Orbital molecular más alto ocupado
OMS	Organización mundial de la salud
PATAR	Parámetro antioxidante total de atrapamiento de radicales

ppm	Partes por millón
w/v	Peso/volumen
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ATR	Reflexión total atenuada
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta- Visible
uma	Unidad de masa atómica

RESUMEN

En este trabajo se reporta la purificación y elucidación estructural de compuestos obtenidos del extracto etanólico de frutos y planta (hojas, tallos y raíces) de la yerba de guava (*Coccocypselum hirsutum*), especie recolectada en las instalaciones de la Universidad del Papaloapan, *campus* Tuxtepec, Oaxaca. En este estudio, se aisló e identificó al iridoide asperulósido tanto en los frutos como en el resto de la planta; el extracto hidroalcohólico de los frutos permitió identificar la presencia de antocianinas. En los frutos, además del iridoide y de la antocianina, se aislaron glucosa y el diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano; mientras que en el resto de la planta se aisló y caracterizó al β -caroteno y β -sitosterol.

La identificación estructural de estos compuestos se realizó a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos. A las fracciones obtenidas del extracto etanólico tanto de los frutos como del resto de la planta se les determinó la actividad antioxidante, mediante los métodos *in vitro* DPPH^{*} y ABTS⁺. La mayor actividad antioxidante se obtuvo en la fracción de *n*-BuOH (IC₅₀ 0.190 mg/mL), seguida de la de AcOEt (IC₅₀ 0.230 mg/mL), y finalmente de la fracción acuosa (IC₅₀ 0.532 mg/mL).

Se realizó la evaluación preliminar del efecto antiproliferativo de tres fracciones del extracto etanólico de la planta entera y un compuesto aislado (asperulósido). Las fracciones al 5% de extracto exhibieron un perfil antiproliferativo significativo (28.83%, 40.15% y 35.04% de células vivas respectivamente) en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Así mismo, el iridoide asperulósido mostró mayor actividad antiproliferativa a 1 mg/mL, inhibiendo poco más del 79% de células cancerígenas (MCF-7). Con base en los resultados obtenidos se ha identificado a esta planta como una nueva fuente natural de asperulósido y de agentes antioxidantes, con potencial aplicación en alimentos o en la industria farmacéutica.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son una fuente importante de compuestos con actividad contra diferentes enfermedades, a partir de estos se han desarrollado y comercializado fármacos.¹ Existen muchos ejemplos de sustancias extraídas de especies vegetales que se comercializan exitosamente; el taxol y la artemisinina son sólo dos ejemplos de fármacos que se usan con gran eficacia como anticancerígeno y contra el paludismo respectivamente (Figura 1).²

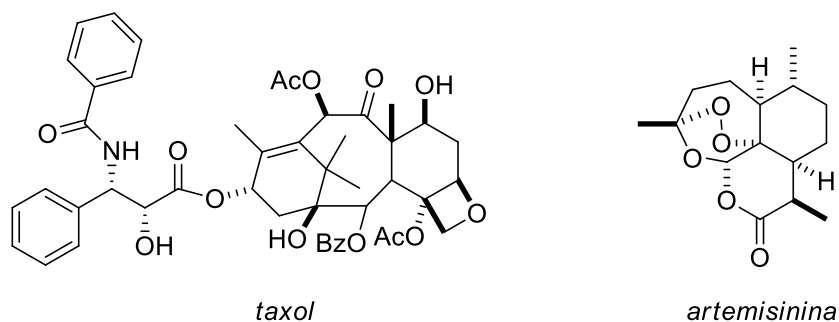


Figura 1. Estructuras del taxol y artemisinina extraídos de la corteza del tejo del pacífico y del ajeno dulce, respectivamente. (Modificado de Wani, 1971 y Klayman, 1985)²

Se estima que cerca del 70% de los fármacos que hay en el mercado tienen alguna relación directa con productos naturales.³ Actualmente, las compañías farmacéuticas tienen la capacidad de evaluar hasta 100,000 compuestos por día, pero esto no se traduce en un incremento de los medicamentos lanzados al mercado; de cada 30,000 compuestos evaluados en animales, sólo uno llega a comercializarse. Lo anterior es un proceso sumamente complejo que puede tomar al menos 15 años y tener un costo de más de \$1,500 millones de dólares por cada fármaco que sale al mercado,⁴ lo anterior se refleja en los costos elevados de algunos fármacos, derivado de esto, la medicina tradicional se convierte en una opción para cubrir las necesidades de atención primaria de salud de los sectores más pobres de la población.⁵

Las terapias basadas en el uso de plantas han adquirido gran popularidad debido a que son más económicas y accesibles, gozan de reconocimiento popular con toda su carga de experiencia práctica, tradiciones, usos y costumbres. A algunas especies vegetales se les han atribuido facultades curativas para un gran número de enfermedades, sin embargo, es importante que las plantas usadas sean estudiadas

con el fin de evaluar los riesgos de su consumo y de su uso potencial como fuente de principios activos en medicamentos o en la medicina tradicional. Existen plantas utilizadas en la medicina tradicional cuya utilidad farmacológica se debe precisamente a estos principios activos.

Entre las plantas destaca la familia Rubiaceae, conformada por más de 600 géneros, siendo el *Coffea* el más representativo de esta. Algunas especies de esta familia exhiben importantes actividades biológicas, por ejemplo, la especie *Cinchona officinalis* cuya corteza es usada en el tratamiento de la malaria y el paludismo. Dentro de esta gran familia se encuentra el género *Coccocypselum*, el cual es usado en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de la piel, problemas pulmonares, enfermedades urogenitales y contra cólicos, sin embargo, son limitados los estudios fitoquímicos de este género.

En las instalaciones de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, Oaxaca, se encuentra la planta *Coccocypselum hirsutum*, conocida comúnmente como “yerba de guava”. En Tuxtepec esta especie es prácticamente desconocida para la mayoría de la población, una referencia verbal indica su uso como cicatrizante. Cabe destacar que sólo se encontró una referencia bibliográfica del uso en México de una especie de *Coccocypselum* como planta medicinal.

En el presente trabajo se reporta por primera vez un estudio fitoquímico del extracto etanólico de la planta *Coccocypselum hirsutum*. El aislamiento y caracterización de los metabolitos que se obtuvieron de la planta se realizaron por medio de técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas. Además, se estudió y determinó la actividad antioxidante del extracto etanólico a través de dos ensayos *in vitro* basados en la capacidad captadora del DPPH[•] y del ABTS^{•+}. También, se determinó el efecto antiproliferativo por medio del ensayo de viabilidad celular con el método MTT frente a la línea celular MCF-7.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. El uso de las plantas medicinales

Las plantas medicinales contienen principios activos que ejercen una acción farmacológica, benéfica o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial es servir como droga o medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades, su uso ha estado presente en la mayoría de las culturas que formaron y forman parte del mundo. Se estima que de las 270,000 especies de plantas que se conocen actualmente a nivel mundial solo el 10% se consideran medicinales.^{6,7}

La medicina tradicional es una práctica que no ha caído en desuso y a la fecha sigue desempeñando un papel esencial en el cuidado de la salud. La OMS estima que el 80% de la población mundial recurre a remedios herbolarios tradicionales. En este contexto, México cuenta con una enorme diversidad vegetal, además posee una gran riqueza cultural, el conocimiento y aprovechamiento de las plantas con fines medicinales deriva desde épocas prehispánicas y prueba de ello es el manuscrito azteca “Códice de la Cruz-Badiano” escrito en 1552 que contiene 251 descripciones de plantas y sus usos médicos. Actualmente se considera que aproximadamente el 78% de las plantas que se usan por la medicina tradicional son para tratar enfermedades cardiovasculares, infecciones respiratorias e incluso el cáncer. En un reciente estudio realizado por el Instituto Nacional Indigenista (INI), se reportan más de 3,015 especies de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de enfermedades comunes en México. Sin embargo, aun cuando la herbolaria mexicana refiere el uso de varias plantas para el tratamiento de diversas enfermedades, son pocos los estudios fitoquímicos de las especies usadas. El número es aún menor en la identificación de metabolitos activos en patologías de alto impacto social y económico.^{8,9,10}

De los estados de la República Mexicana, Oaxaca es el de mayor importancia etnobotánica, reportando 8,431 especies de plantas vasculares que representan aproximadamente el 40% de la flora vascular de México.

2.2. Metabolitos secundarios

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico; sintetizan enzimas para inactivar tóxicos de origen microbiano, desarrollan estructuras (espinas, pelos glandulares y espigas) y producen metabolitos secundarios con propiedades tóxicas para defensa contra depredadores.¹¹

Los metabolitos secundarios representan una expresión de la individualidad de las especies, la presencia, disponibilidad y la diversidad estructural de estos varían según las condiciones ambientales y en muchos de los casos, la función y beneficio para la planta aún se desconoce. Si bien, se menciona que no son esenciales para la supervivencia de las plantas, son indispensables ya que regulan las interacciones entre plantas, con microorganismos, insectos y animales, actuando como sustancias tóxicas para su defensa o como compuestos volátiles responsables de la atracción de polinizadores, al mismo tiempo, otros metabolitos contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la planta.¹²

En la actualidad se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos secundarios, por su composición química son clasificados en dos grupos principales; nitrogenados y no nitrogenados. Los compuestos que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides como ácidos grasos, terpenos, esteroides, flavonoides, fenilpropanoides y carbohidratos de existencia restringida (Figura 2).⁶

Es importante destacar que los metabolitos secundarios también reciben la denominación de productos naturales, debido a la complejidad química o estructural que poseen tienen un importante y significativo valor medicinal y económico (proveen la mayoría de los productos naturales farmacológicamente activos). Un gran número de estos se utilizan como fármacos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, entre otros.¹³

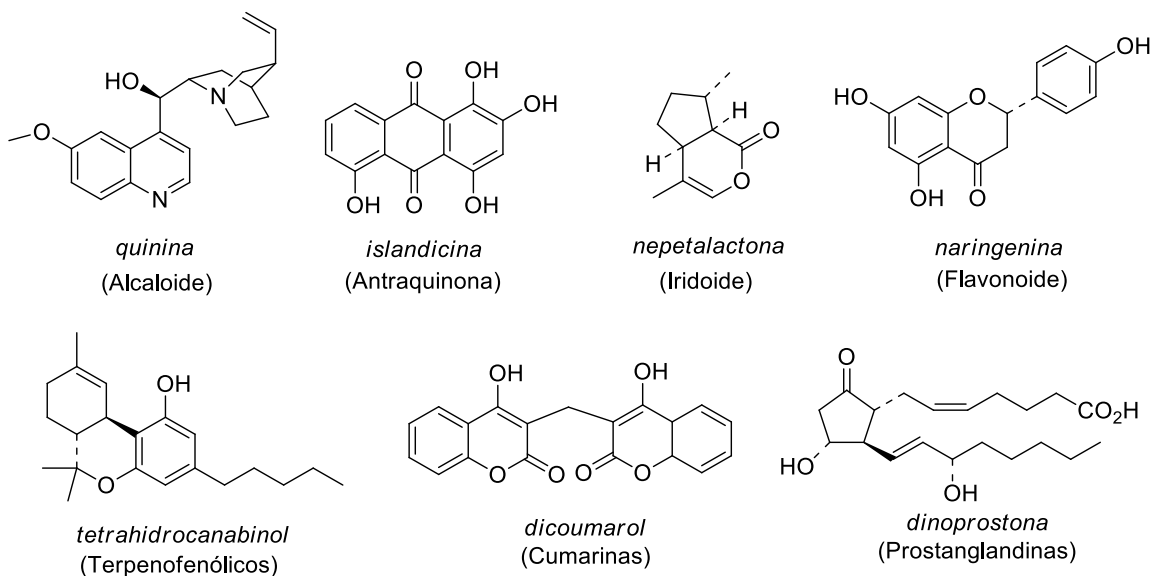


Figura 2. Ejemplos de metabolitos secundarios de extraordinaria complejidad y que habitualmente la naturaleza biosintetiza bajo ciertas condiciones de estrés. (Modificado de *Medicinal Natural Products*)⁷

En los últimos años, el papel de algunos metabolitos secundarios como constituyentes protectores de la salud se ha convertido en un área cada vez más importante en la investigación, por lo que se están considerando a las plantas desde una nueva perspectiva, considerándolas por los constituyentes que pueden ejercer distintas actividades biológicas y producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo.^{14,15}

2.3. Antioxidantes

Diversas reacciones bioquímicas en nuestro cuerpo generan especies reactivas de oxígeno, las cuales son capaces de dañarlo. Si estas especies no son captadas eficientemente, pueden ocasionar enfermedades. Sin embargo, la acción de los radicales libres puede ser bloqueada por sustancias antioxidantes, las cuales captan los radicales libres detoxificando el organismo. Investigaciones recientes sobre los radicales libres han confirmado que los alimentos ricos en antioxidantes juegan un papel esencial en la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, cancerígenas, así como también inflamaciones y problemas ocasionados por el envejecimiento celular. El interés en identificar extractos de plantas con el fin de encontrar nuevos

compuestos antioxidantes que controlen el daño oxidativo se ha intensificado en los últimos años. En este sentido, las plantas y sus diferentes extractos han demostrado ser una fuente importante de compuestos con marcada actividad antioxidante.¹⁶

Se han identificado a varias familias de compuestos con propiedades antioxidantes, entre los que destacan los polifenoles, fitoestrógenos y carotenoides. En los polifenoles se encuentran los flavonoides, taninos, antocianidinas, catequinas y los citroflavonoides; en los fitoestrógenos sobresalen las isoflavonas, estilbenos, lignanos y cumestanos; respecto a los carotenoides, resaltan el licopeno y el β -caroteno (Figura 3).

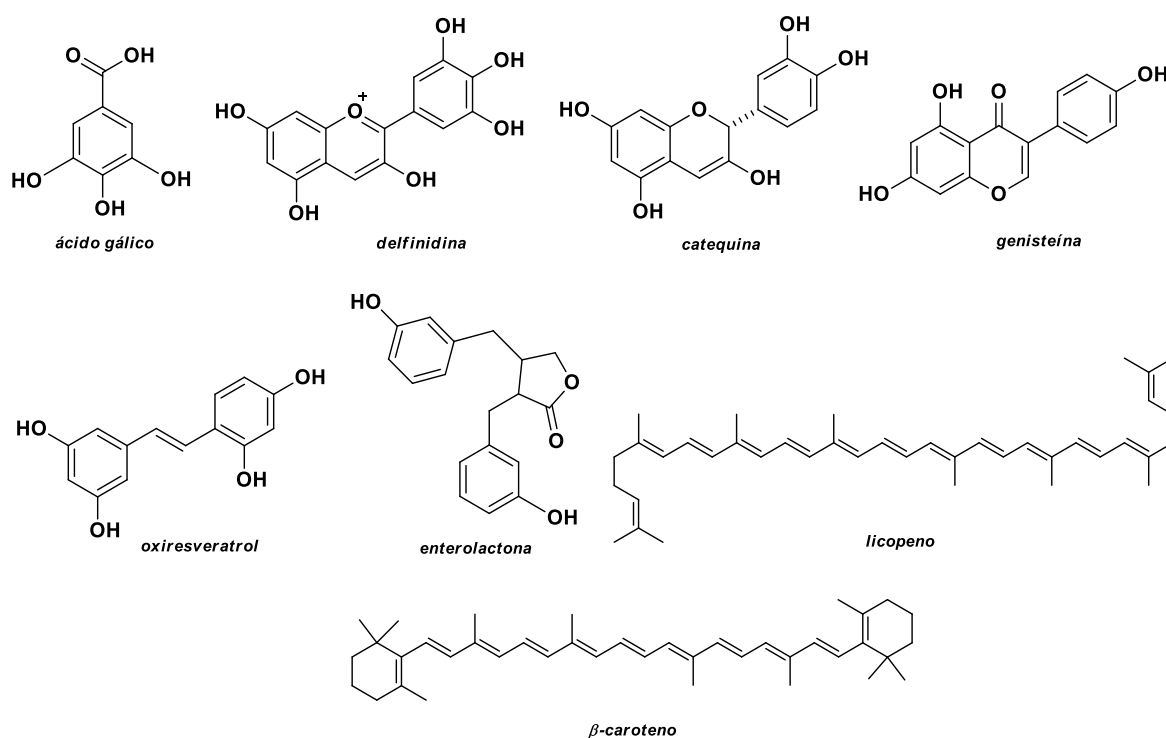


Figura 3. Metabolitos secundarios que presentan actividad antioxidante y que contrarrestan el efecto de los radicales libres previniendo el estrés oxidativo implicado en diversas enfermedades crónico degenerativas.

2.4. Rubiaceae

La familia de las Rubiaceae es la cuarta más grande entre las fanerógamas contando con 630 géneros y 10,200 especies.¹⁷ La mayoría de ellas viven en la región tropical y juegan un papel importante en la vegetación de las zonas calientes. La diversidad de la familia todavía no se ha explorado por completo, solamente en el área del Caribe en los últimos veinte años se han descrito más de 100 especies nuevas. De la totalidad de especies, son muy pocas las que se utilizan como plantas estimulantes o medicinales, otras se utilizan en la producción de tintes, productos comestibles o maderables y como plantas ornamentales son muy apreciadas por el colorido de sus flores, follaje y olor de las especies de los géneros *Gardenia*, *Hamelia* y las *Ixoras*.¹⁸

Tabla 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica encontrados en algunas especies de la familia de las Rubiaceae.

Especie	Metabolitos secundarios
<i>Uncaria</i> , <i>Psychotria</i> , <i>Hedyotis</i> , <i>Ophiorrhiza</i> y <i>Morinda</i> ¹⁹	Iridoides, antraquinonas, triterpenos, alcaloides indólicos
<i>Ladenbergia hexandra</i> ²⁰	Glicósidos triterpenos
<i>Magnolia obovata</i> ²¹	Lignanos
<i>Morinda parvifolia</i> ²²	Antraquinonas, hidroquinonas
<i>Gardenia urvillei</i> ²³	Triterpenos
<i>Palicourea crocea/padifolia</i> ²⁴	Alcaloides, iridoides
<i>Rauvolfia nukuhivensis</i> ²⁵	Alcaloides indólicos
<i>Salvia viridis</i> ²⁶	Terpenoides, flavonoides y derivados de ácido cafeico
<i>Mitragyna diversifolia</i> ²⁷	Monoterpenos, alcaloides indólicos
<i>Tabernaemontana litoralis</i> ²⁸	Monoterpenos, alcaloides indólicos
<i>Galianthe thalictroides</i> ²⁹	Ciclopéptidos
<i>Pentas lanceolata</i> ³⁰	Iridoides

Estudios reportados sobre los constituyentes de esta familia muestran una gran diversidad de metabolitos como antraquinonas, naftoquinonas, flavonoides y sus glicósidos, iridoides, alcaloides y triterpenos entre otros, en la tabla 1 se detallan algunas referencias donde se reportan los tipos de metabolitos secundarios de la familia Rubiaceae. Dentro de la familia Rubiaceae se encuentra el género *Coccocypselum*, hay reportes de que se usa en la medicina tradicional en algunas regiones del continente americano, principalmente en las zonas tropicales.

2.5. Género *Coccocypselum*

2.5.1. Descripción taxonómica

Coccocypselum es un género de 65 especies de plantas con flores perteneciente a la familia Rubiaceae, se encuentran distribuidas por las regiones tropicales de América. Son hierbas perennes, inermes, terrestres, frecuentemente postradas o reptantes. Todas las especies son herbáceas, con frutos de color azul o púrpura, generalmente huecos, presentan semillas numerosas plano-convexas, hojas opuestas pecioladas, con frecuencia moradas en el envés, tallos peciolados y flores de corola teñidas de azul, morado o blanco con cuatro pétalos (Figura 4).³¹

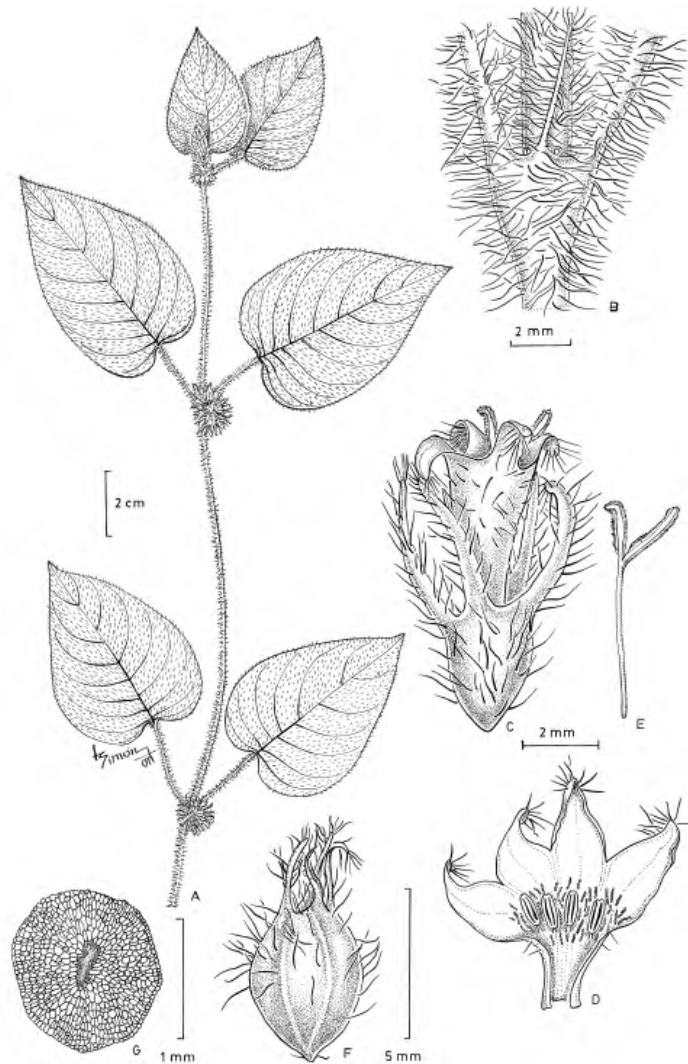


Figura 4. Morfología general de las plantas del género *Coccyzselum*, A, rama con inflorescencias. B, nudo con estípula y base de los peciolo. C-E, flor. F, fruto maduro. G, semilla (cara ventral). (Tomada de Cabral et al, 2007)³²

2.5.2. Usos tradicionales del género *Coccyzselum*

A nivel continente, hay reportes del uso en la medicina tradicional del género *Coccyzselum*, en la tabla 2 se enlistan algunas de las especies y se describe el uso que tiene de acuerdo a datos de la literatura.

Con lo que respecta a México, en el estado de Veracruz sólo se ha encontrado un reporte de la especie *Coccyzselum guianense* en referencia de su uso medicinal.³³

Tabla 2. Algunos usos tradicionales y nombres comunes para especies del género *Coccocypselum* descritas en la literatura.

Especie	Nombre común	Ubicación	Usos
<i>Coccocypselum hirsutum</i> ³⁴	Coquito	Colombia	Contra la despigmentación de la piel
<i>Coccocypselum hirsutum</i> ³⁵	Huevo de indio	América tropical	Problemas urogenitales, enfermedades venéreas, problemas uterinos
<i>Coccocypselum guianense</i> ³²	Yerba del cólico	Veracruz	Catarro, debilidad y cólico
<i>Coccocypselum hirsutum</i> ³⁶	Yerba de guava	México	---
<i>Coccocypselum lanceolatum</i> ³⁷	Coquito	Colombia	anti-inflamatorio en mordeduras de serpientes
<i>Coccocypselum lanceolatum</i> ³⁸	Fruta de corocoxó, piririca	Brasil	Sugieren su uso como colorante de alimentos
<i>Coccocypselum hispidulum</i> ³⁹	---	Colombia	Antidiarreico; Aliviar dolores abdominales
<i>Coccocypselum lanceolatum</i> ³⁰	---	Colombia	Para tratar la rajadura de pezones
<i>Coccocypselum</i> [*] <i>hirsutum</i>	Berenjenita [*]	Oaxaca [*]	Cicatrizante [*]

*Comunicación personal

2.5.3. *Coccocypselum hirsutum*

La especie *Coccocypselum hirsutum* se encuentra en el interior de selvas húmedas y bosques húmedos y estacionales (Figura 5). Se ha identificado a esta especie en México (Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Veracruz), Colombia, Venezuela, Guyana, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Cuba, y Trinidad.



Figura 5. Distribución geográfica del género *Coccocypselum hirsutum*. (Tomada de <http://florawww.eeb.uconn.edu>)

De acuerdo a su ubicación, *Coccocypselum hirsutum* varía en longitud, distribución y densidad de la pelosidad, en la forma y el tamaño de la hoja y en el desarrollo de los pedúnculos. Algunos sinónimos de la especie son *Coccocypselum glabrum*, *Tontanea glabra* y *Tontanea hirsuta*. Además, dependiendo de su ubicación, se le conoce comúnmente como coquito, huevo de indio; en México se le conoce como “yerba de guava” (Figura 6). Algunos de sus usos incluyen el tratamiento de problemas pulmonares, problemas urinarios, para tratar la malaria y lavar heridas.



Figura 6. *Coccocypselum hirsutum* presente en los jardines de la Universidad del Papaloapan, a) detalle de la inflorescencia, b) aspecto general de la planta, c) característica del tallo y d) detalle de los frutos.

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes fitoquímicos de *Coccocypselum hirsutum*.

Son escasos los estudios fitoquímicos del género *Coccocypselum* y de sus especies, cabe destacar que en revistas especializadas y base de datos (Natural Products, Phytochemistry, Pubmed, Sciencedirect, etc.) solo se encontraron pocos reportes de estudios fitoquímicos del género *Coccocypselum* del cual uno pertenece a la especie de interés.

Para *Coccocypselum hirsutum* hasta el momento solo se han identificado cumarinas, y/o triterpenos a través de ensayos químicos en cromatografía en capa fina y en tubos de ensayo para esta especie mediante un “screening” fitoquímico preliminar, donde también se realizaron pruebas de actividad antimalárica del extracto etanólico reportando valores no significativos de actividad antimalárica.⁴⁰

En un segundo tamizado fitoquímico reportado para la especie *Coccocypselum lanceolatum* se detectaron mediante ensayos químicos alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos, cumarinas, cardiotónicos y lactonas terpénicas.³⁴ En otro estudio realizado a esta misma especie se reporta la actividad antioxidante del extracto metanólico de frutos; mostrando resultados moderados de capacidad antioxidante de Trolox (430.1 $\mu\text{mol ET/g}$), para la capacidad de absorción de oxígeno (359.6 $\mu\text{mol ET/g}$) y el contenido fenólico total (202.1 mg EAG/g). Así como el efecto del extracto sobre las enzimas relacionadas con el envejecimiento de la piel obteniendo resultados favorables de inhibición del 81.8% de la enzima colagenasa y 58% de la enzima tirosinasa.⁴¹

En otro estudio fitoquímico a través de cromatografía de gases se determina el porcentaje de ácidos grasos presentes en las hojas de *Coccocypselum guianense* reportando en mayor proporción los ácidos: palmítico (21.3%), linolénico (45.1%), y linoleico (21.7%).⁴²

Debido a los escasos estudios fitoquímicos para este género de plantas se llevó a cabo una investigación de los metabolitos secundarios identificados en la familia a la que pertenece (Tabla 1).

4. JUSTIFICACIÓN

Oaxaca es uno de los estados del país con mayor biodiversidad, además, cuenta con una de las tradiciones más ricas en cuanto al uso de plantas en la medicina tradicional. Diversas instituciones y organizaciones trabajan en la elaboración de compendios de plantas medicinales con el fin de preservar y difundir el conocimiento que se tiene de ellas. En muchas especies hay información de pruebas biológicas que validan su uso, en otras pocas hay reportes fitoquímicos que dan información sobre las familias de metabolitos presentes, y hay otras tantas especies sin ninguna información más que su uso tradicional. Se debe considerar que la diversidad de plantas en el estado es tal que, hay especies presentes que se usan en otras partes del mundo, pero no en la región y que se desconoce casi por completo de su existencia y de las propiedades que exhiben.

En las instalaciones de la UNPA campus Tuxtepec se encuentra una planta que se conoce en México como “yerba de guava” y cuyo nombre científico es *Coccocypselum hirsutum*, se usa en la medicina tradicional de Centro y Sudamérica y escasamente en el país, a la fecha no se han encontrado reportes de estudios fitoquímicos de estas plantas, por lo que se considera pertinente realizar un estudio para la identificación de los metabolitos secundarios presentes y llevar a cabo la evaluación de su actividad biológica, y de esta forma, contribuir al conocimiento de las plantas medicinales del estado de Oaxaca.

5. HIPÓTESIS

El estudio del extracto etanólico de la planta *Coccocypselum hirsutum* permitirá aislar metabolitos secundarios que presentaran actividad antioxidante, además, el fraccionamiento por extracción líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad permitirá identificar las fracciones que presenten mayor actividad antioxidante y citotóxica. La purificación cromatográfica de dichas fracciones facilitará la identificación de los metabolitos presentes, probables responsables de las actividades reportadas en la medicina tradicional.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general.

Aislar e identificar a los metabolitos secundarios y evaluar el potencial efecto antiproliferativo y antioxidante del extracto etanólico de la planta *Coccocypselum hirsutum*.

6.2. Objetivos particulares.

- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por extracción etanólica asistida por ultrasonido.
- Realizar la separación cromatográfica y elucidación estructural de los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por extracción etanólica asistida por ultrasonido.
- Evaluar el potencial efecto antiproliferativo de las fracciones obtenidas de las extracciones líquido-líquido.

7. EQUIPOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS

Secado del material vegetal

Para el secado de la planta y sus frutos se utilizó un horno de secado BINDER FD de convección forzada.

Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Para la extracción de los extractos vegetales se utilizó un baño ultrasónico BRANSON 1510R-MTH.

Extracción líquido-líquido

En la extracción líquido-líquido se emplearon disolventes destilados y grado técnico.

Concentrado de los extractos

Se utilizó un rotavapor BUCHI R-300 conectado a un baño con termostato BUCHI B-300, refrigerador recirculante BUCHI F-105 y una bomba de vacío BUCHI V-100.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor ALUGRAM G/UV₂₅₄ de Macherey-Nagel, y como fase móvil se usaron sistemas de elución de diferente polaridad. Para su revelado se empleó luz ultravioleta (254 y 365 nm, lámpara UVG-11) y por calcinación de las placas, previo tratamiento con diferentes reveladores (H₂SO₄, Vainillina, KMnO₄, etc.).

Cromatografía en columna

Para la cromatografía en columna, se emplearon como fase estacionaria gel de sílice de 230-400 mallas de Macherey-Nagel; como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes de diferente polaridad.

Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron adquiridos con un equipo VARIAN 400MR, a 400 MHz para espectros de ^1H y a 100 MHz para los espectros de ^{13}C . Se utilizaron disolventes deuterados (CDCl_3 , CD_3OD y DMSO-d_6) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz). Los FIDs obtenidos fueron procesados en el programa MestReNova-9.0.1.

Espectroscopia de infrarrojo

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro Dynascan Perkin Elmer Spectrum 100, equipado con el accesorio universal ATR. Los datos fueron procesados con el programa Origin 8.6 y se expresan en números de onda (cm^{-1}).

Espectroscopia de ultravioleta-visible

Se utilizó un espectrofotómetro de ultravioleta visible de doble haz, modelo LAMBDA 2S L600-00BB, con software UVWINLAB. Las longitudes máximas de absorción se expresaron en nanómetros (nm). Los datos extraídos fueron procesados con el programa Origin 8.6.

Espectrometría de masas

Los compuestos aislados se analizaron por infusión directa utilizando un espectrómetro de masas tándem SYNAPT G2-Si de Waters de alta resolución equipado con fuente de ionización por electronebulización, filtro de masas de cuádruplo sencillo, celda de colisiones CID y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF). Las muestras se prepararon a una concentración final de $1 \mu\text{g/mL}$, utilizando ácido fórmico al 1% (v/v) en MeOH grado LC-MS. Las condiciones de operación fueron: $10 \mu\text{L/min}$, ESI en modo positivo y negativo, voltaje de capilar de 3000 V, temperatura de capilar de 120°C , voltaje cono 40 V, 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).

Capacidad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizaron los métodos del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}) y catión radical ácido 2,2,-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}). Como antioxidante de referencia en ambos métodos se empleó ácido ascórbico, el registro de las medidas de absorbancia, a longitud de onda fija, se llevaron a cabo con un espectrofotómetro UV-Vis. Los análisis estadísticos se realizaron con el test Bonferroni's con un nivel de confianza de 95%. Los valores calculados de actividad antioxidante, fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Los valores de IC₅₀, se evaluaron estadísticamente mediante tres repeticiones. Los datos se procesaron y graficaron en el programa GraphPad prims 8.

Viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó la línea celular MCF-7 y el método de reducción del MTT. Como blanco de referencia se utilizó DMSO. El registro de las medidas de absorbancia, a longitud de onda fija, se llevaron a cabo con un espectrofotómetro UV-Vis. Los datos se procesaron y graficaron en el programa GraphPad prims 8.

7.1. Fundamento de los métodos antioxidantes de DPPH y ABTS

Desde la década de 1990, las investigaciones sobre sustancias antioxidantes se han incrementado debido a que su consumo está asociado con la prevención de enfermedades. Para determinar la actividad antioxidante y los mecanismos de acción de compuestos puros, alimentos y suplementos dietéticos se han establecido modelos de investigación en sistemas químicos y/o biológicos, dichos modelos han servido para la identificación de nuevas fuentes naturales de compuestos antioxidantes.⁴³

Existen algunos métodos químicos para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro*, tales como los métodos que consisten en la capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (CARO), parámetro antioxidante total de atrapamiento de radicales (PATAR), capacidad para reducir el hierro férrico (CRHF), neutralización del catión radical ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS),

neutralización del radical 2,2,-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH), entre otros. Sin embargo, debido a las diferencias en las condiciones en las que se desarrollan estas metodologías, ninguno de estos métodos se puede considerar universal para determinar la capacidad antioxidante.⁴⁴

De las metodologías utilizadas para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia, la neutralización del radical libre 2,2-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) y del catión radical ácido 2,2,-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}), son dos de los métodos más empleados.

Método del DPPH[•]

El radical DPPH es estable en solución y en ausencia de luz, tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente hasta el amarillo cuando se le añaden sustancias antioxidantes, este cambio del púrpura a amarillo se debe a la formación del enlace DPPH-H. La decoloración de la muestra se determina a una longitud de onda de 517 nm hasta alcanzar el equilibrio (Figura 7).⁴⁵

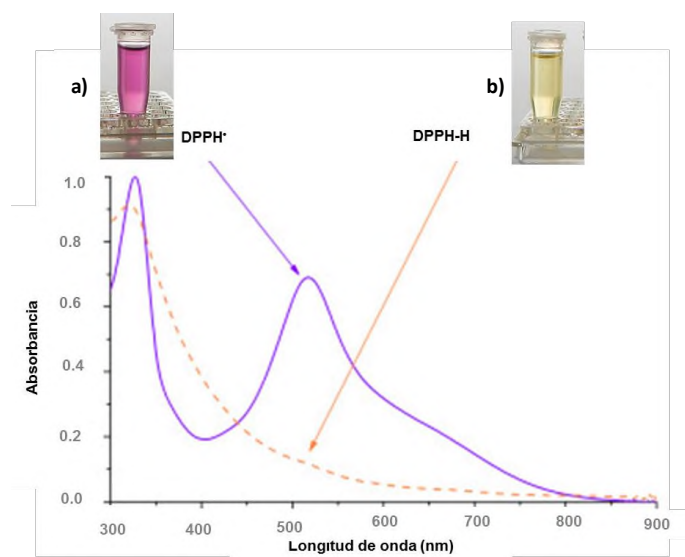


Figura 7. a) Absorbancia del DPPH[•] en metanol a 517 nm, b) reducción del DPPH[•] por acción de un antioxidante. (Tomada y modificada de Wollinger *et al*, 2016)⁴⁶

En la figura 8 se describe el mecanismo de reacción del radical DPPH con el ácido ascórbico (AA). El radical DPPH reacciona con el hidrógeno del hidroxilo en C-4 del AA y se reduce al DPPH-H, la ruptura homolítica del enlace hidrógeno-oxígeno en el AA forma el radical I, posteriormente, otra molécula de DPPH[•] reacciona con

el hidrógeno del hidroxilo en C-3 y genera el biradical II, los electrones desapareados se estabilizan con la doble ligadura en C-3 y forman el ácido dehidroascórbico, cabe destacar que una molécula de ácido ascórbico neutraliza a dos moléculas del radical DPPH.⁴⁷

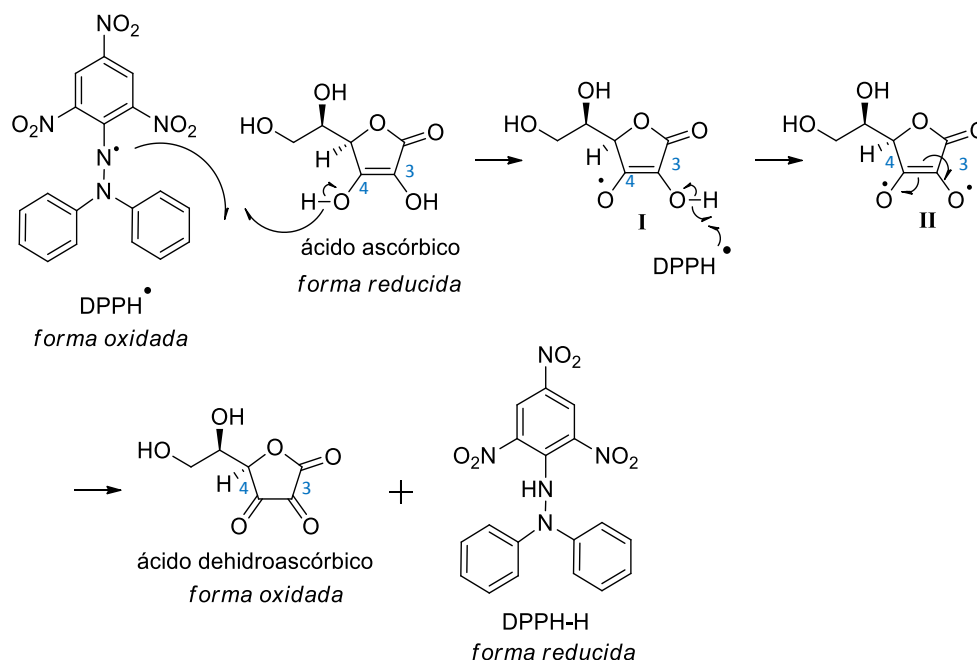


Figura 8. Reacción de neutralización del DPPH• frente al ácido ascórbico. Dos moléculas de DPPH• reaccionan con el AA y forman dos moléculas de DPPH-H y al ácido dehidroascórbico.

(Modificada de Villanueva et al 2010)⁴³

Los resultados experimentales se expresan como el valor IC₅₀, es decir la concentración de la muestra problema necesaria para estabilizar un 50 % del radical DPPH, y son comparados frente a una referencia de un antioxidante conocido en este caso ácido ascórbico.

Método del ABTS^{•+}

El método del catión-radical ABTS es uno de los más usados, es considerado de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable. El ABTS^{•+} se forma previamente, para ello, se suelen usar métodos electroquímicos, enzimáticos o químicos. Este último método utiliza dióxido de sulfato, persulfato de potasio, entre otros, (Figura 9), la reacción de activación ocurre en ausencia de luz durante 16 h a temperatura ambiente.⁴⁸

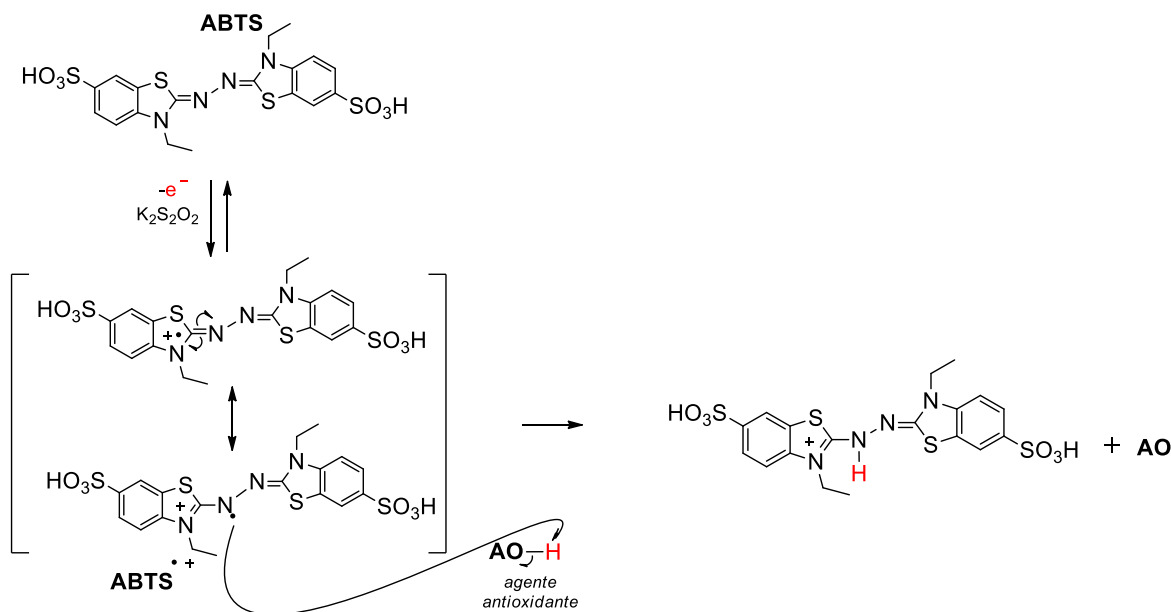


Figura 9. Mecanismo de activación del ABTS con persulfato de potasio para formar al $ABTS^{\bullet+}$ y su reacción frente a un agente antioxidante. (Modificada de Oliveira et al, 2014)⁴⁹

El ABTS es soluble tanto en medio acuoso como orgánico, previo a la activación, presenta un máximo de absorción a 342 nm. Una vez que se forma el $ABTS^{\bullet+}$ presenta nuevas bandas con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm. En la reacción con un antioxidante se suele tomar la banda a 734 nm debido a que generalmente no interfiere con la absorción del antioxidante (Figura 10). Además, esta metodología permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

Los resultados son expresados como equivalentes de trolox (TEAC por sus siglas en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o como valores equivalentes de ácido ascórbico (VCEAC por sus siglas en inglés, Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity), dependiendo del antioxidante empleado como referencia.

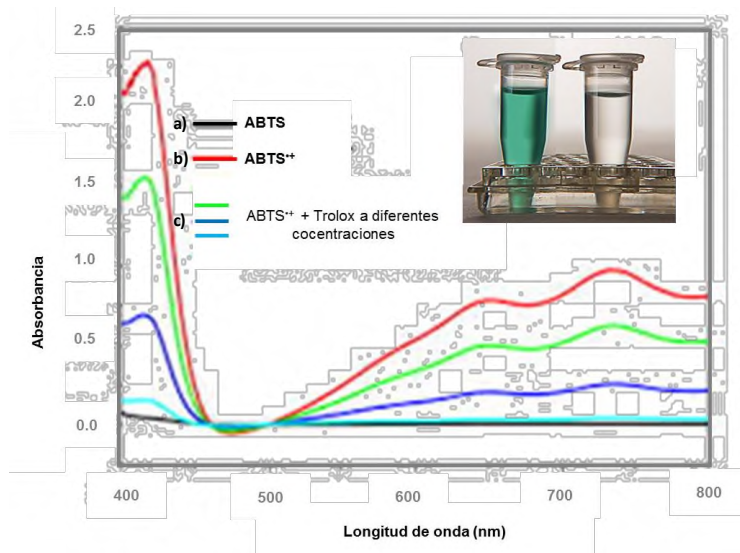


Figura 10. a) El ABTS presenta un máximo de absorción a $\lambda = 342$ (fuera de escala), b) el ABTS⁺ presenta máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm, c) desactivación del ABTS⁺ por acción de trolox a diferentes concentraciones.

7.2. Fundamento del método MTT

En las últimas décadas se ha intensificado la búsqueda de compuestos que inhiban la proliferación de células cancerígenas y que no muestren efectos adversos en la salud del paciente. Muchos de los compuestos usados para el tratamiento de cáncer son metabolitos aislados a partir de fuentes naturales. En la identificación de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa, es necesario identificar los extractos con actividad y posteriormente se evalúa a los compuestos puros. Para cumplir con dicho objetivo, ha sido necesario desarrollar métodos *in vitro* para determinar su actividad en células cancerígenas.⁵⁰

Uno de los métodos más utilizados es el ensayo de reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), se usa comúnmente para determinar la viabilidad celular. En este método, un número conocido de células se trata con el extracto o compuesto a analizar a diferentes concentraciones, después de un tiempo estimado, se agrega una solución de MTT (de color amarillo pálido). Las células vivas o viables reaccionan en la mitocondria con el MTT y se lleva a cabo la reducción del MTT a formazano, cristal de color azul violeta (figura 11). Para cuantificar la reducción del MTT, el formazano formado se disuelve en

disolventes orgánicos (DMSO o isopropanol) y se mide a una longitud de onda de 570 nm (Figura 12). De esta manera es posible determinar el número de células que sobrevivieron al tratamiento con el extracto vegetal o compuesto puro usado.⁵¹

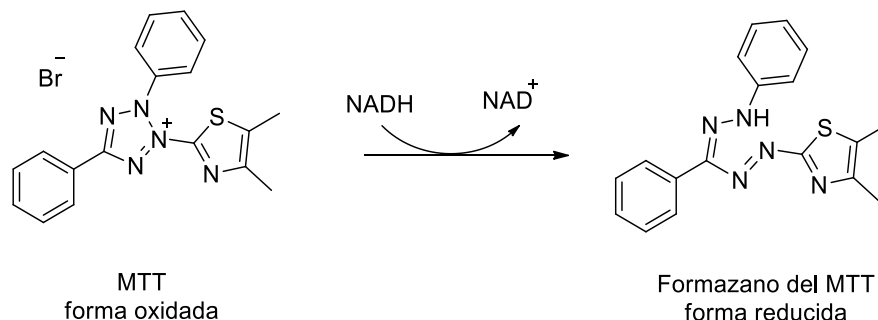


Figura 11. Mecanismo de reducción del MTT y formación de formazano.

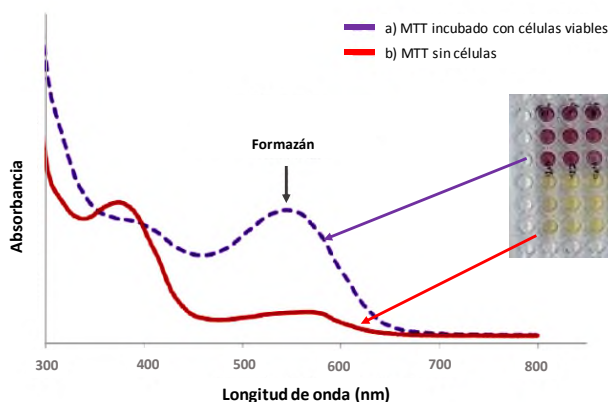


Figura 12. a) Reducción enzimática del MTT por parte de las células presenta máximos de absorción entre 500 y 600 nm, b) El MTT disuelto en PBS presenta un máximo de absorción a 380 nm.

La capacidad de las células de reducir el MTT a formazano después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas, según la siguiente relación:

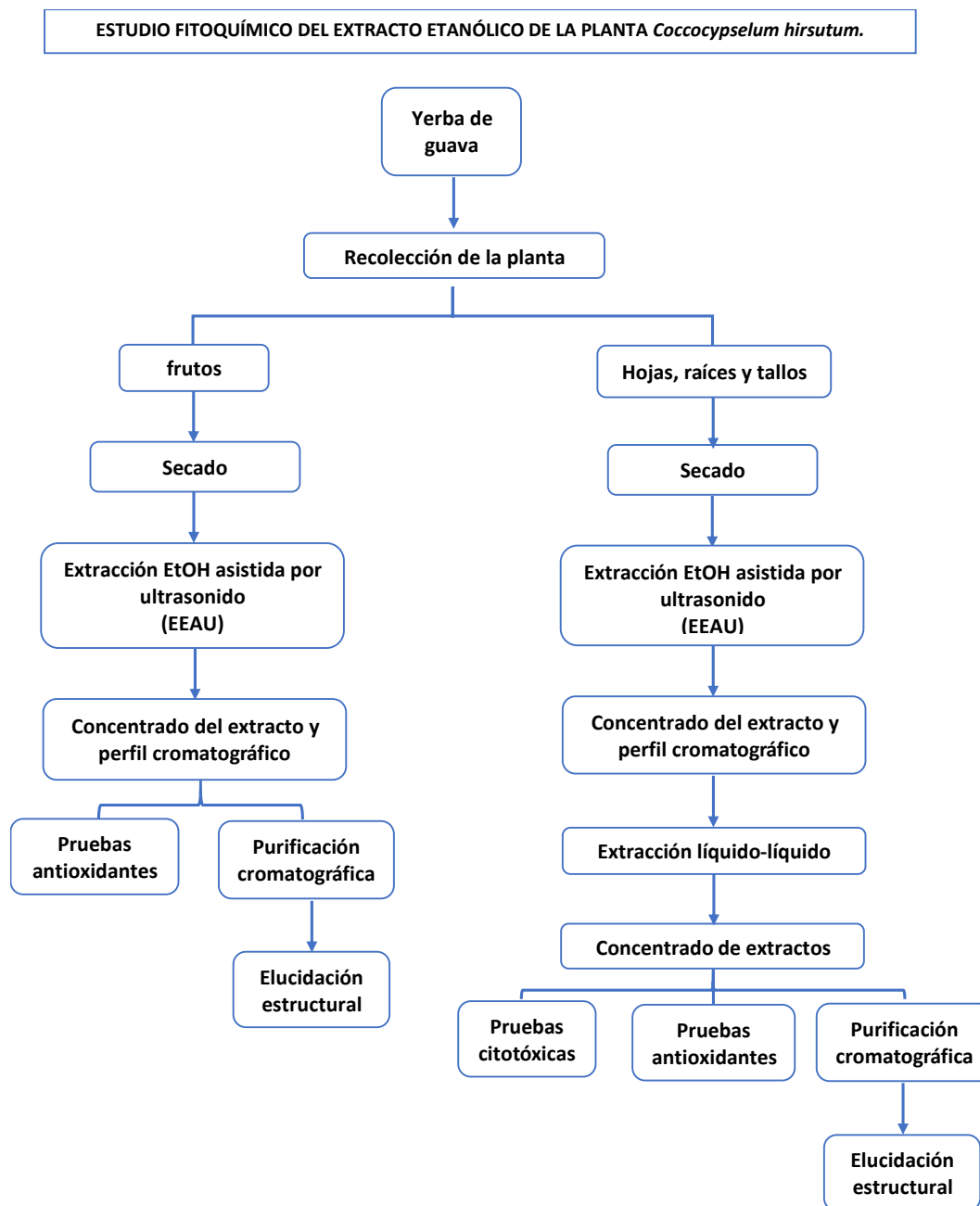
$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{abs de células tratadas}}{\text{abs de células control}} \times 100\%$$

La curva dosis respuesta debe ser calculada teniendo en cuenta el rango de concentración utilizado y el porcentaje de reducción del crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se calcula la concentración que produce la

reducción de la viabilidad celular en un 50%. Entre menor sea el porcentaje de células vivas mayor será la efectividad del extracto o compuesto analizado.

8. METODOLOGÍA

En el siguiente esquema se muestra el diagrama general de la metodología usada para el desarrollo de este trabajo.



De acuerdo al esquema general la primera etapa consistió en la localización y recolección de la planta dentro de las instalaciones de la universidad seguido de un tratamiento pos-cosecha donde se separaron los frutos del resto de la planta y se llevó al proceso de secado, transcurrido este tiempo, se continuo con la etapa de extracción, concentrado y perfil cromatográfico de ambos extractos obtenidos.

En esta parte de la metodología se trató de igual forma los frutos del resto de la planta, a continuación, al extracto de hojas, tallos y raíz se le realizo una extracción líquido-líquido, a las fracciones obtenidas se les determino la actividad citotóxica, antioxidante y finalmente se llevó a cabo su purificación cromatográfica y elucidación estructural. Al extracto de frutos se le determino solamente la actividad antioxidante y se llevó a cabo su purificación cromatográfica y elucidación estructural.

8.1. Recolección de la planta

De acuerdo al esquema general de trabajo, la primera etapa consistió en la recolección de la planta.

La recolección de la planta *Coccocypselum hirsutum* se realizó en las instalaciones de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, ubicado en el municipio de San Juan Bautista Tuxtepec del estado de Oaxaca. La recolecta se realizó la mañana del 10 de abril del 2017, se tomó registro de la hora (9:10 am-10:15 am) y la temperatura (35°C). Se recolectó por separado fruta y el resto de la planta (hojas, tallos y raíces). La planta se colocó en envolturas de papel y se tomaron fotografías después de la colecta (Figura 13). Una muestra de la planta se envió a la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP (Dra. Rosa Andrés Hernández) para su identificación y registro.

De la planta recolectada, se separaron las partes deterioradas y manchadas, además, se eliminaron los restos de tierra mediante lavados con agua potable. El material vegetal fresco se pesó, se obtuvieron 640 g de planta y 150 g de frutos.



Figura 13. Recolección de planta y frutos de *Coccocypselum hirsutum*.

8.2. Secado

El secado del material vegetal es una de las etapas más importantes en la manipulación de plantas medicinales, en esta etapa se interrumpe la degradación causada por enzimas y se impide el desarrollo de microorganismos, de esta manera, se conservan los principios activos presentes en la planta. De acuerdo a la literatura, el secado de las plantas medicinales se puede realizar entre 30 y 60°C sin que se lleve a cabo una pérdida de los principios activos.⁵²

El secado de la planta y frutos se realizó en un horno de convección forzada a 60°C, en el caso de los frutos, después de 24 horas no se observó variación en el peso; mientras que para la planta no se observó variación en el peso después de 8 horas.

Una vez que se secaron los frutos, estos se separaron de sus semillas y solo se conservó el pericarpio; se obtuvieron 16.5 g de fruta seca (11% de rendimiento). Con respecto al resto de la planta; se obtuvieron 120 g de material vegetal seco (18% de rendimiento). Los frutos secos y el resto de la planta seca se colocaron en bolsas tetrapak y se almacenaron protegidas de la luz y humedad para su posterior uso.

8.3. Preparación de extractos vegetales

Para la extracción de los compuestos responsables de las actividades biológicas en las plantas medicinales, se suelen utilizar diversas metodologías, las más comunes son: percolación, maceración simple o fraccionada, digestión, infusión,

decocción, entre otros. Cada una de estas metodologías presentan ventajas y desventajas; la selección de la técnica depende principalmente de la naturaleza del principio activo a extraer. Con el fin de eficientar rendimientos y tiempos de extracción se han desarrollado nuevos métodos de extracción, tales como microondas y ultrasonido, estas metodologías aumentan la eficiencia, reducen los tiempos de extracción y el volumen de los disolventes usados.^{53,54}

En este trabajo se utilizó la extracción asistida por ultrasonido (EAU), esta metodología tiene la ventaja de que la extracción transcurre en tiempo cortos, es a temperatura ambiente; además, aumentan el rendimiento de los compuestos bioactivos, es reproducible y de fácil manejo y la cantidad de disolvente empleado es menor en comparación a otras técnicas de extracción.⁵⁵

En el uso de ondas ultrasónicas se activan diferentes mecanismos, el más importante y complejo de ellos es el de cavitación; se sabe que cuando la potencia del ultrasonido aumenta, se generan y destruyen burbujas de cavitación debido a los ciclos de expansión y compresión de la onda ultrasónica, el colapso de estas burbujas puede ser tan violento que causan la erosión de la superficie del material vegetal, como resultado, las paredes celulares se rompen y los metabolitos pasan rápidamente de la fase sólida al disolvente.^{56,57}

En las metodologías de extracción con disolventes, la selección de este es de suma importancia debido a que su polaridad definirá el tipo de metabolitos extraídos. El agua, por ejemplo, tiene la ventaja de ser económica pero no es muy selectiva y además fácilmente alterable por la acción de microorganismos; disuelve compuestos polares tales como glicósidos, saponinas, carbohidratos, proteínas, entre otros. Los alcoholes son más selectivos, además, poseen acción antimicrobiana e inactivan enzimas. Estos disolventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, generalmente se usan mezclas hidroalcohólicas, disuelven glicósidos, aceites esenciales, resinas, alcaloides, entre otros. En extractos de plantas medicinales, se prefiere el uso de etanol y sus mezclas con agua debido a que es de menor toxicidad que otros alcoholes como metanol, isopropanol, butanol, entre otros. Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar una mezcla de

alcohol/agua, 7:3 u 8:2 para las partes leñosas de la planta, mientras la proporción 1:1 es recomendada para extraer las hojas o las partes aéreas, ya que con esta concentración se evita la extracción de la clorofila y de las sustancias polimerizadas o resinoides.⁴⁹

8.3.1. Extracción etanólica asistida por ultrasonido de frutos

El procedimiento de la extracción etanólica asistida por ultrasonido (EEAU) para frutos y planta de *Coccocypselum hirsutum* se describe a continuación:

- **Metodología A (frutos)**

Se colocaron 5 g de frutos secos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se le adicionaron 60 mL de EtOH grado técnico recién destilado; cabe destacar que, debido a las condiciones de humedad de la región, la proporción de agua puede superar el 10% en el etanol destilado, enseguida se colocaron en el baño ultrasónico a temperatura ambiente y se le realizaron dos ciclos de 15 minutos, transcurrido este tiempo se procedió a filtrar el extracto alcohólico, se obtuvo una solución de color azul tenue. A los frutos remanentes se le realizó una segunda sonicación con 60 mL más de etanol bajo las condiciones anteriores. La mezcla de extractos se llevó a sequedad a presión reducida en un rotavapor a 50°C, se obtuvieron 1,6 g de extracto crudo.

Con el uso de etanol destilado se observó que los frutos mantuvieron la coloración azul púrpura después de la EEAU.



Figura 14. EEAU de frutos con etanol grado técnico destilado.

- **Metodología B (frutos)**

Se colocaron 10 g de frutos secos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se le adicionaron 100 mL de EtOH absoluto, enseguida se colocaron en el baño ultrasónico a temperatura ambiente y se le realizaron dos ciclos de 15 minutos, transcurrido este tiempo se procedió a filtrar el extracto alcohólico, se obtuvo una solución de color amarillo tenue. A los frutos remanentes se le realizó una segunda sonicación con 100 mL más de etanol absoluto bajo las condiciones anteriores. La mezcla de extractos se llevó a sequedad a presión reducida en un rotavapor a 50°C, se obtuvieron 2.6 g de extracto crudo.

Debido a que los frutos después de la extracción con etanol absoluto conservaron el color azul violeta, a estos frutos se les realizó una extracción con una mezcla EtOH/H₂O de la siguiente manera:

A los frutos que se utilizaron en la extracción con etanol absoluto se adicionaron 100 mL de una mezcla EtOH/H₂O, 1:1, y se colocaron en el baño ultrasónico en dos ciclos de 15 minutos, se obtuvo una solución de color azul intenso. La operación se repitió con 100 mL más de mezcla. Los dos extractos se juntaron y se llevaron a sequedad en el rotavapor, se obtuvieron 2.7 g de extracto crudo.

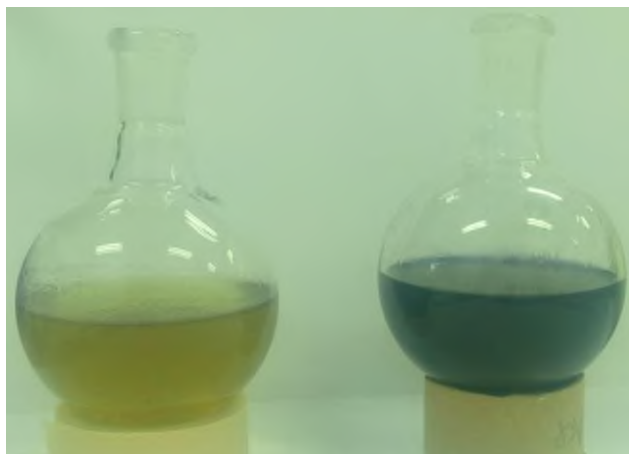


Figura 15. Comparación de extractos de frutos obtenidos por EEAU; izquierda, extracto con etanol absoluto; derecha, extracto con EtOH/H₂O, 1:1.

8.3.2. Extracción etanólica asistida por ultrasonido de hojas, tallos y raíces

Se colocaron 10 g del material vegetal seco en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se le adicionaron 100 mL de EtOH grado técnico recién destilado, enseguida se colocaron en el baño ultrasónico a temperatura ambiente y se le realizaron dos ciclos de 15 minutos, transcurrido este tiempo se procedió a filtrar el extracto alcohólico y al material vegetal remanente se le añadieron 100 mL más de EtOH y se realizó una segunda sonicación siguiendo el procedimiento anterior. Los extractos orgánicos se juntaron y se llevaron a sequedad a presión reducida en un rotavapor a 50°C, se obtuvieron 1.4 g de extracto crudo (14% de rendimiento).

8.3.3. Extracción líquido-líquido

Para el caso del extracto obtenido de la planta, se realizó una extracción líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad (Tabla 3).

Tabla 3. Disolventes utilizados en la extracción líquido-líquido. (Tomada de *techniques in organic chemistry*)

Disolvente	P. de ebullición (°C)	Densidad (g/mL)	Constante dieléctrica (ϵ)
Hexano	69	0.65	2.0
AcOEt	77	0.89	6.0
<i>n</i> -BuOH	118	0.81	18.0
H ₂ O	100	1.00	82

El extracto etanólico se re-suspendió en 150 mL de agua y se colocó en un embudo de separación, enseguida se realizaron dos extracciones con 100 mL de hexano cada una. Las fases orgánicas se juntaron y se llevaron a sequedad en el rotavapor.

La fase acuosa se sometió al mismo proceso de extracción líquido-líquido con acetato de etilo y posteriormente con *n*-BuOH. A todas las fracciones por separado se les realizó CCF con diferentes sistemas.

De la extracción con hexano, se obtuvieron 0.308 g (22% de rendimiento); de la fase de AcOEt se obtuvieron 0.21 g (15% de rendimiento); de la fase de *n*-BuOH se obtuvieron 0.168 g (12% de rendimiento). Por último, se conservó la fase acuosa, se obtuvieron 0.7 g (50% de rendimiento). La metodología de extracción se muestra en la figura 16.

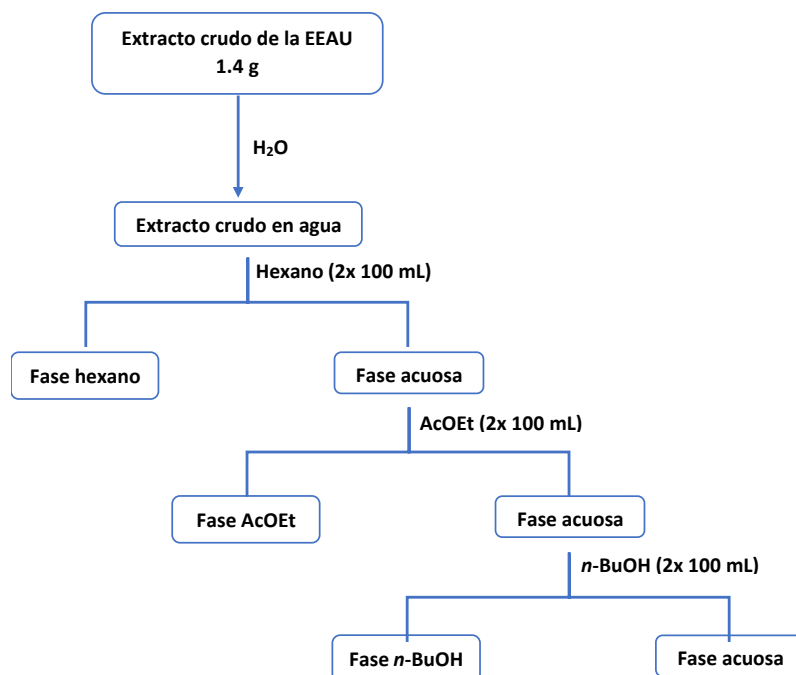


Figura 16. Diagrama general del procedimiento de extracción líquido-líquido realizado al extracto crudo de hojas, tallos y raíces

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Cromatografía en capa fina

Una vez que se obtuvieron los extractos de los frutos y las fracciones del extracto de la planta, se continuó con la etapa de análisis por CCF, lo anterior para determinar el número de compuestos químicos presentes en cada extracto, además de establecer las características de purificación y aislamiento de los compuestos. Debido a la naturaleza heterogénea en la estructura de los compuestos presentes en los extractos, se utilizaron diferentes agentes reveladores para visualizar a todos los compuestos (lámpara UV, KMnO_4 , H_2SO_4 , Vainillina, entre otros).

CCF de frutos (Metodología A)

Al extracto obtenido por ultrasonido de los frutos utilizando EtOH grado técnico destilado se le realizó la CCF en fase normal, utilizando como fase móvil un sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1. Para la visualización de los compuestos de este extracto, se empleó luz ultravioleta de 254 nm y calentamiento previo tratamiento de H_2SO_4 .

En la figura 17 se muestran las placas cromatográficas, se aprecia en este sistema un aproximado de 3 compuestos, los cuales absorben radiación UV a 254 nm. Además, se observó el comportamiento de los compuestos al reaccionar con H_2SO_4 , el compuesto que permanece en el punto de aplicación viro al rojo y se encontraba rodeado de una coloración azul.

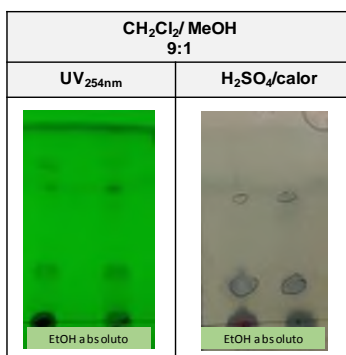


Figura 17. CCF de la EEAU de frutos con EtOH grado técnico, utilizando un sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1.

CCF de frutos (Metodología B)

Los extractos obtenidos por ultrasonido, empleando EtOH absoluto y una mezcla EtOH/H₂O se analizaron de igual forma por CCF, empleando un sistema CH₂Cl₂/MeOH, 8:2. En la figura 18 se muestran las placas cromatográficas, es evidente que ambos extractos difieren en cuanto a sus constituyentes químicos. Mientras el extracto hidroalcohólico absorbe a la luz visible y su banda muestra coloración azul, asimismo, al entrar en contacto con H₂SO₄ el cambio de color a rojo es muy evidente, el extracto con EtOH absoluto no presenta absorción al visible, además, no muestra cambio de coloración en sus bandas al contacto con el ácido, al emplear calor exhibe un compuesto que no se observa en el extracto hidroalcohólico.

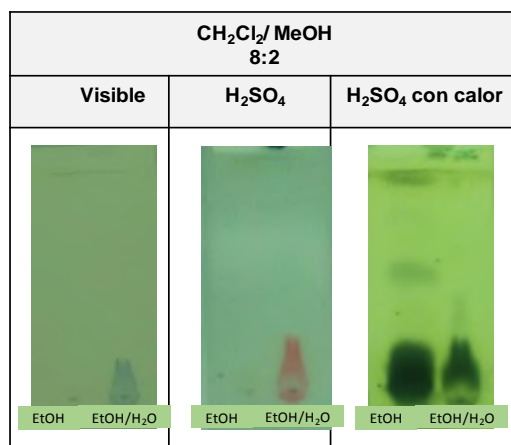


Figura 18. Análisis por CCF del extracto de frutos con EtOH absoluto frente al extracto EtOH/H₂O.

Se puede concluir que al disminuir la proporción de H₂O aumenta la selectividad de los compuestos aislados, mientras que al aumentar la proporción de H₂O se puede extraer un compuesto o compuestos que viran del azul al rojo por la interacción con un ácido, este comportamiento en ácido es característico de las antocianinas.

CCF de las fracciones del extracto etanólico de la planta

Las fracciones que se obtuvieron de la partición líquido-líquido del extracto etanólico de la planta, se analizaron por CCF en fase normal utilizando diferentes sistemas de elución, para las fracciones de hexano y AcOEt se empleó un sistema Hexano/AcOEt en diferentes proporciones y para las fracciones de *n*-BuOH y H₂O

debido a la polaridad de los compuestos presentes se utilizó un sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Para el revelado de todas las placas cromatográficas se empleó luz ultravioleta (254 y 365 nm) y calentamiento previo tratamiento con KMnO_4 y vainillina.

En la tabla 4 se muestran las placas cromatográficas donde se observan los diferentes compuestos de cada fracción. El análisis mediante lámpara de UV de dos longitudes permitió visualizar a los compuestos con cromóforos que absorben a esas longitudes de onda. Además, reveladores como vainillina y KMnO_4 , considerados universales, permiten ver un amplio número de compuestos no volátiles; como aquellos compuestos que tienen en su estructura grupos que se oxidan, como alcoholes, alquenos, alquinos, entre otros.

Después de su revelado, se observaron en total alrededor de 9 compuestos, sin embargo, con la información que proporcionó la CCF no se puede proponer estructuras químicas. El análisis a través de CCF se utilizó para conocer el comportamiento de los compuestos en sistemas de diferente polaridad, de cada fracción y para definir las condiciones de la purificación cromatográfica.

Tabla 4. Análisis por CCF de las fracciones obtenidas de la extracción líquido-líquido.

Fracción (sistema de elución)	UV ₂₅₄ nm	UV ₃₆₄ nm	KMnO ₄	Vainillina
Hexano (hex/AcOEt, 8:2)				
AcOEt (hex/AcOEt, 8:2)				
n-BuOH (CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 8:2)				
Agua (CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 7:3)				

9.2. Determinación de la actividad antioxidante

Una vez que se contaba con las fracciones obtenidas en las extracciones líquido-líquido y con el extracto etanólico grado técnico de frutos, se mantuvieron protegidos de la luz y en refrigeración hasta su posterior uso.

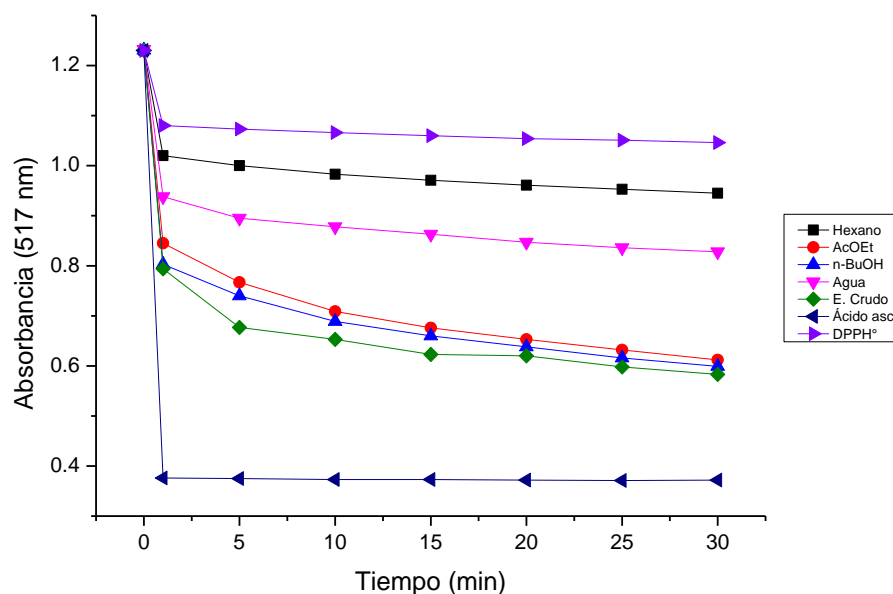
La determinación de la actividad antioxidante de los extractos de *Coccocypselum hirsutum* se llevó a cabo mediante los métodos del DDPH[•] y método de ABTS^{•+}, descritos anteriormente. Para los ensayos, se utilizó un stock de 10 mg de cada fracción y se realizaron pruebas de disolución con distintos solventes, siendo el

DMSO al 1% el que mostro una mejor disolución de las muestras. Es importante señalar que es la primera vez que se determina la actividad antioxidante para este género de plantas.

9.2.1. Método del DPPH^{*}

De acuerdo con Wollinger *et al*, 2016⁴³ para obtener resultados reproducibles, es importante investigar la cinética de reacción del DPPH^{*} y el antioxidante, por lo que la determinación de la actividad antioxidante se realizó de forma cualitativa y cuantitativa. La primera se realizó en función del tiempo donde se observó la cinética de reacción del DPPH^{*} frente al extracto crudo de hojas, tallos y raíces, así como de las fracciones derivadas del mismo (hexano, AcOEt, *n*-BuOH y agua). Además, se compararon con la lectura de un blanco control (DMSO 1% + DPPH^{*}) y un blanco con muestra (ácido ascórbico, 1 mg/mL). De la forma cuantitativa se obtuvieron los valores medios que inhibían el 50 % del radical (IC₅₀).

El ensayo del DPPH^{*} se determinó según el método de Brand-Williams⁵⁸ y modificado por Guerra-Ramírez *et al.*, 2009⁵⁹ quienes propusieron disminuir el volumen utilizado de 4 a 1 mL y el tiempo de espera de las lecturas. Para el análisis cualitativo, las soluciones del extracto crudo y de las fracciones se prepararon a una concentración de 1 mg/mL con DMSO al 1%. Para las cinéticas de reacción se prepararon las muestras con 800 µL de la solución de trabajo (DPPH^{*}/MeOH) y 200 µL de cada una de las muestras. Se realizaron dos réplicas cada una por triplicado y se midió la inhibición del DPPH^{*} a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min en un espectrofotómetro a 517 nm, frente a un control positivo (ácido ascórbico) y negativo (DMSO 1% + DPPH^{*}). En la gráfica 1 se muestran los resultados de estas cinéticas.

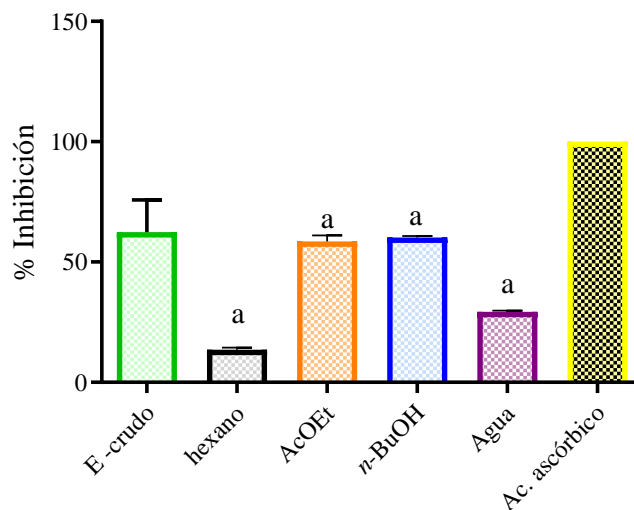


Gráfica 1. Cinética de reacción del DPPH* frente al extracto crudo de hojas, tallos y raíces y de sus fracciones en función del tiempo a una concentración de 1 mg/mL. $n=3$

De acuerdo a los resultados, se observan cambios en la absorbancia del radical DPPH en las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y el extracto crudo que van de 1.2 a 0.6 nm, conforme el tiempo transcurre la reacción alcanza un estado estable a los 30 min, lo que indica que el radical se mantiene estable durante el tiempo que se incuban las muestras (línea DPPH*). Esta disminución muestra la capacidad antioxidante de los extractos evaluados, siendo las fracciones de hexano y agua las que presentaron una cinética de reacción lenta, lo que se traduce en una menor actividad frente al radical; por el contrario, el ácido ascórbico reacciona muy rápido con el DPPH*, logrando una reacción completa del antioxidante después de aproximadamente 5 min. En la gráfica 2 se muestra la correlación que tiene el decaimiento de la absorbancia con el porcentaje de inhibición, siendo las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y el extracto crudo las que muestran un mayor porcentaje de inhibición respecto a las fracciones de hexano y agua.

El porcentaje de inhibición de cada muestra se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco}} \times 100$$



Gráfica 2. Inhibición del DPPH* por el extracto crudo de hojas, tallos y raíces y de sus fracciones en función del tiempo, a una concentración de 1 mg/mL. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar, ^a $p < 0.005$ vs E. Crudo, $n=3$

Determinación del IC₅₀

Para determinar la actividad antioxidante cuantitativamente, se utilizó una solución en metanol del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo. Por su parte las muestras del extracto EtOH grado técnico de frutos y de las fracciones del hexano, AcOEt, *n*-BuOH y agua se prepararon a diferentes concentraciones (0.015, 0.03, 0.045, 0.06, 0.09, 0.18, 0.36, 0.48 y 0.57 mg/mL), utilizando DMSO al 1%. Todas las soluciones fueron incubadas en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se midieron en el espectrofotómetro las absorbancias para todas las soluciones a 517 nm. En la tabla 5 se muestra el porcentaje de inhibición medio (IC₅₀) para todas las muestras evaluadas, obtenidos a partir de las cinéticas de reacción entre la concentración de las muestras y el DPPH*.

De acuerdo con este parámetro, valores bajos de IC₅₀ reflejan una alta actividad para inhibir radicales libres. El experimento se desarrolló por triplicado y se realizó una segunda replica.

Tabla 5. Resultados obtenidos para la IC₅₀ de las muestras analizadas, tomando como referencia ácido ascórbico.

Curva estándar	R ²	IC ₅₀ mg/mL	% de inhibición máx.
Ácido ascórbico	0.97	0.036± 0.14	95.04 ± 3.05
Muestras			
F. Hexano	0.96	ND	21.82 ± 0.53
F. AcOEt	0.99	0.230 ± 0.005 ^a	78.05 ± 1.48
F. <i>n</i> -BuOH	0.96	0.190 ± 0.013 ^b	82.19 ± 1.73
F. Agua	0.95	0.532 ± 0.019 ^c	51.35 ± 1.93
E. Frutos	0.99	ND	30.33 ± 0.89

Los datos son expresados como la media ± desviación estándar ^a*p* < 0.005 vs b, c; ^b*p* < 0.005 vs c; *n*=6; ND= no determinado.

En este análisis, las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y agua mostraron actividad inhibidora del radical DPPH con valores de IC₅₀ de 0.230, 0.190, y 0.532 mg/mL respectivamente, pero inferiores comparados con el ácido ascórbico (0.036 mg/mL). La fracción con mayor actividad fue la de *n*-BuOH con respecto a las fracciones de hexano y frutos las cuales no llegaron a inhibir el 50% del radical.

Si bien, se esperaba que el extracto de frutos presentara una buena actividad antioxidante, esto debido a su intenso color morado y a la posible presencia de antocianinas, sólo se realizó el ensayo antioxidante con el extracto etanólico y previamente se mencionó que con la mezcla EtOH/H₂O en relación 1:1 se favorece la extracción de antocianinas, mientras que con el etanol destilado prácticamente no se extraen estos compuestos.

Además, se corroboró que los extractos de AcOEt y *n*-BuOH que presentaron un mayor decaimiento de la absorbancia (Gráfica 1) resultaron ser los de mayor actividad inhibitoria.

9.2.2. Método del ABTS^{•+}

Para medir la actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+}, se preparó una solución salina de PBS (buffer de fosfato por sus siglas en inglés) donde se disolvió el reactivo ABTS, posteriormente se llevó a cabo la activación del ABTS con persulfato de potasio, 16 h antes del ensayo.⁶⁰

La solución de ABTS^{•+} se ajustó hasta una absorbancia de 0,8 a 734 nm, posteriormente el extracto EtOH de frutos, así como cada una de las fracciones derivadas del extracto etanólico (hexano, AcOEt, *n*-BuOH y agua) se evaluaron por triplicado a una concentración de 10 mg/mL, utilizando DMSO al 1%. Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de inhibición para cada una de las muestras de acuerdo a la siguiente ecuación, los cuales se reportaron como equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto (VCEAC/g, Tabla 6).

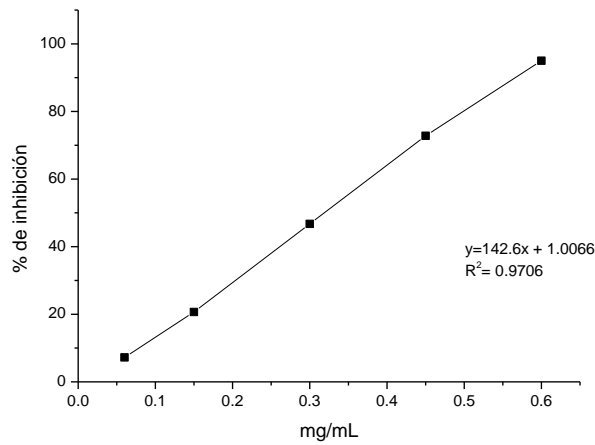
$$VCEAC (x) = \frac{\% \text{ de inhibición} - b}{m}$$

Tabla 6. Resultados obtenidos por el método ABTS de las muestras analizadas, tomando como referencia ácido ascórbico.

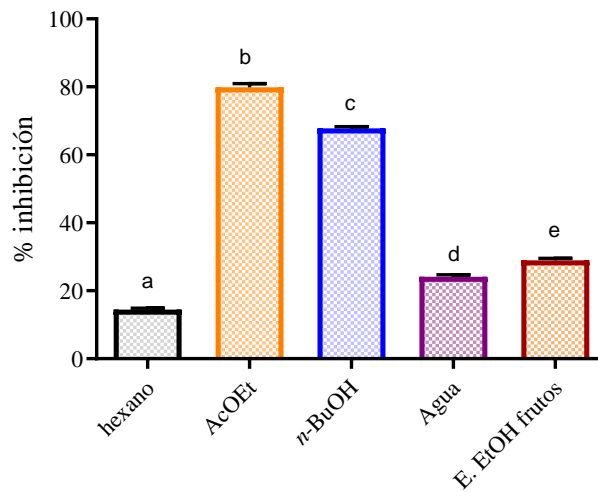
Muestras	mg VCEAC/g extracto seco	% de inhibición máx.
F. Hexano	0.931 ± 0.043	14.29 ± 0.61
F. AcOEt	5.509 ± 0.171	79.56 ± 2.44
F. <i>n</i> -BuOH	4.662 ± 0.081	67.48 ± 1.16
F. Agua	1.610 ± 0.119	23.96 ± 1.69
E. Frutos	1.971 ± 0.102	29.11 ± 1.45

El porcentaje de inhibición se determinó usando la ecuación empleada en el método anterior y se comparó contra una curva estándar de ácido ascórbico (Gráfica 3), para la cual se emplearon diferentes concentraciones (0.0006, 0.0015, 0.003, 0.0045 y 0.006 mg/mL), la medida de absorbancia se registró hasta un tiempo total de 6 minutos, en la gráfica 4 se muestran los porcentajes de inhibición

de ABTS^{•+} en función al tiempo. Para este ensayo las muestras de cada extracto se realizaron por triplicado y se realizó una segunda replica.



Gráfica 3. Curva estándar de ácido ascórbico a diferentes concentraciones: 0.0006, 0.0015, 0.003, 0.0045 y 0.006 mg/mL, en función del tiempo (6 min), $n=3$.



Gráfica 4. Inhibición de ABTS^{•+} por el extracto etanólico de frutos y las fracciones derivadas del extracto de hojas, tallos y raíces, a una concentración de 10 mg/mL. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar ^a $p < 0.005$ vs b, c, d, e; ^b $p < 0.005$ vs a, c, d, e; ^c $p < 0.005$ vs a, b, d, e; $n=6$.

Los resultados mediante esta prueba indican que las fracciones de AcOEt y *n*-BuOH presentaron actividad inhibidora de ABTS^{•+} con VEAC/g de 5.509 y 4.662

respectivamente. Siendo las fracciones de hexano y el extracto de frutos los que no presentaron actividad por este método.

Debe señalarse que, a pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos con los métodos ABTS^{•+} y DPPH[•] permiten alcanzar conclusiones prácticamente similares.

9.3. Actividad antiproliferativa

La evaluación preliminar de la actividad antiproliferativa de las fracciones del extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces de la planta *Coccocypselum hirsutum*, se realizaron en el laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra en la ciudad de México por los Doctores Alejandro Cabrera Wrooman y Miguel Ángel Peña Rico.

9.3.1. Cultivos celulares

Los cultivos se realizaron en cajas de 96 pozos en el medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomicina. Las células de la línea de cáncer mama MCF-7 se resuspendieron en el medio de cultivo de tal forma que hubiera 20,000 células en 200 μ L por pozo. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa por 24 horas con el objeto de que las células se adhirieran a la placa.

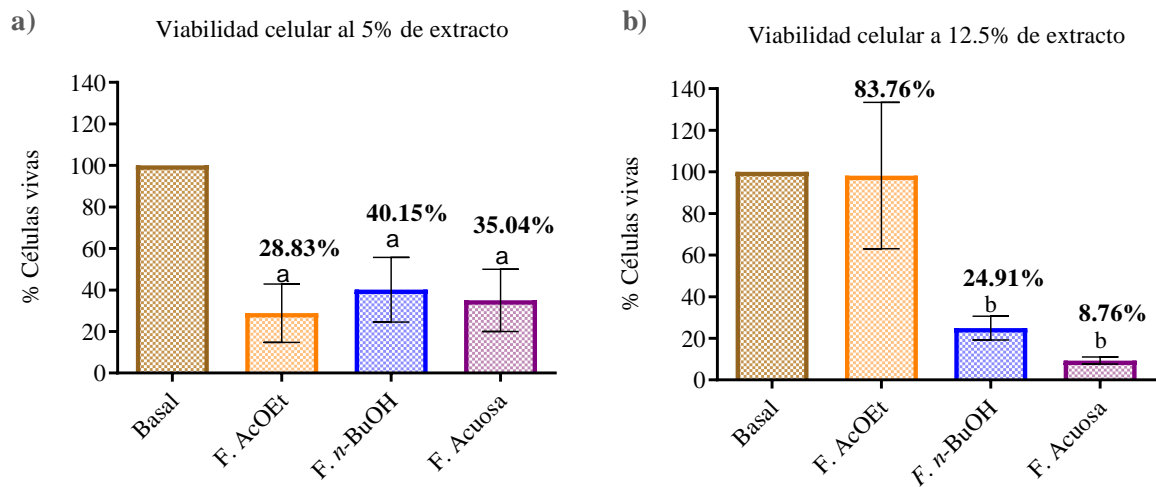
9.3.2. Método de MTT

La evaluación de la actividad antiproliferativa preliminar de células de cáncer de mama MCF-7 expuestas al efecto de las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y agua, obtenidas mediante extracción líquido-líquido del extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces de *Coccocypselum hirsutum* se describe a continuación.

Las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y agua fueron probadas al 5 y 12.5% de extracto, se utilizó un control negativo: células sin ningún tipo de tratamiento, para conocer la viabilidad de las estas en condiciones normales. Para esto, las células fueron expuestas a los extractos durante 18 horas. Después se incubaron con el reactivo de MTT por 4 horas a 37°C a una concentración de 5 mg/mL, los cristales de formazan fueron solubilizados con isopropanol y se midió la absorbancia a 570

nm. Se realizaron dos réplicas de cada una de las condiciones para corroborar la reproducibilidad de los resultados.

Al evaluar la viabilidad de las células de cáncer de mama expuestas a un porcentaje del 5% de extracto, se observó una disminución significativa en el crecimiento celular para todas las fracciones analizadas con respecto al control (Gráfica 5a), lo que indicó que las fracciones mostraron efecto antiproliferativo por arriba del 65% a esta concentración siendo la fracción de AcOEt la más activa con 28.83% de células vivas.



Gráfica 5. Ensayo de viabilidad en células de cáncer de mama (MCF-7) evaluadas frente a las F. AcOEt, F. *n*-BuOH, y F. Acuosa. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar. a) $^a p \leq 0.05$ vs control, b) $^b p \leq 0.05$ vs control, $n=6$.

Al aumentar el porcentaje de los extractos al 12.5%, la fracción de AcOEt no mostró cambios significativos con respecto al control (Gráfica 5b), lo que hace suponer que, a esta concentración, el principio activo que ejercía el efecto antiproliferativo al 5% resulta inhibido por otro metabolito o quizás a una mayor concentración del principio activo, este ejerce el efecto contrario, favoreciendo las condiciones para la supervivencia de las células cancerígenas.

Las fracciones de *n*-BuOH y agua al 12.5% de extracto conservaron la actividad antiproliferativa por abajo de 50% (Gráfica 5b). Siendo la fracción acuosa con 8.76% la que mostró un mayor efecto.

A partir de estos resultados se puede concluir que a un porcentaje menor de extracto (5%) exhibe un mayor efecto antiproliferativo en todas las fracciones disminuyendo por debajo del 50% el crecimiento de células de cáncer de mama.

Los extractos de *Coccocypselum hirsutum* no han sido estudiados en relación con sus efectos citotóxicos y antitumorales. Estos resultados nos permiten considerarla como un potencial coadyuvante en el tratamiento de esta enfermedad. Aún faltan estudios detallados que avalen el uso de la planta para el tratamiento de cáncer. Más adelante se discuten los resultados de actividad antiproliferativa de uno de los compuestos aislados de la fracción de *n*-BuOH.

9.4. Purificación cromatográfica

Se trabajó por una parte los frutos y por otra el resto de la planta, esto con la finalidad de caracterizar tanto los metabolitos presentes en ambas partes.

Empleando la técnica de cromatografía en columna, la cual permite la separación de compuestos en mezclas complejas por acción de la polaridad y afinidad de la fase móvil y la fase estacionaria, se logró la purificación del extracto etanólico e hidroalcohólico de frutos y de las fracciones derivadas del extracto del resto de la planta. Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice (230-400 mallas) y como fase móvil mezclas de disolventes de diferente polaridad. Cada extracto y fracción fue soportado en gel de sílice y posteriormente colocado en una columna previamente empacada, se recolectaron fracciones de 20 mL cada una. El curso de la cromatografía se siguió a través de CCF y se seleccionaron las fracciones puras para su concentración y elucidación estructural. En la tabla 7 se resumen los compuestos aislados y/o identificados en las diferentes CC.

Tabla 7. Compuestos aislados y/o identificados de *Coccocypselum hirsutum*

Extractos/Fracciones	Compuestos aislados/identificados
Frutos	
E. EtOH	Asperulósido (1) Glucosa (3) Derivado furánico (4)
E. EtOH/H ₂ O	Antocianina (2)
Planta	
F. Hexano	β -sitosterol (5) β -caroteno (6)
F. AcOEt	β -sitosterol (5)
F. <i>n</i> -BuOH	Asperulósido (1) Glucosa (3)
F. H ₂ O	Asperulósido (1) Glucosa (3)

La metodología de purificación e identificación de cada compuesto se describen a continuación.

9.4.1. Asperulósido (1)

El análisis por CCF en un sistema CH₂Cl₂/MeOH, 8:2, del extracto etanólico de los frutos de la yerba de guava, dejó ver un compuesto en la lámpara de UV a 254 nm ($R_f = 0.8$), dicho compuesto se torna de un color azul tenue cuando se calienta previo tratamiento con H₂SO₄ y de un color azul intenso cuando se calienta previo tratamiento de vainillina-H₂SO₄ (Figura 19). Enseguida se procedió a realizar la separación cromatográfica con un sistema CH₂Cl₂/MeOH en una proporción 9:1, se recolectaron fracciones de 15 mL y se monitorearon por CCF. Se identificaron las fracciones con el compuesto que cumplían las características arriba descritas y se llevaron a sequedad en el rotavapor. Se obtuvieron 30 mg de un sólido blanco, mismos que fueron analizados por las técnicas espectroscópicas de RMN, IR, UV-

Vis y por espectrometría de masas, después del análisis de los espectros, el compuesto aislado (Figura 20) se elucidó como el iridoide asperulósido (1).

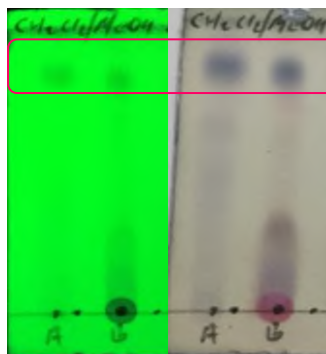


Figura 19. Placas cromatográficas (CH₂Cl₂/MeOH, 8:2), izquierda revelada a 254 nm; derecha, revelada por calentamiento previo tratamiento vainillina-H₂SO₄. a) asperulósido puro; b) extracto etanólico de frutos.

Con el fin de identificar si este compuesto también se encontraba en el resto de la planta, se llevó a cabo un análisis mediante CCF de todas las fracciones obtenidas del extracto de la planta utilizando al asperulósido aislado como referencia. Como resultado de este estudio, las fracciones de *n*-BuOH y H₂O mostraron un compuesto con el mismo R_f que **1** (Figura 21).

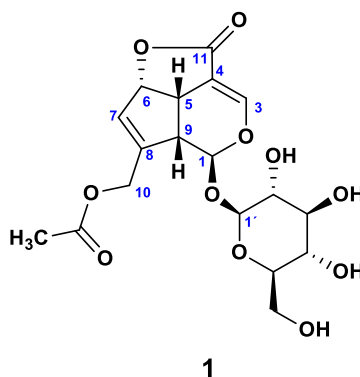


Figura 20. Estructura del iridoide asperulósido (1) aislado de frutos y planta de *Coccocypselum hirsutum*.

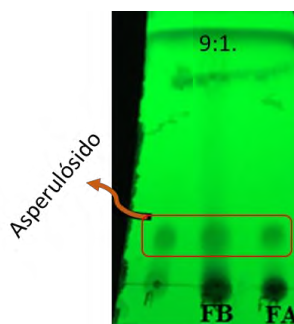


Figura 21. Placa cromatográfica de las fracciones de agua (FA) y *n*-butanol (FB) utilizando como referencia asperulósido, ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1).

Las fracciones de *n*-BuOH y acuosa se juntaron y se llevaron a cromatografía en columna, después de identificar las muestras puras de asperulósido se llevaron a sequedad, se obtuvieron 100 mg del iridoide **1**. Con los resultados anteriores se puede concluir que el iridoide asperulósido se encuentra tanto en los frutos como en la planta, esto es muy importante ya que esta reportado que el iridoide **1** exhibe propiedades biológicas muy interesantes, y si bien los frutos de la planta son de temporada, la planta es perenne y puede representar una fuente constante de asperulósido.

A continuación, se discuten los datos obtenidos mediante las técnicas de RMN, IR, UV-Vis y masas.

Los espectros de RMN del iridoide (**1**) se obtuvieron usando CD_3OD como disolvente. En el espectro de RMN de ^1H (Figura 22) se observan señales en 4.70-3.1 ppm, dichas señales corresponden para un glúcido, a través del experimento TOCSY se identificó el patrón de la glucosa (Figura 23). La constante de acoplamiento del protón anomérico $\text{H}-1'$ ($J= 7.9$ Hz) indica, además, que se trata del anómero β .

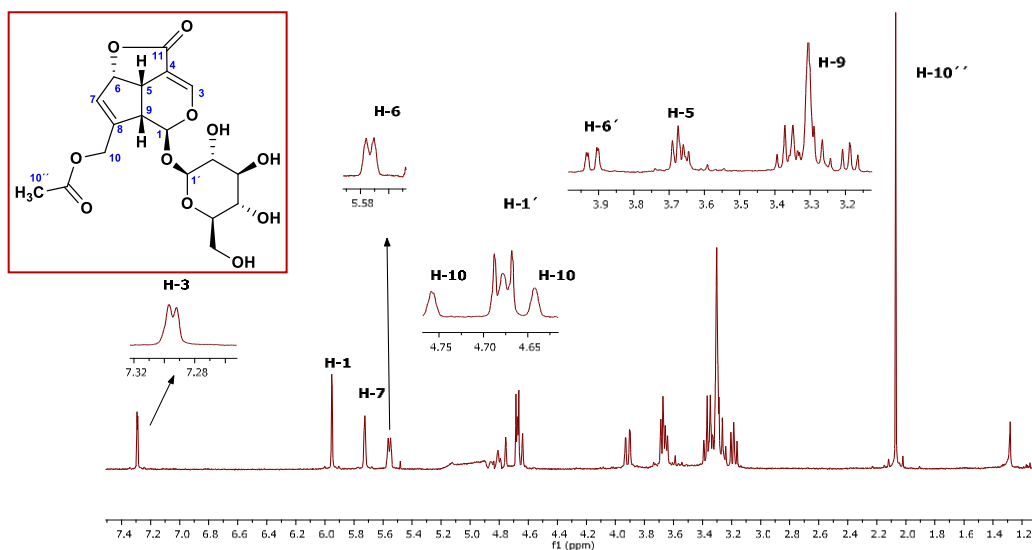


Figura 22. Experimento de RMN de ^1H _Presat del asperulósido (1); para una mejor visualización se expanden las señales de los protones H-3, H-6, H-1', H-10, H-6', H-5 y H-9.

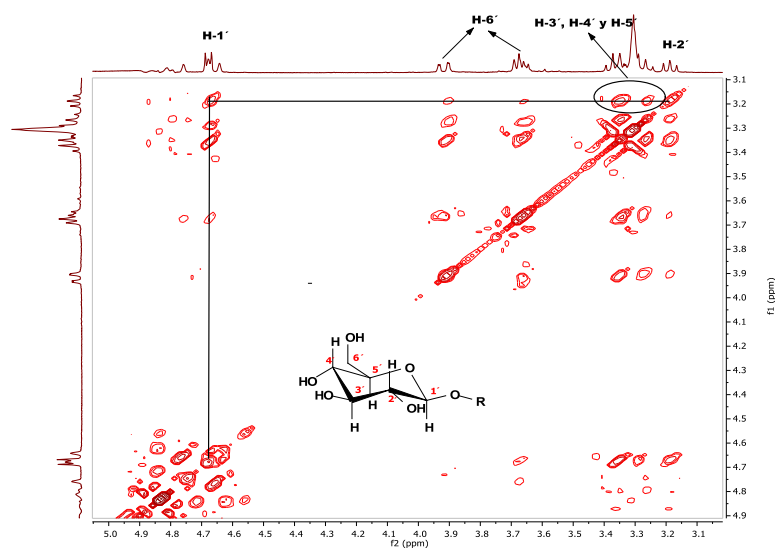


Figura 23. Experimento TOCSY del asperulósido (1), se observa a través de las líneas punteadas la correlación de los protones de la cadena carbonada de la glucosa.

En el espectro de RMN de ^{13}C se encuentran las 18 señales que se esperan para el iridoide (Figura 24), seis señales de ellas corresponden para la glucosa. En el espectro de protón (Figura 22), el protón anomérico se traslapa con uno de los protones diastereotópicos de C-10 (4.67 ppm), sin embargo, en el experimento

gHSQC (Figura 25) es posible observar que dos carbonos correlacionan con las señales traslapadas, uno de ellos es un carbono de metileno (C-10, 61.9 ppm) y el otro corresponde a un carbono de metino, siendo este último el carbono anomérico (100 ppm). Además, el protón anomérico muestra una correlación en el experimento gHMBC con el carbono C-1 de la aglicona (Figura 27), de esta forma se puede establecer que el glúcido forma parte del compuesto **1**.

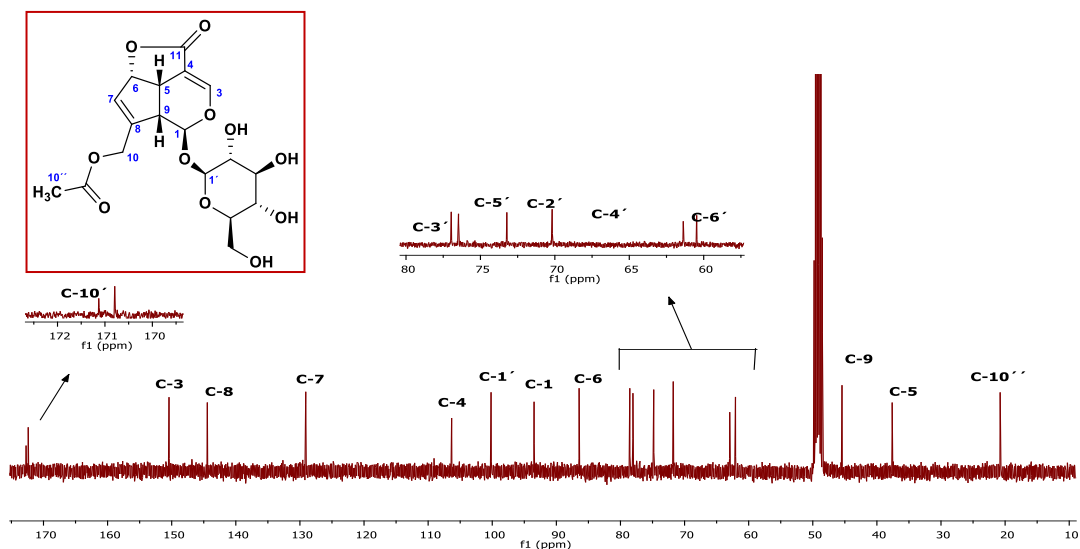


Figura 24. Experimento de RMN de ^{13}C para el asperulósido (**1**); Se observan 18 señales de carbono correspondientes para su estructura.

Las señales de los carbonos protonados se pudieron identificar a partir del espectro gHSQC (Figura 25), se observaron dos señales correspondientes a grupos metilenos ($-\text{CH}_2-$), ambos con protones diasterotópicos, una de ellas corresponde al C-6' de la glucosa y otra al C-10 de la aglicona. Las señales de los carbonos cuaternarios, que no se detectaron con este experimento, se pudieron identificar mediante el análisis del experimento gHMBC.

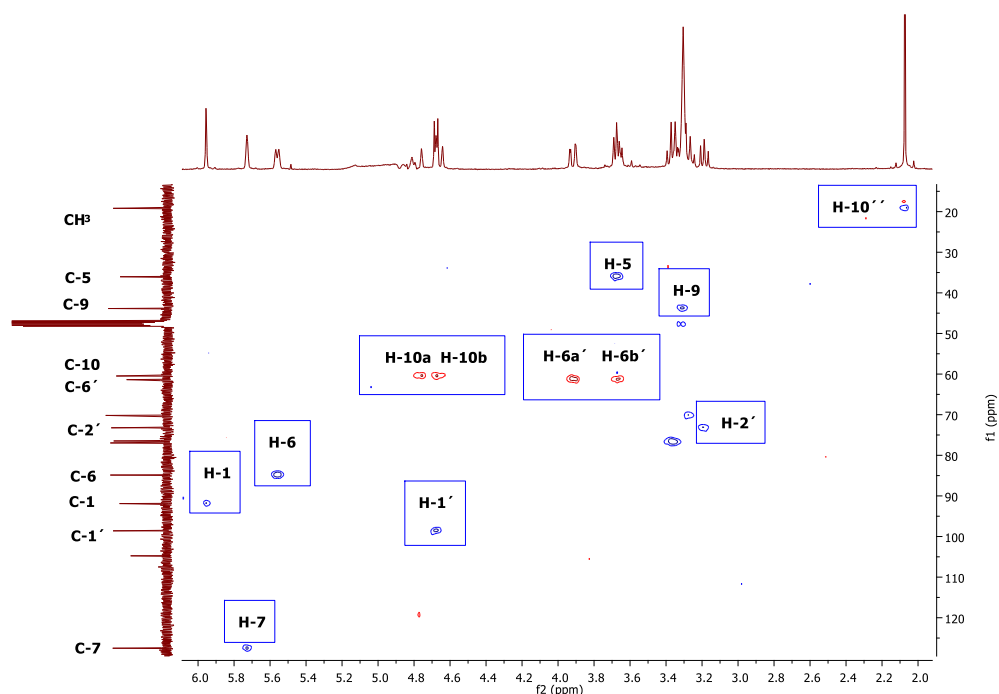


Figura 25. Experimento gHSQC para el asperulósido (**1**); se observan las correlaciones directas entre los protones y sus respectivos carbonos.

El espectro de gHMBC proporcionó información fundamental para asignar la conectividad del esqueleto tricíclico, además de que permitió establecer la conectividad del glúcido con la aglicona. En la figura 27 se observa la correlación a dos y tres enlaces del protón vinílico H-3 con los carbonos C-4, C-5 y C-1. Mientras que el protón base de oxígeno H-1 presenta correlación con C-3, C-5 y con el carbono anomérico C-1' (Figura 26b). Los protones diastereotópicos (H-10) de la aglicona correlacionan a larga distancia con dos carbonos vinílicos de acuerdo al experimento gHMBC (Figura 27), uno de ellos cuaternario (C-10', 144.3 ppm) y el otro un carbono de metino (128.9 ppm), además, presenta una correlación con otro metino (-CH-) en 93.3 ppm.

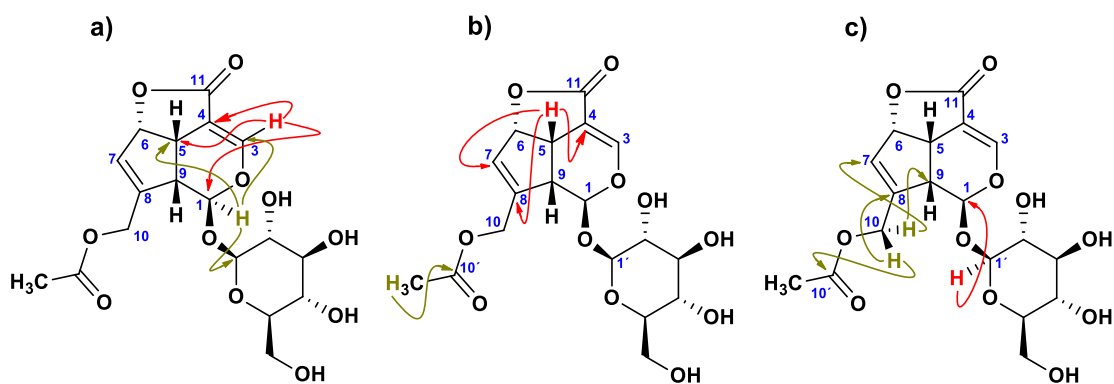


Figura 26. Correlación de los protones H-10, H-5, H-3 y H-1 del asperulósido (**1**) que se observan en el experimento gHMBC.

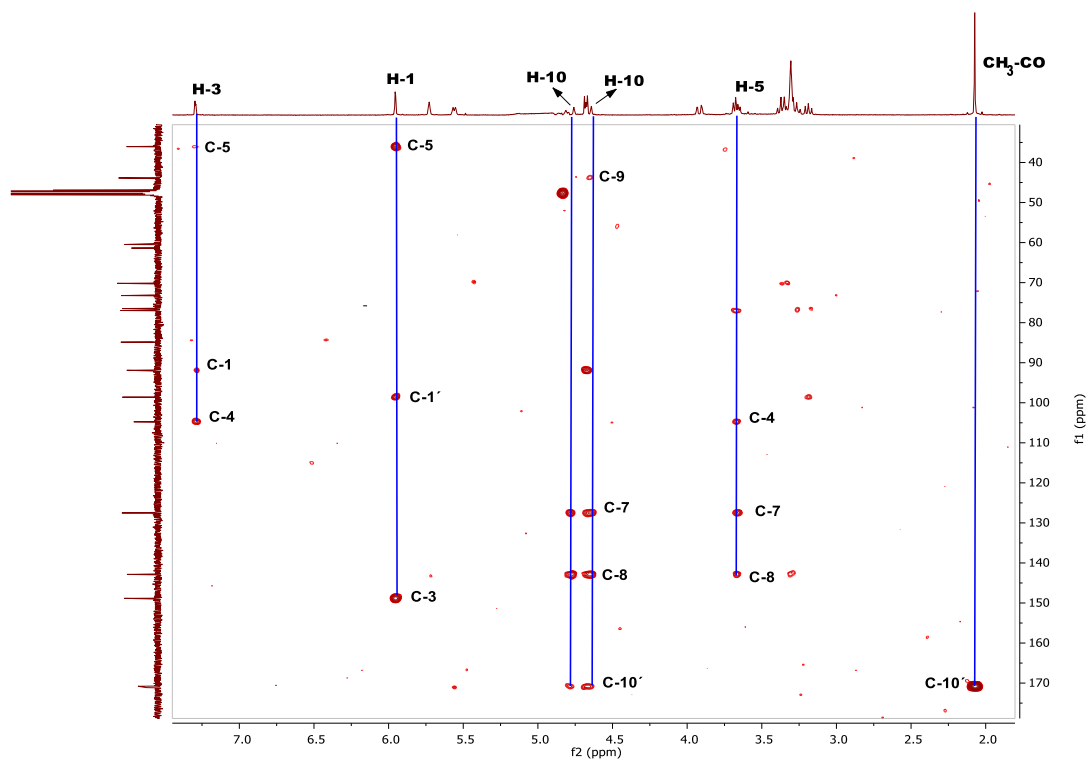


Figura 27. Experimento gHMBC de asperulósido (**1**); se observa con línea azul las correlaciones a dos y tres enlaces entre los protones y carbonos claves para la determinación estructural de **1**.

En la tabla 8 se muestran los desplazamientos químicos de los carbonos y protones de la molécula y su correlación a través de los experimentos gCOSY y gHMBC.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN del iridoide asperulósido (1) (CD₃OD).

Núm. de carbonos	δ		COSY	HMBC
	¹ H	¹³ C		
Aglicona				
1	5.96 (s, 1H)	93.3		C-1', C-3, C-5
2	---	---	---	---
3	7.20 (d, 1H, <i>J</i> =1.96 Hz)	150.3	---	C-1, C-4, C-5
4	---	106.2		---
5	3.68 (1H)	37.5	H-9	C-4, C-8, C-7, C-3
6	5.56 (d, 1H, <i>J</i> =6.62 Hz)	86.3	H-5	C-11
7	5.73 (s, 1H)	128.9		C-5, C-9
8	---	144.3	---	---
9	3.29	45.3	H-6	C-8, C-5
10	4.66	61.9	H-10 _b	C-7, C-8, C-10'
	4.77		H-10 _a	
11	---	172.2	---	---
10'	---	172.6	---	---
10''	2.07	20.6		C-10'
Glucosa				
1'	4.67 (d, 1H, <i>J</i> =7.9 Hz)	100		C-1
2'	3.19	74.7	---	C-1', C-5'
3'	3.35	78.4	---	C-4', C-2'
4'	3.27	71.6	---	---
5'	3.37	77.9	---	---
6	3.92	62.8	H-6 _b	C-4'
	3.67		H-6 _a	

Una vez propuesta la estructura del iridoide, la muestra aislada se analizó en el espectrómetro de masas mediante inyección directa utilizando la técnica MS-ESI-TOF en modo negativo, se obtuvo un espectro con un ion molecular cuya relación *m/z* fue de 414 [M-H]⁻. Con toda esta información, se sabía que el compuesto aislado contaba con 18 átomos de carbono, un metilo, dos metilenos, diez metinos y cinco cuaternarios, además de cuatro hidrógenos de los cuatro hidroxilos de la glucosa, es decir, C₁₈H₂₁, sin embargo, se debe considerar que no puede haber

número impar de hidrógenos al menos que haya nitrógeno impar en la molécula. La presencia de la glucosa y dos carbonilos de éster indican la presencia de diez oxígenos, $C_{18}H_{22}O_{10}$ que tienen una masa de 398 uma. Es decir, el compuesto aislado tiene una fórmula molecular $C_{18}H_{22}O_{11}$.

Para contribuir a la identificación del compuesto (**1**), se fragmentó la molécula operando el equipo en modo MS/MS utilizando una energía de colisión de 25 eV (Figura 28), el espectro de masas presentó una pérdida m/z 251 que hace referencia al rompimiento del enlace entre el carbono anomérico de la glucosa y el oxígeno del enlace glicosídico que esta forma. Un segundo fragmento de m/z 191 hace referencia a la pérdida de una molécula de agua proveniente de la glucosa y la señal presente en m/z 147 hace referencia al rompimiento de la aglicona entre el C-8 y C-9 (grupo éster), así como la pérdida adicional de un oxígeno de grupo carbonilo y la glucosa. Todas las señales corroboran la estructura planteada, además de que en el experimento masas-masas, la fragmentación que se observa es coherente con la estructura.

También se caracterizó al asperulósido (**1**) por espectrofotometría UV-Vis y FTIR. Para cada caso, la muestra se disolvió en MeOH. El espectro de UV-Vis se obtuvo con un barrido en el rango de 700 a 200 nm; como resultado se observa una banda con máximo de absorción en 234 nm (Figura 29). En el espectro de infrarrojo destacan las bandas de vibración de los grupos carbonilos, en 1739 cm^{-1} y en 1656 cm^{-1} , así como una banda ancha en 3376 cm^{-1} característica de grupos hidroxilos presentes en el glúcido (Figura 30). Todos estos datos son consistentes con los descritos en la literatura para este compuesto.

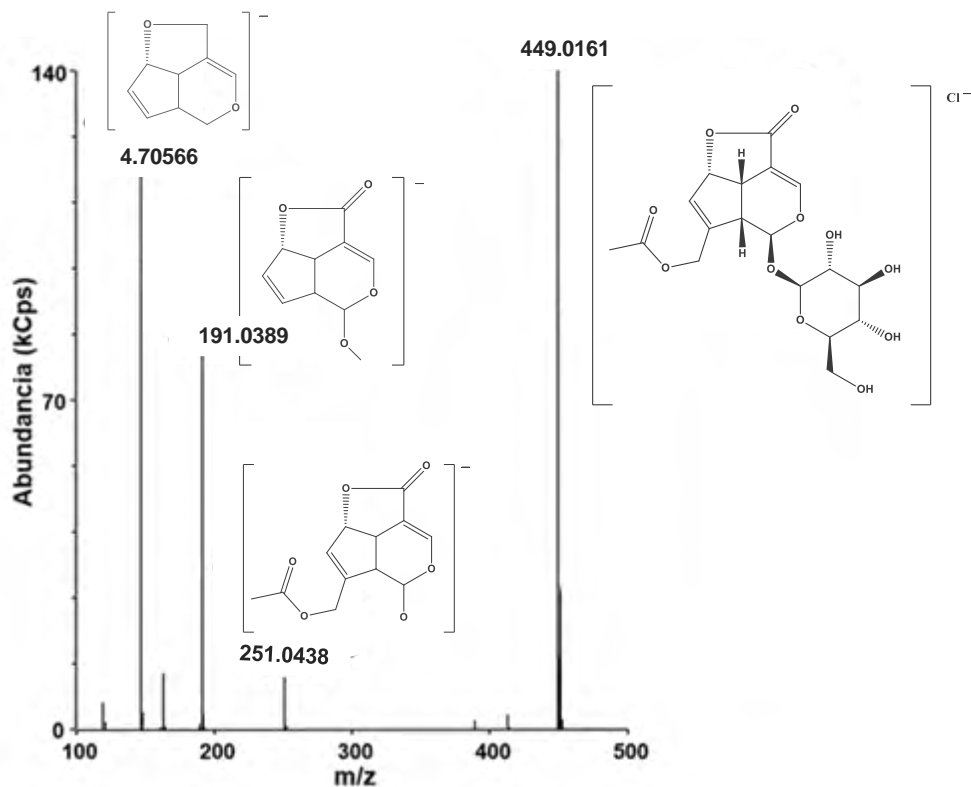


Figura 28. Espectro de masas para el asperulósido (1).

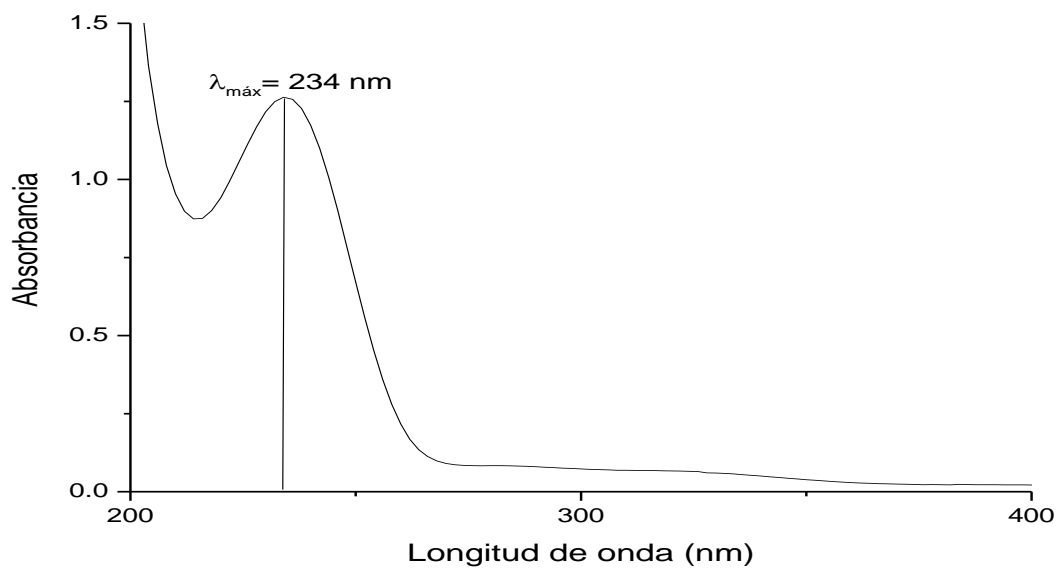


Figura 29. Espectro de UV-Vis para el asperulósido (1) en MeOH.

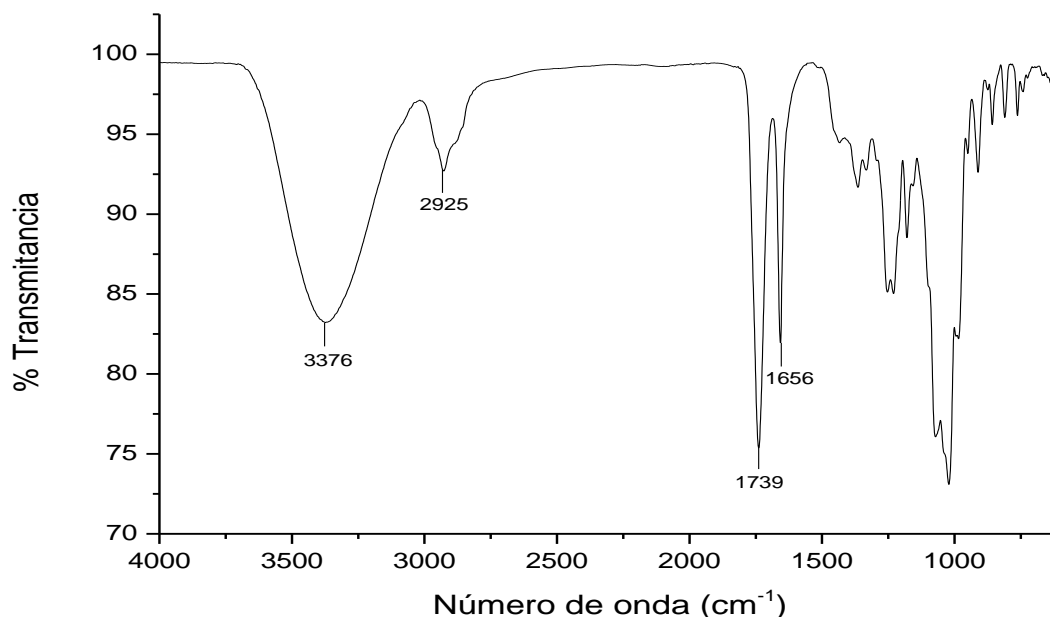


Figura 30. Espectro de IR para el iridoide asperulósido (1).

Los datos espectroscópicos para el iridoide asperulósido coinciden con los reportados en la literatura.⁶¹

Se sabe que el asperulosido ha sido reportado en especies como *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae), *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae), *Galium verum* (Rubiaceae), *Oldenlandia corymbosa* L. (Rubiaceae), *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae), entre otras; sin embargo los métodos de extracción no son del todo eficaces; recientemente, se encontró un reporte de aislamiento de asperulósido para *Coprosma quadrifida* usando agua caliente a presión (cafetera expreso).⁶² Con base a lo anterior y con el fin de analizar si esta técnica de extracción de asperulósido era aplicable también a *Coccocypselum hirsutum* se realizó un ensayo en una cafetera expreso, donde se colocaron 10 g de planta molida y se le hicieron pasar 300 mL de H₂O (el proceso tarda menos de 3 minutos), al extracto acuoso se le realizaron extracciones líquido-líquido (hexano, CHCl₃, AcOEt y *n*-BuOH). Después de sacar CCF de los extractos colocando como referencia al asperulósido, la fracción de *n*-BuOH presenta un compuesto con las mismas características que el asperulósido. En esta prueba preliminar se observó la disminución de los compuestos de menor polaridad y el incremento de

los compuestos polares. Esta metodología representa una alternativa para el aislamiento de asperulósido en un proceso más rápido y sin el uso de grandes cantidades de disolventes.

Con el propósito de identificar nuevos productos naturales que retarden el envejecimiento, prevengan la pérdida de memoria asociada a la edad, y reduzcan la incidencia de enfermedades neurodegenerativas se han llevado numerosas investigaciones. Los resultados de estas han permitido identificar una gran cantidad de plantas que contienen iridoides que coadyuvan al mejoramiento de estos padecimientos y síntomas.

Los iridoides son una familia de metabolitos aislados y caracterizados de plantas utilizadas en la medicina tradicional como remedios para una gran cantidad de enfermedades. Estos compuestos pueden encontrarse como estructuras abiertas (secoiridoides y derivados de iridoides), o cerradas (iridoides propiamente dicho) y generalmente aparecen en forma de heterósidos, mayoritariamente como glucósidos. Estos compuestos presentan propiedades benéficas sobre la función hepática y sobre la capacidad para estimular la excreción de ácidos biliares. También han mostrado actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral, se han utilizado como antídoto en el envenenamiento producido tras el consumo de hongos venenosos del género *Amanita*.^{8,63}

El asperulósido aislado en este trabajo pertenece a esta familia, el cual presenta actividad anti-obesidad,⁶⁴ se ha demostrado que tiene actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa,⁶⁵ enzima responsable del almacenamiento final de la digestión de carbohidratos, proceso retardante que puede moderar la hiperglicemia. También está reportado que el asperulósido tiene actividad anti-cancerígena sobre cáncer de pecho (YMB-1) y sobre líneas celulares humanas de leucemia promielocítica (HL60)⁵⁹ y actividad antiinflamatoria.⁶⁶

9.4.2. Determinación de la actividad antiproliferativa del asperulósido por MTT

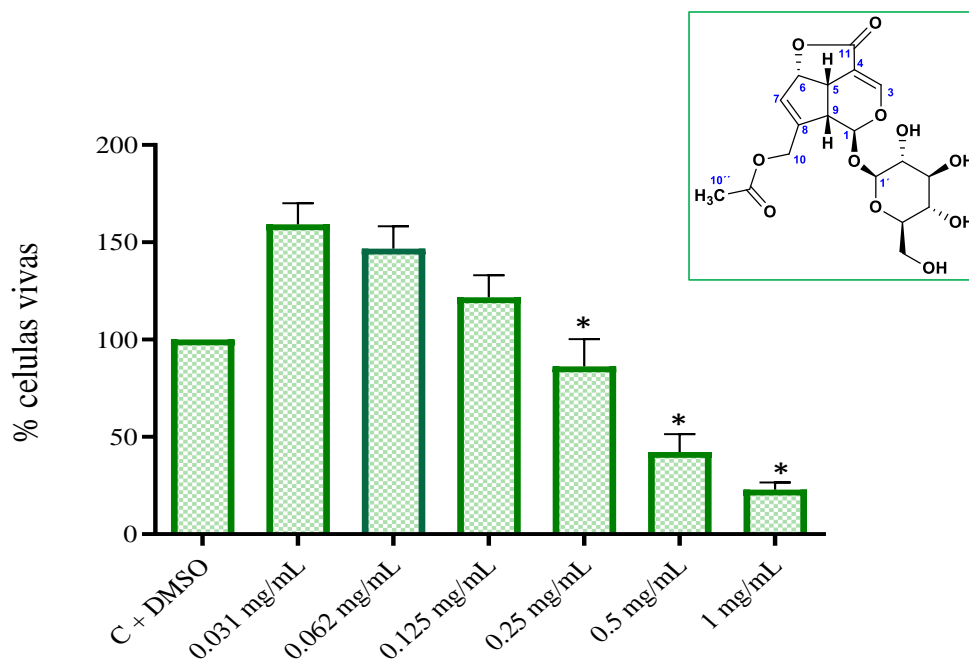
En el tamizaje preliminar de agentes con actividad anticancerígena se han empleado grupos de líneas celulares derivadas de tumores humanos que son

expuestas a la sustancia en estudio por un periodo determinado, al cabo del cual se evalúa la viabilidad celular; la capacidad citotóxica de los agentes estudiados es interpretada como un indicativo de potencial actividad anticancerígena *in vivo*.⁹ Del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces se observó que las fracciones con mayor actividad resultaron ser las más polares, mediante la purificación por CC de las fracciones de *n*-BuOH y agua se aisló un compuesto llamado asperulósido; para el cual se reporta actividad anticancerígena sobre las líneas celulares YMB-1 y HL60. Se buscó probar esta actividad frente a las células de cáncer de mama MCF-7, con las cuales se había realizado la evaluación a dichas fracciones, esto para establecer si el asperulósido era el responsable de la actividad antiproliferativa presentada.

La citotoxicidad del asperulósido aislado de las fracciones polares de *Coccocypselum hirsutum*, se realizó utilizando la línea celular de cáncer de mama MFC-7, y la viabilidad celular fue determinada por la técnica del MTT.

Las células de cáncer de mama (MCF-7) fueron tripsinizadas, contadas en cámara de Neubauer, transferidas a placas de microtitulación de 96 y 9 pozos con fondo plano (20,000 células por pozo). Después de un periodo de preincubación de 24 horas fueron tratadas con asperulósido a diferentes concentraciones (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.065, 0.032 mg/mL), el asperulósido fue retirado y la masa celular fue determinada por reducción de MTT. Se calcularon los porcentajes relativos de supervivencia de las células tratadas usando como referencia las células no tratadas y tratadas con DMSO.

El asperulósido mostró actividad antiproliferativa significativa a las concentraciones de 1 y 0.5 mg/mL en dos ensayos realizados por triplicado, se consideraron activas estas concentraciones ya que presentaron porcentajes de viabilidad inferiores a un 50%. La concentración de 1 mg/mL tuvo la mayor actividad como se muestra en la gráfica 6 con 22% de viabilidad siendo esta la concentración más activa para la línea MCF-7. Por otra parte, en las concentraciones menores no se detectaron cambios frente al blanco control, presentando porcentaje de supervivencia mayores al 50%.



Gráfica 6. Viabilidad del asperulósido (1) frente a la línea celular MCF-7 a una concentración de 1, 0.500, 0,250, 0.125, 0.065, 0.032 mg/mL. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar * $p \leq 0.05$ vs control, $n=6$

9.4.3. Aislamiento e identificación de antocianinas

En la extracción de los frutos de la yerba de guava con etanol absoluto se logró aislar al iridoide asperulósido, sin embargo, los frutos conservaron su color azul púrpura. Cuando la extracción se realizó con una mezcla EtOH/H₂O en una relación 1:1, se logró la extracción de un pigmento estable (Figura 32).

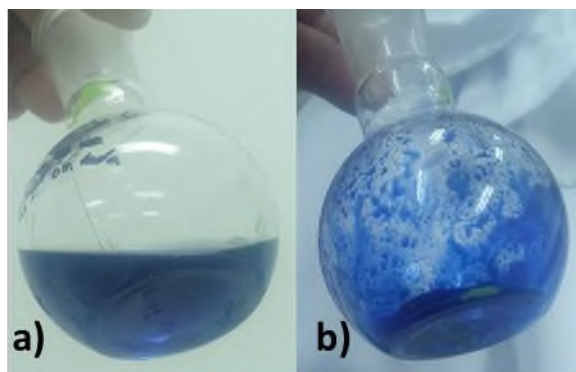


Figura 31. Izquierda, pigmento en solución hidroalcohólica; derecha, pigmento después de eliminar la mezcla de disolventes.

El extracto hidroalcohólico de los frutos, de color azul, cambia a una tonalidad roja cuando se le adiciona un ácido (HCl, H₂SO₄, AcOH) (Figura 33). Se conoce que las antocianinas son pigmentos azules, rojos o púrpuras que se encuentran en las plantas, principalmente en las flores, frutos y tubérculos. En condiciones ácidas, las antocianinas aparecen como un pigmento rojo, mientras que en medio neutro o básico son pigmentos de color azul.⁶⁷



Figura 32. Extracto hidroalcohólico de los frutos de la yerba de guava; a) pH ácido, b) pH neutro.

Las antocianinas son flavonoides fenólicos con una carga positiva en el átomo de oxígeno del anillo C de la su estructura básica, a este esqueleto con carga también se le conoce como ion flavilio (Figura 34).

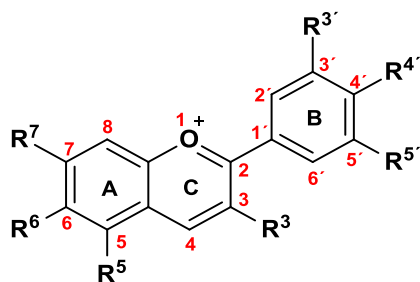


Figura 33. Estructura básica de las antocianinas, ion flavilio.

Químicamente, las antocianinas son glucósidos, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina (aglicona) a la que se le unen glúcidos. A la fecha se han aislado más de 600 antocianinas, la mayoría de ellas tienen como aglicona a las siguientes antocianidinas: cianidina (**7**), delphinidina (**8**), pelargonidina (**9**), peonidina (**10**), petunidina (**11**) y malvidina (**12**).

En la naturaleza, la cianidina es responsable del color magenta en las flores y frutos; la pelargonidina les da la tonalidad naranja a las flores; la peonidina es responsable del color magenta en las uvas y en el vino tinto; la malvidina le da el color azul a las flores y es de las antocianinas mayoritarias en el vino tinto; la petunidina es un pigmento rojo oscuro soluble en agua que le da el color a las grosellas y a los pétalos morados de las flores; El azul intenso de las flores se debe al pigmento delfinidina (8).⁶⁵ De acuerdo a estas características de color, la antocianina presente en los frutos de la yerba de guava se puede limitar a un derivado de delfinidina, malvidina o petunidina.

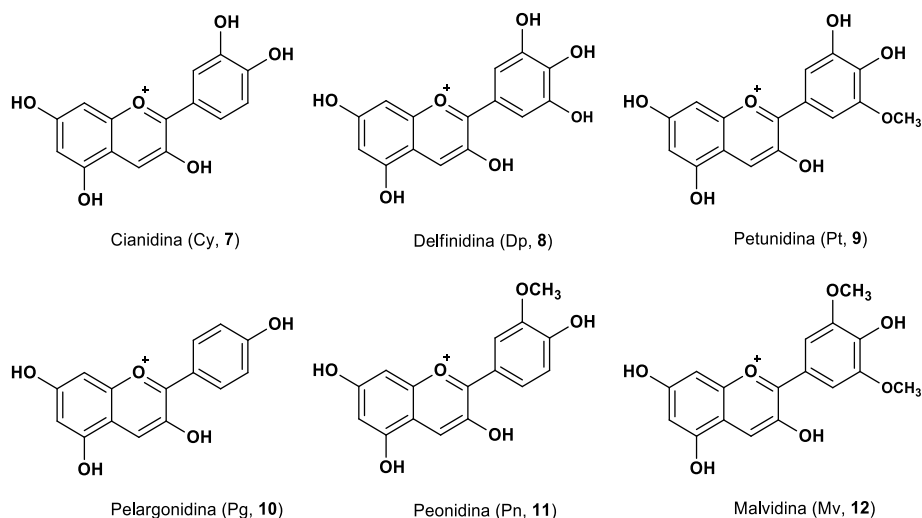


Figura 34. Antocianinas más comunes en las plantas.

La estabilidad de las antocianinas depende del pH, luz, temperatura y estructura. La copigmentación es un fenómeno natural que ocurre cuando las antocianinas interactúan con otras sustancias tales como ácidos fenólicos, flavonoides e iones metálicos (M^{n+}) para auto-ensamblarse en complejos supramoleculares. Los complejos resultantes protegen al ion flavilio de ataques nucleofílicos y pueden proteger a las antocianinas de la degradación debida al pH y a la temperatura. La habilidad de las antocianinas para crear complejos con M^{n+} está determinada por su estructura química, preferentemente forman complejos las antocianinas con dos o tres grupos hidroxilo en el anillo B; los derivados de cianidina, delfinidina y petunidina, usualmente se enlazan al M^{n+} por dos $-OH$ sustituidos en posición orto

en el anillo B. Mientras que, aquellas antocianinas con un solo grupo $-OH$, tienen menor probabilidad de formar enlaces con M^{n+} .⁶⁸ De acuerdo a la habilidad para formar complejos con M^{n+} , la antocianina presente en los frutos de *Coccocypselum hirsutum* se puede restringir a un derivado de delphinidina, cianidina o petunidina.

En las antocianinas, en un $pH < 2$ predomina el ion flavilio (AH^+) y se observa en una tonalidad roja, mientras que a $pH > 2$ puede ocurrir la hidratación del ion flavilio y se forma el hemiacetal que es incoloro (B), el cual se tautomeriza hacia la *cis*-chalcona, de color amarillo, y se isomeriza a la *trans*-chalcona. La transferencia de protón vuelve el ion flavilio (AH^+) hacia la base quinoidal neutra (A) que se caracteriza por tener una tonalidad púrpura. A un pH 6-8, la forma aniónica de la base quinoidal (A^-) es la predominante. El enlace a un Me^{n+} desplaza el equilibrio entre las diferentes estructuras hacia la creación de la forma quinoidal azul y tiende a estabilizar la estructura resultante (Figura 36).

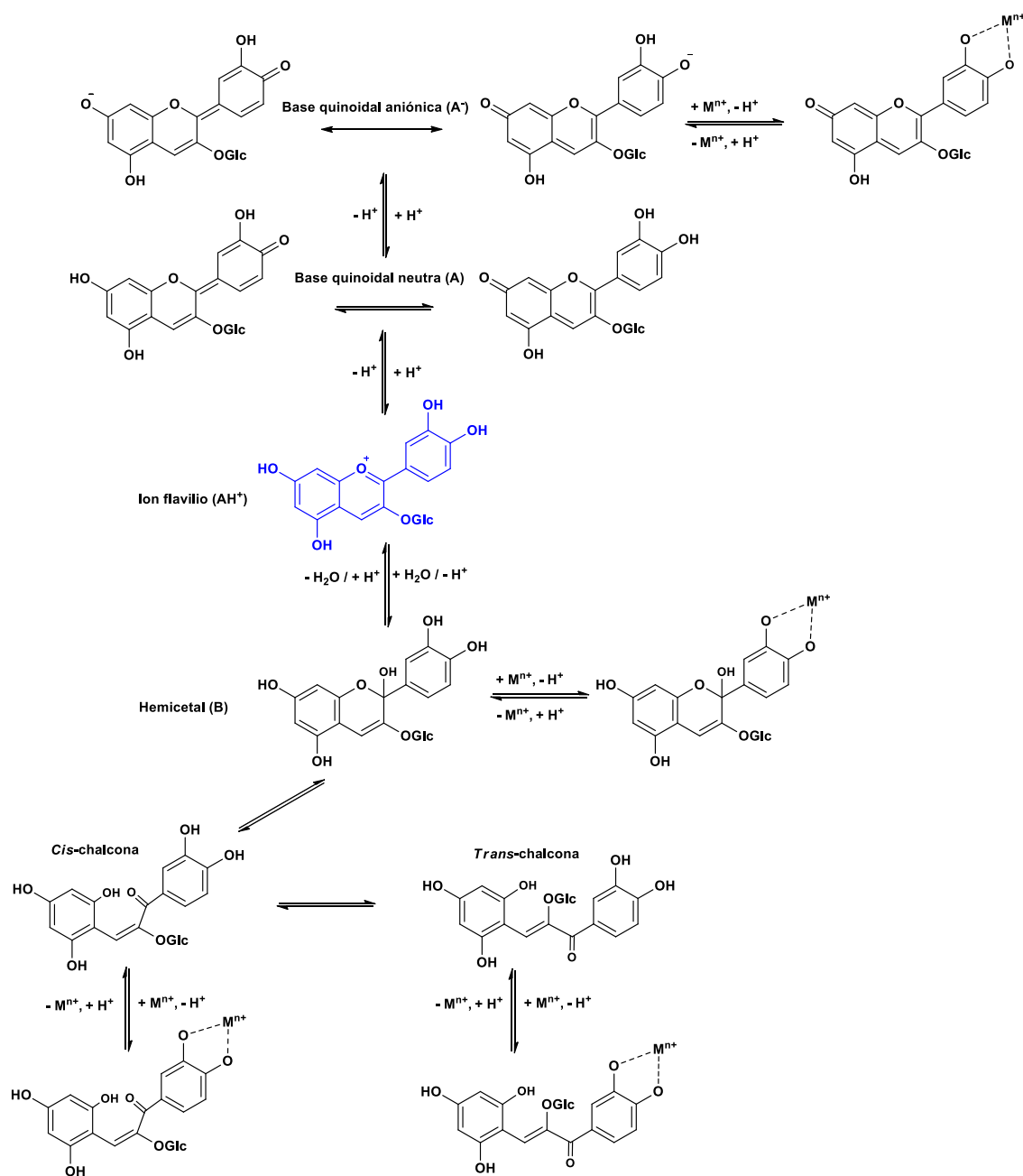


Figura 35. Transformaciones estructurales de cianidina-3-glucosa en soluciones ácidas a neutras y las diferentes posibilidades de enlace a iones metálicos (Mⁿ⁺). (Modificada de Fadenko, 2017).

La habilidad de las antocianinas para formar enlaces con iones metálicos es de gran interés debido a que el enlace antocianina-Mⁿ⁺ estabiliza a las antocianinas de fuentes comestibles y permite modificar su color para usarlos como colorantes de alimentos. Además, los complejos entre metales y antocianinas se han usado para la determinación de múltiples elementos metálicos a través de

espectroscopia UV-Vis. Desde el punto de vista ecológico, la habilidad de las antocianinas para formar co-pigmentos estables resulta en plantas con coloraciones púrpuras, azules, violetas que son la base de su interacción con los polinizadores.⁶⁵

La espectroscopia UV-Vis se considera una de las herramientas que arroja más información sobre el enlace antocianina-Meⁿ⁺, el enlace con el metal cambia la conjugación del cromóforo de la antocianina y va acompañado de cambios cromáticos. Así, el registro de las características espectrales en los máximos de absorción en la región UV-Vis es la forma más factible de confirmar tales cambios.

Se ha encontrado que el Al³⁺ induce un desplazamiento batocrómico en antocianinas, el complejo delfinidina-Al³⁺ y co-pigmentos son responsables del color azul intenso en los pétalos de las flores de *Hydrangea macrophylla* (hortencia).⁶⁹ Sin embargo, el color azul en los pétalos de otras especies se debe a la formación de complejos antocianina con Fe³⁺ o Mg²⁺ y co-pigmentos.

Todas las antocianinas presentan dos bandas de absorción, una en la región de UV (260-280 nm) y la otra en la región visible (490-550 nm). El máximo de absorción para las antocianinas en la región visible está entre 520 y 546 nm (pelargonidina, 520 nm; delfinidina, 546 nm), y sus monoglicósidos presentan absorciones con 10 a 15 nm menos (Figura 37).⁷⁰

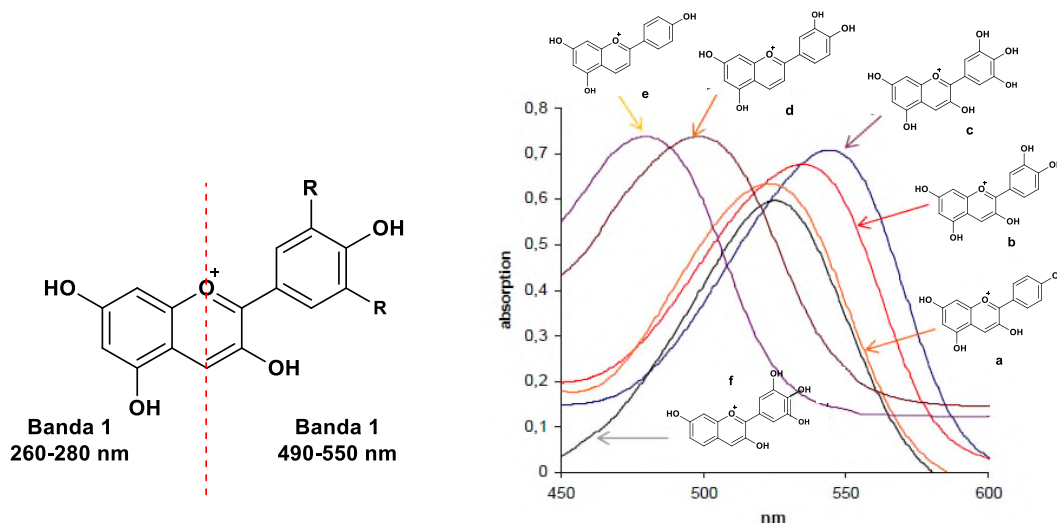


Figura 36. Izquierda, cromóforos responsables de la absorción en las regiones de UV (260-280 nm) y visible (490-550 nm); Derecha, bandas de absorción características para las antocianidinas, a) pelargonidina, b) cianidina, c) delphinidina, d) luteolinidina, e) apigeninidina, f) robinetinidina. (Modificada de Halbwirth, 2010).

Al extracto de los frutos de la yerba de guava que se obtuvo con EtOH/H₂O se le realizó un análisis por espectrofotometría de UV-Vis, para determinar cuál de las antocianinas estaba presente (Figura 38). Este extracto se fraccionó, purificó por CC para eliminar los contaminantes no polares y los de mayor polaridad y se obtuvieron fracciones enriquecidas con la antocianina. Para la CC se utilizó gel de sílice como fase estacionaria y un sistema H₂O/MeOH, 1:1, se identificaron las fracciones que mostraban una coloración azul ($R_f = 0.3$, MeOH/*i*-PrOH/H₂O, 7:2:1). Las fracciones enriquecidas fueron concentradas y llevadas a sequedad y se le realizaron análisis de UV-Vis (Figura 39). El espectro UV-Vis del extracto crudo EtOH/H₂O (en negro) y de la fracción de la CC (en rojo) presentan las mismas bandas de absorción. Se observan dos bandas con λ_{max} en 292 y 572 nm.

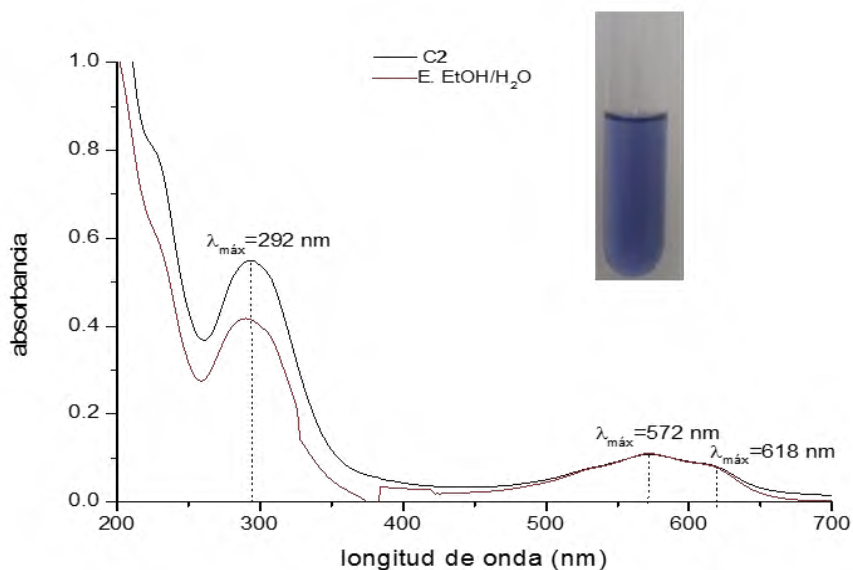


Figura 37. Espectro de absorción UV-Vis del extracto EtOH/H₂O de frutos y pigmento azul aislado por CC.

De acuerdo a lo que se comentó anteriormente, algunas antocianinas poseen la habilidad de formar complejos con M^{n+} (Al^{3+} , Fe^{3+} y Mg^{2+}), el resultado de esto es un desplazamiento batocrómico de la banda 2 (se observa en 572 nm), de acuerdo a lo que se observa en el espectro de la figura 38 se puede inferir que la antocianina aislada está formando un complejo. La copigmentación también puede ser responsable del color azul-púrpura, por lo que no se descarta que la antocianina este formando complejos supramoleculares con compuestos como los ácidos fenólicos, los flavonoides y/o los iones metálicos (M^{n+}).⁵⁴ Con toda esta información y con el conocimiento de que este tipo de pigmentos presentan variación del color cuando existen cambios de pH o la formación de complejos fue el punto clave para determinar la presencia de antocianinas en los frutos. En la figura 39 se observa el espectro de UV-Vis, tanto del extracto en pH neutro como en pH ácido, se observa que la adición de ácido favorece el equilibrio hacia el ion flavilio mostrando una λ_{max} a 530 nm, este resultado es congruente para antocianinas con la aglicona delphinidina.

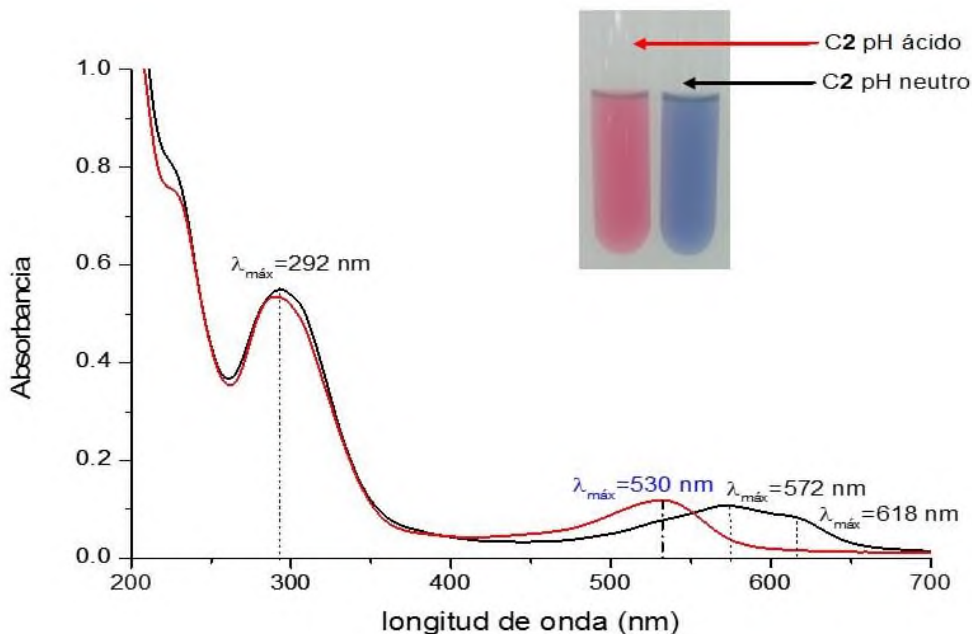


Figura 38. Efecto del pH sobre la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción (572 nm) del compuesto azul (2) aislado por CC del extracto hidroalcohólico de frutos, desplazándola a 530 nm en presencia de medio ácido.

Smyk *et al* reportaron en el 2008⁷¹ que la Cianidina 3-glc y el Cu (II) forman un complejo en el cual se lleva a cabo la reducción de Cu (II) a Cu (I) y la oxidación de la antocianina. Anteriormente se mencionó que la habilidad de las antocianinas para formar complejos depende de la estructura y del pH, es posible formar los complejos con hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B de las antocianinas (Figura 37). Tomando esto en consideración, al extracto hidroalcohólico de los frutos se le agregaron unas gotas de una solución 1 mM de AgNO_3 , después de unos minutos la solución cambia de color azul a un color café y se observa un cambio en la λ_{max} de absorción con respecto a la antocianina en medio ácido y medio neutro (490 nm) (Figura 40). Si bien, con esta prueba no se puede afirmar que se esté llevando a cabo la reducción del ion Cu (II), aporta información estructural de la aglicona.

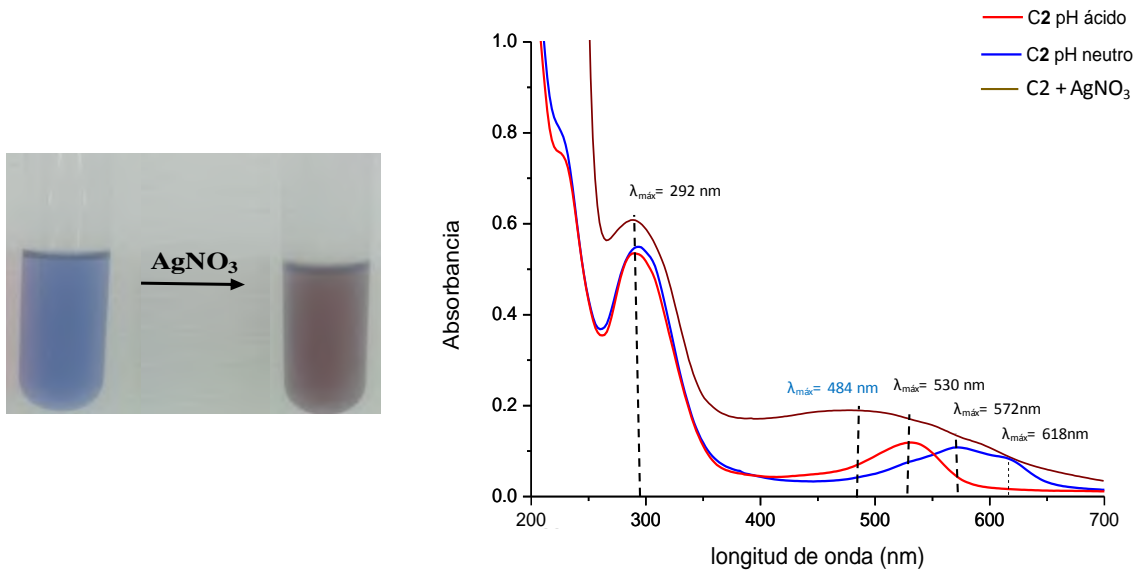


Figura 39. Izquierda, adición de AgNO_3 al extracto hidroalcohólico de los frutos; derecha, espectro UV-Vis de extracto hidroalcohólico de los frutos (azul, pH neutro; rojo, pH ácido) y posible formación de complejo con Ag^{+1} (café).

Con estos resultados se puede afirmar que los frutos de *hirsutum* contienen antocianinas cuya aglicona probablemente tenga la estructura de la delphinidina, cabe recordar que en Brasil se utilizan especies de *Coccocypselum* como colorante alimenticio.

Las antocianinas son un subgrupo importante de flavonoides hidrosolubles con propiedades antioxidantes, responsables de la gama de colores que abarcan desde rojo hasta el azul en muchas flores, verduras y frutas. Los extractos de bayas contienen especialmente una gran cantidad de antocianinas y se utilizan en dietas o aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, las antocianidinas en arándanos puede prevenir enfermedades cardiovasculares al contrarrestar la formación de placa de colesterol en el corazón y la sangre. Además, ejerce efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; al mismo tiempo mejoran la agudeza visual y del comportamiento cognitivo.^{72,73,74}

9.4.4. Pentaacetato de glucosa (3) y diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).

Existen muchos monosacáridos de importancia biológica, pero sin duda la glucosa es la más importante y abundante en la naturaleza, juega un papel central en el metabolismo celular, además de ser el monosacárido principal en la mayoría de polisacáridos.⁷⁵ Los grupos hidroxilos de los carbohidratos pueden experimentar varias reacciones químicas, una de ellas es la esterificación, la cual suele cambiar en gran medida las propiedades físicas y químicas de los azúcares. Se pueden convertir en ésteres y éteres, con los que suele ser más fácil trabajar que con los azúcares libres. Debido a sus numerosos grupos hidroxilos, los monosacáridos suelen ser solubles en agua, pero insolubles en disolventes orgánicos, son difíciles de purificar y tienden a producir jarabes en lugar de cristales cuando se elimina el agua. Sin embargo, los derivados ésteres y éteres son solubles en disolventes orgánicos, se purifican y cristalizan con facilidad. Por lo general, la esterificación se efectúa tratando el carbohidrato con un cloruro de ácido o un anhídrido de ácido en presencia de una base. Todos los grupos hidroxilos reaccionan, incluyendo el anomérico.⁷⁶

De la purificación del extracto etanólico de frutos, en las fracciones de MeOH y H₂O se identificaron compuestos polares que no revelaron en la lámpara de UV, pero que, si revelaron por calcinación con vainillina, H₂SO₄ y con KMnO₄ (Figura 41). Se intentó la purificación de estos compuestos por cromatografía en columna en fase reversa, se utilizó como fase móvil un sistema MeOH/H₂O, pero no se logró la separación de los compuestos puros. Para tener una idea del tipo de estructuras presentes se realizó un análisis por RMN de ¹H y de ¹³C, mediante estos espectros se logró identificar una mezcla de carbohidratos.

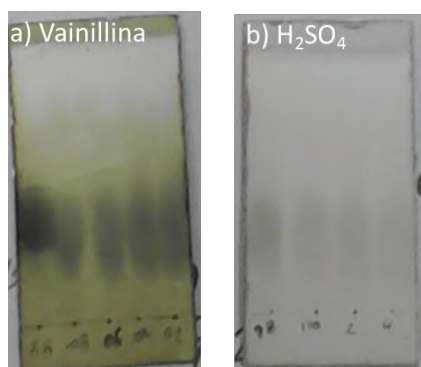


Figura 40. CCF de la mezcla de compuestos extraídos de la purificación por CC del extracto EtOH de frutos.

Con el objetivo de identificar a los carbohidratos presentes, se llevó a cabo una reacción de esterificación usando anhídrido acético a reflujo por dos horas; después del tratamiento a la reacción se obtuvo una mezcla de compuestos de menor polaridad. La separación cromatográfica permitió aislar dos compuestos. El primero de ellos presentó un $R_f = 0.5$ (Hexano/AcOEt, 9:1), el cual reveló al UV (254 nm) y con calcinación previo tratamiento con H_2SO_4 y vainillina (Figura 42). El segundo compuesto aislado presentó un $R_f = 0.7$ (hexano/AcOEt, 9:1) que reveló con H_2SO_4 , vainillina y al UV (254 nm). Los datos del análisis por RMN y espectrometría de masas, de los compuestos aislados permitieron identificar a los isómeros alfa y beta del pentaacetato de D-glucosa (**3**) y al compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (**4**).

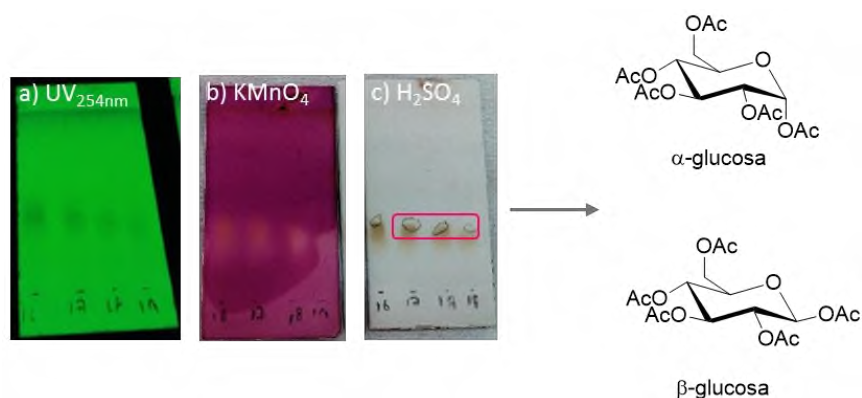


Figura 41. CCF de glucosa esterificada a) $UV_{254\text{nm}}$, b) calentamiento previo tratamiento con $KMnO_4$ y c) con H_2SO_4 , (hexano/AcOEt 7:3).

La elucidación de la mezcla de isómeros alfa y beta del pentaacetato de D-glucosa (**3**) se realizó mediante RMN y espectrometría de masas. En RMN del ^1H se pudieron identificar dos señales en 6.34 y 5.72 ppm correspondientes a los anómeros α y β de la glucosa respectivamente, en la región de 2.0 a 2.20 ppm, se encuentran las señales de metilos de los esterres (Figura 43).

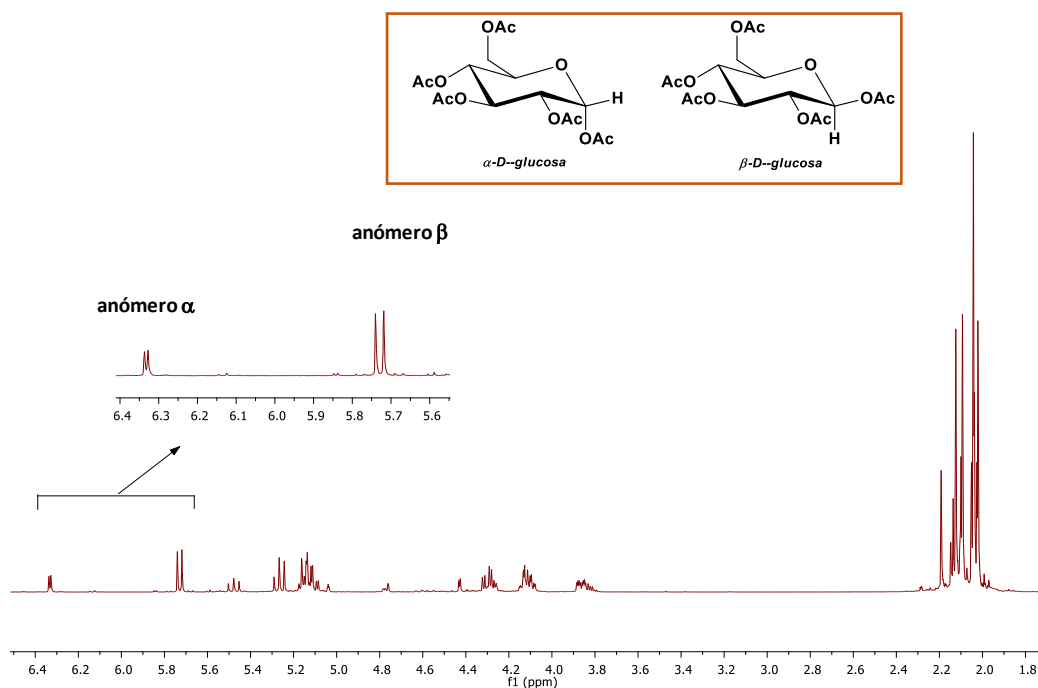


Figura 42. Experimento de RMN de ^1H de la mezcla de anómeros de pentaacetato de D-glucosa (**3**).

Además, a la muestra aislada se le realizó un análisis en el espectrómetro de masas, mediante infusión directa utilizando la técnica de ionización por electrospray en modo positivo. Para esto se ocuparon 5 μL del compuesto los cuales se dejaron evaporar, para favorecer la ionización se empleó 1 mL de MeOH y 2 μL ácido fórmico al 50% como adictivo. Se utilizó un flujo de inyección de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, y una energía de colisión (CE) de 10 eV.

En el espectro de masas se observa un ion molecular con relación m/z de 413.1078, (Figura 44), que coincide con la masa esperada de 413.11 con aducto de Na, del compuesto. La m/z 413 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ que corresponde con el pentaacetato de D-glucosa.

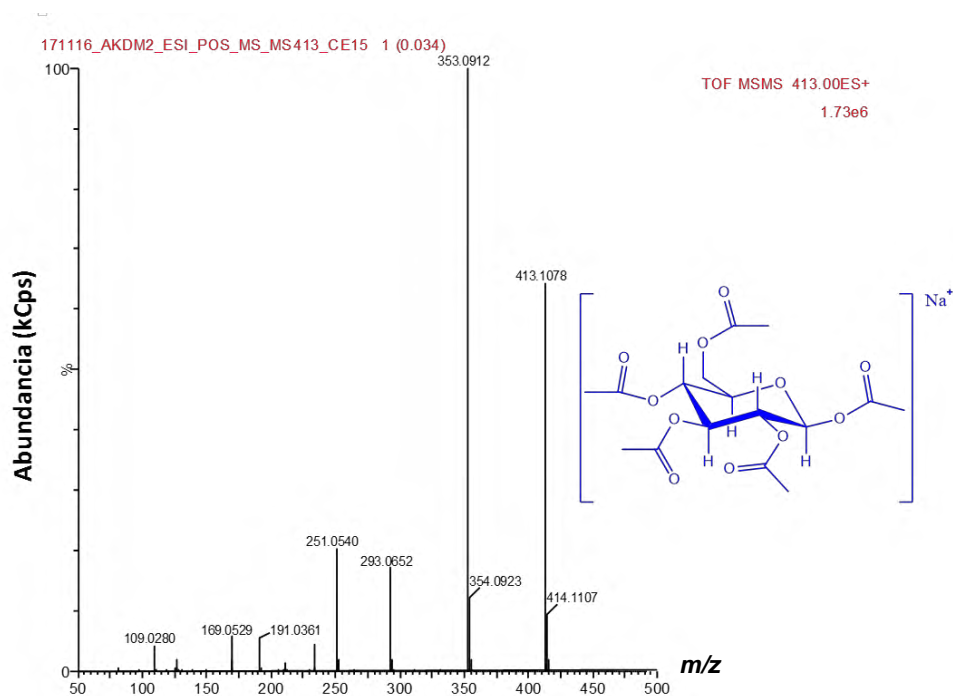


Figura 43. Espectro de masas de la glucosa esterificada (3).

El segundo compuesto aislado en esta cromatografía presentó un $R_f = 0.7$ (hexano/AcOEt, 9:1), que reveló con H_2SO_4 , vainillina y al UV 254 nm, (Figura 45). Los datos del análisis por RMN y espectrometría de masas del compuesto permitieron identificar al diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).

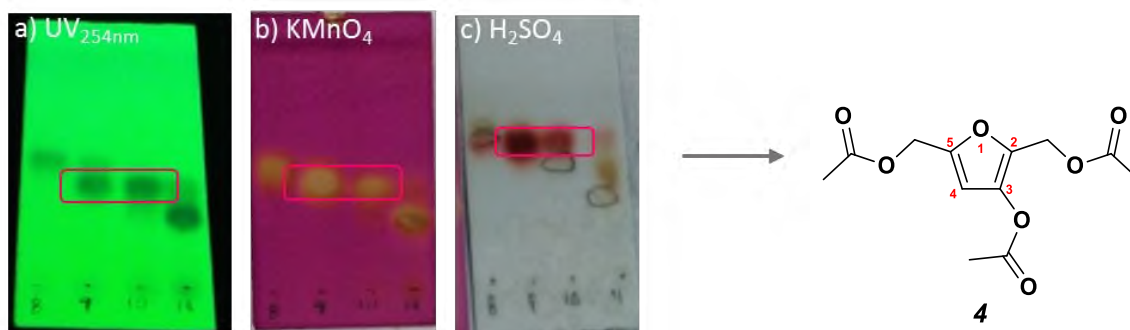


Figura 44. Izquierda, placas cromatográficas del compuesto aislado ($R_f = 0.7$, hexano/ AcOEt, 8:2), a) UV₂₅₄ nm, b) KMnO₄ y c) H₂SO₄; derecha, estructura del diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).

En el espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto **4** se pudieron identificar 12 señales para carbono (Figura 46), tres señales de ellas se asignaron para carbonilos de éster (170.5, 170.4 y 168.1 ppm), además, se pudieron identificar dos carbonos para metileno (58.11 y 54.88 ppm) y una más para carbono de metino (107.66 ppm) y tres señales para metilos que corresponden a los esterés.

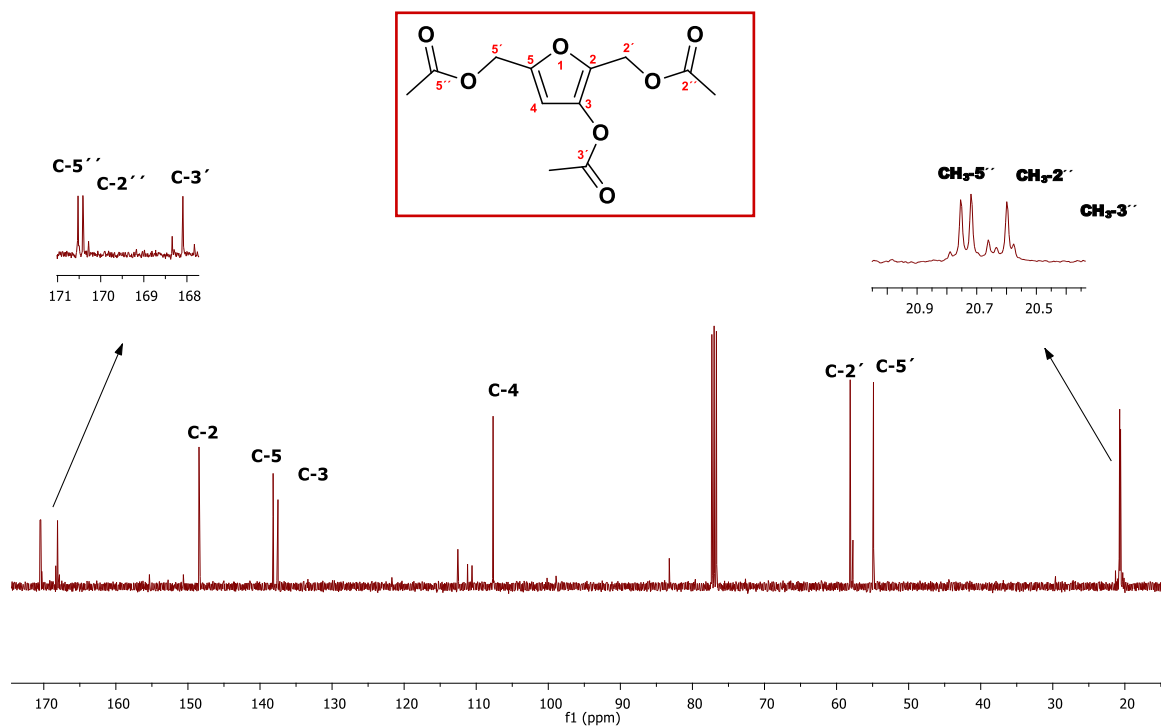


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (**4**).

Los experimentos gHSQC y gHMBC (Figura 47 y 48) fueron de gran ayuda para asignar la estructura propuesta. Se puede observar en el experimento gHMBC la correlación que tienen los protones del metileno C-5' con el carbono cuaternario C-5 y con el carbono vinílico C-4; a su vez, el protón vinílico H-4 presenta una correlación con el carbono vinílico C-2.

Una vez propuesta la estructura **4**, se analizó la muestra por MS ESI-TOF mediante infusión directa en modo positivo (Figura 49).

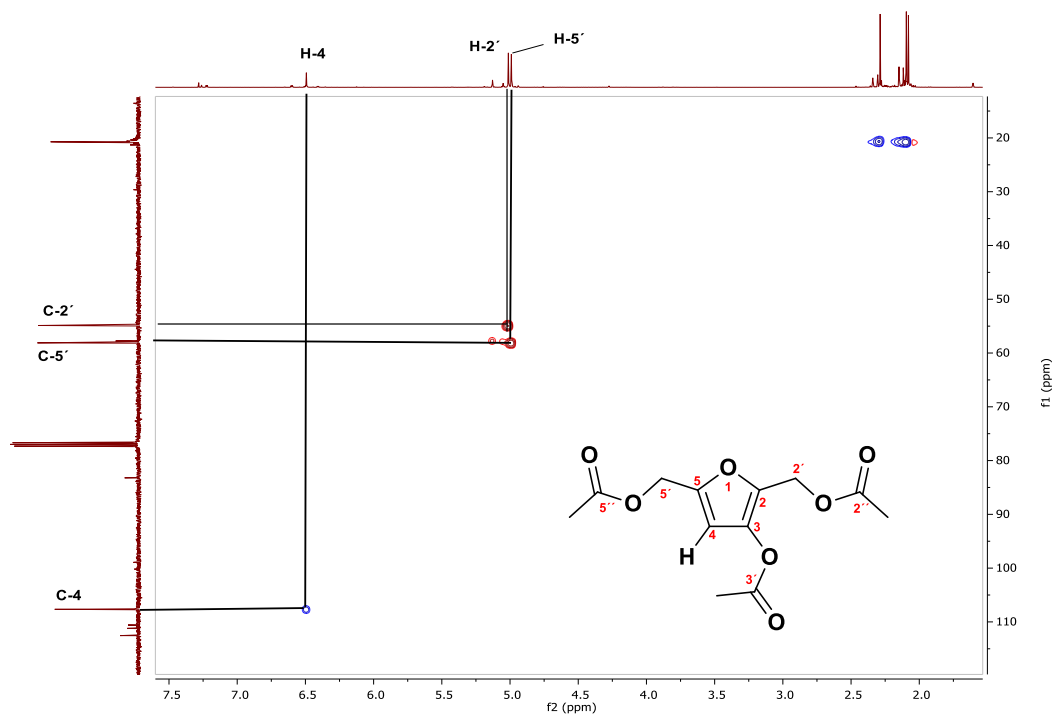


Figura 46. Experimento gHSQC para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4)

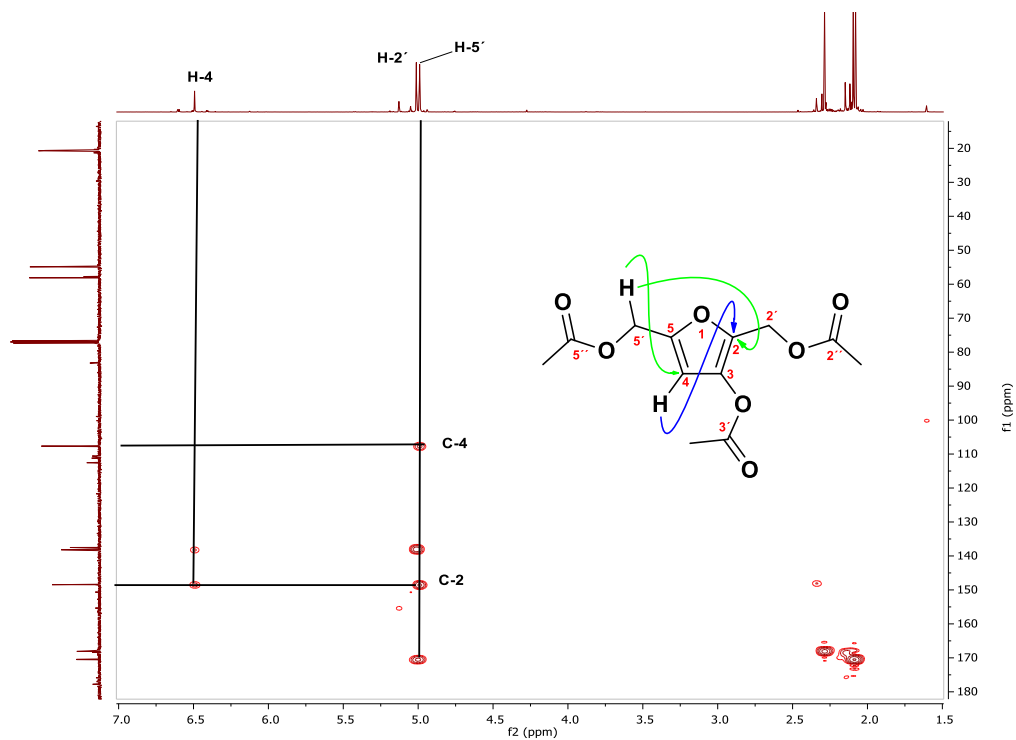


Figura 47. Experimento gHMBC para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (4).

En el espectro de masas ESI (+) se observa un ion molecular con aducto de sodio m/z de 293.0652 $[M + Na]^+$, que coincide con la masa calculada de m/z 270.07 para la fórmula $C_{12}H_{14}O_7$, con estos datos se obtuvo la masa nominal del compuesto **4**.

En el experimento de masas-masas, la fragmentación que se observa es coherente con la estructura propuesta mediante RMN. Para este compuesto se muestra un ion con una relación m/z de 233 que hace referencia a la pérdida de un metilo de uno de los ésteres. Un segundo ion con una relación m/z de 169 se debe a la pérdida de los grupos éster y una molécula de monóxido de carbono.

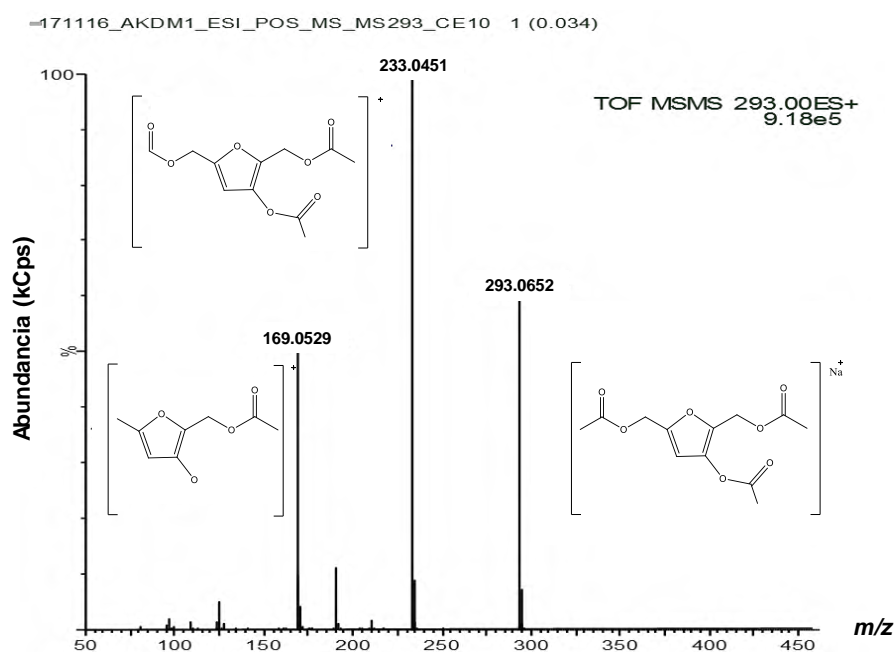


Figura 48. Espectro MS ESI-TOF para el compuesto diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (**4**).

Cabe destacar, que hasta el momento no se han encontrado en la literatura reportes del compuesto **4**. Es probable que dicho compuesto no provenga de la esterificación del 3-hidroxi-2,5-bis(hidroximetil)furano, y que este no se trate de un metabolito presente en la planta de *Coccocypselum hirsutum*. Las condiciones ácidas y de temperatura a la que se sometió el extracto pudieron haber favorecido la transformación hacia el compuesto **4**. Esta ampliamente estudiado que la descomposición térmica de los glúcidos genera al hidroximetilfurfural (HMF).⁷⁷ El HMF se ha identificado en una gran variedad de alimentos procesados ricos en

carbohidratos. A su vez, el 2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF) se puede obtener por la reducción del grupo formilo en el HMF. Resulta sumamente interesante para trabajos futuros de la yerba de guava, identificar al glúcido precursor de diacetato de 3-acetoxi-2,5-bis(hidroximetil)furano (**4**).

9.4.5. β -caroteno (**5**)

Al crudo del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces se le realizó una partición líquido-líquido con hexano, esta fracción se sometió a una purificación por CC utilizando sílice gel como fase estacionaria y como fase móvil un sistema de hexano/AcOEt (9:1). Se aisló en las primeras fracciones un compuesto poco polar que absorbe luz visible (amarillo-naranja), dichas características corresponden a un compuesto con un sistema altamente conjugado. Por tanto, el compuesto aislado se comparó por CCF con un estándar de β -caroteno comercial en un sistema hexano/AcOEt (9.5:0.5), ambos compuestos presentaron el mismo R_f (Figura 50).

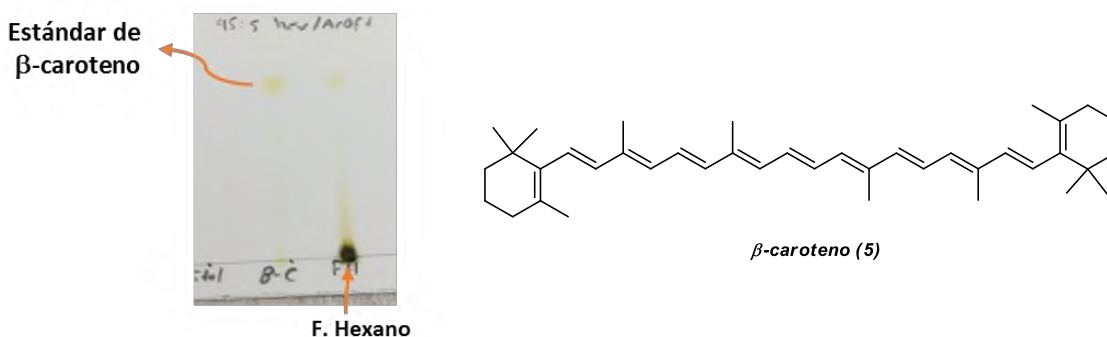


Figura 49. Izquierda, CCF del compuesto aislado en la fracción de hexano contra β -caroteno comercial (Hexano/AcOEt, 95:5); derecha, estructura del β -caroteno (**5**).

Para corroborar la estructura del β -caroteno (**5**), a la muestra aislada se le realizó un análisis por espectrofotometría de UV-Vis (Figura 51), en el espectro se observan tres bandas de absorción en 425, 450 y 477 nm, estas bandas de absorción son idénticas a las descritas para el compuesto **5**.⁷⁸

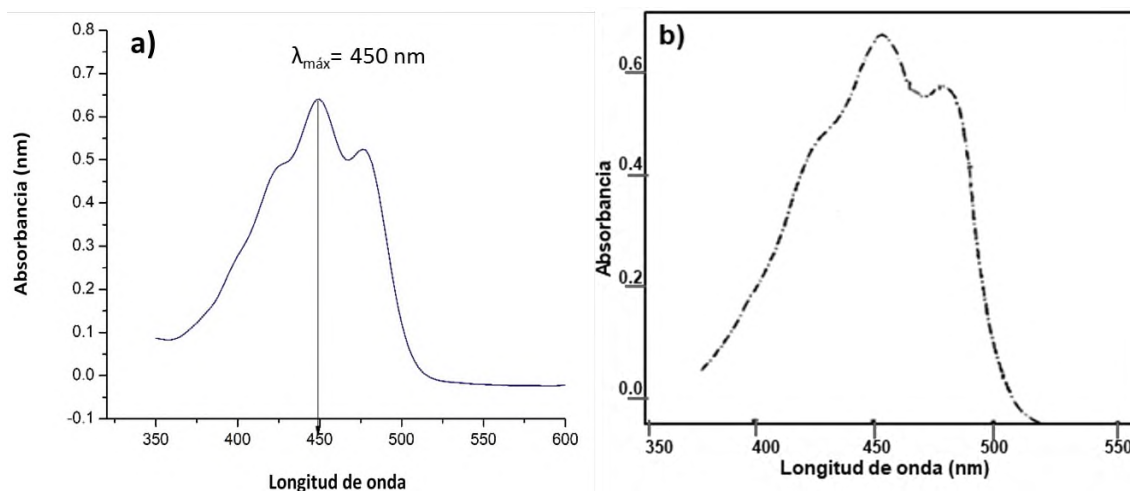


Figura 50. Espectro de absorción del UV-Vis del a) β -caroteno aislado de la fracción de hexano y b) espectro del β -caroteno reportado en la literatura.

El β -caroteno es un miembro de la familia de los carotenoides, estos son compuestos liposolubles con una gran pigmentación (roja, naranja o amarilla) presentes de forma natural en muchas frutas, cereales, aceites y verduras. En los últimos años numerosas publicaciones acreditan que los carotenoides presentan propiedades ante la prevención de diversas enfermedades como ciertos tipos de cáncer, trastornos oculares o vasculares, entre otros. Estudios *in vitro* indican que estos también pueden inhibir la oxidación de las grasas bajo ciertas condiciones.⁷⁹

De los carotenoides que se dan de forma natural, el β -caroteno (5) es el más abundante, en la actualidad su máximo interés radica en su papel como antioxidantes en la protección del organismo frente a los radicales libres,⁸⁰ además de ser un precursor de la vitamina A, esencial para el crecimiento. También facilita la comunicación entre células colindantes al estimular la síntesis de proteínas que forman poros en las membranas celulares y permiten así la comunicación mediante el intercambio de pequeñas moléculas. Algunos ensayos clínicos han hallado que la suplementación con β -caroteno mejora diversos parámetros de la función inmunitaria, por ejemplo, aumenta el número de glóbulos blancos y la actividad de las células asesinas naturales.⁸¹

9.4.6. β -sitosterol (6)

En la fracción de hexano y AcOEt se identificó un compuesto por CCF que presenta el mismo R_f que el estándar de β -sitosterol (hexano/AcOEt, 8:2) cuando se revela por calentamiento previo tratamiento con H_2SO_4 (Figura 52).

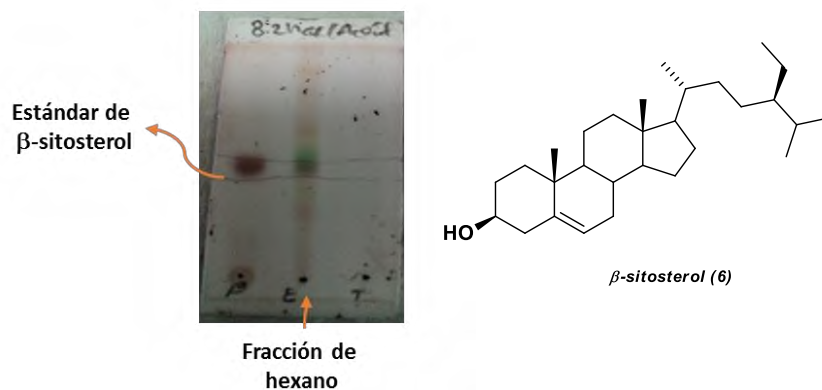


Figura 51. Izquierda, CCF de la fracción de hexano frente a estándar de β -sitosterol revelada por calentamiento previo tratamiento de H_2SO_4 (Hexano/AcOEt, 8:2); derecha, estructura del β -sitosterol (6).

Las dos fracciones se juntaron para enriquecer al probable β -sitosterol y se purificaron por CC utilizando sílice gel como fase estacionaria y como fase móvil un sistema de hexano/AcOEt (8:2). Se identificaron las fracciones puras y se llevaron a sequedad; se obtuvieron 15 mg de un sólido blanco que se llevó a RMN para corroborar la probable estructura del compuesto **6**.

En el espectro de RMN de 1H (Figura 53) se observaron a campo bajo dos señales características del β -sitosterol (6) en 5.35 ppm se observó la señal del protón vinílico H-6; mientras que en 3.53 ppm se encuentra una señal característica de un protón base de oxígeno y que presenta un ancho de señal que es particular para esteroides 3β -hidroxi ($W_{1/2} = 26$ Hz).

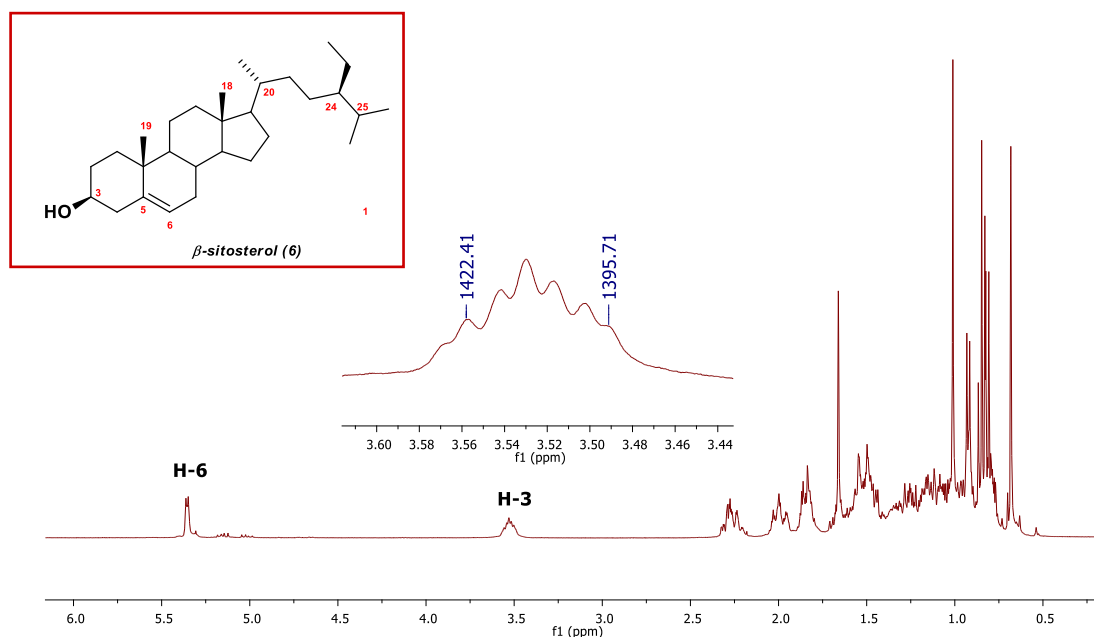


Figura 52. Espectro de ^1H del β -sitosterol (**6**) aislado de las fracciones de hexano y AcOEt.

En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron las 29 señales esperadas para β -sitosterol (**6**), destacando las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 en 140.7 y 121.7 ppm, respectivamente en 71.8 ppm se encuentra una señal de carbono base de oxígeno que corresponde a C-3 (Figura 53). Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C coinciden con lo reportado para el β -sitosterol (**6**).⁸²

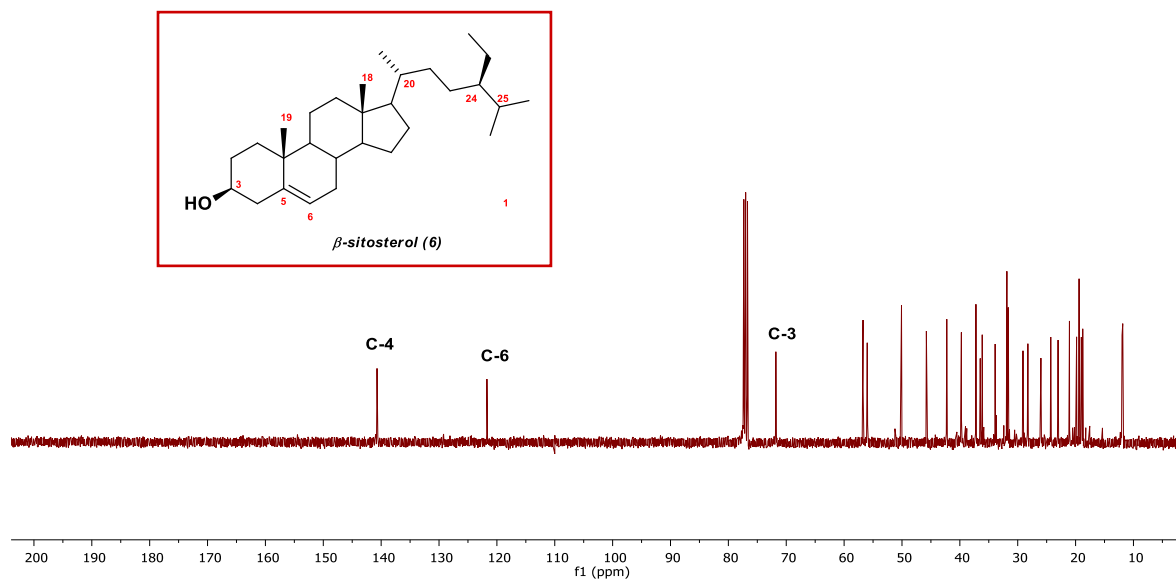


Figura 53. Espectro de ^{13}C del β -sitosterol (**6**) aislado de las fracciones de hexano y AcOEt.

El β -sitosterol es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitoesteroles, los cuales tienen propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antimicrobianas y anti infecciosas. Estos se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Está ampliamente distribuido en el mundo vegetal donde cumple la función de mantener la estructura y el funcionamiento de las membranas celulares.

Reportes en la literatura indican que el β -sitosterol tiene actividad antiinflamatoria, anticancerígena en la línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231). Además, posee efecto quimioprotector, angiogénico, así como actividad hipocolesterolémica, antihelmíntica y antimutágena. Esta descrito también que el β -sitosterol presenta actividad antioxidante entre otras.⁸³

10. CONCLUSIONES

De la extracción etanólica asistida por ultrasonido se logró el aislamiento y elucidación del iridoide asperulósido, además de una antocianina, cuyos datos de UV-Vis sugieren que presenta la aglicona de la delphinidina; las fracciones polares de la planta resultaron ser una fuente rica de glucosa, la cual fue elucidada a partir de su derivatización por la formación del pentaacetato de D-glucosa; en esta fracción polar también se elucidó un derivado furánico, que se forma probablemente por la descomposición térmica de azúcares, dicho compuesto no está reportado en la literatura; en las fracciones no polares del extracto, se identificó al terpenoide β -caroteno y al esteroide β -sitosterol.

Los metabolitos identificados poseen características químicas que pueden estar asociadas a la actividad antiinflamatoria, antiviral, cicatrizante, etc. que se le atribuyen a esta planta.

La presencia del iridoide asperulósido en los frutos y en el resto de la yerba de guava, es sin duda muy importante ya que representa una nueva fuente vegetal de este compuesto, convirtiéndola de esta forma, en una fuente de materia prima para futuras pruebas de actividad biológica.

La presencia de antocianinas en los frutos de la planta *Coccocypselum hirsutum* le da un valor agregado para el consumo humano. Además, las actividades biológicas atribuidas a ellas resultan muy interesantes, al mismo tiempo, la habilidad que tienen para formar complejos abre la posibilidad de desarrollar nuevos proyectos que involucren esta relación con los metales.

Los resultados obtenidos en el ensayo de DPPH^{*} muestra que las fracciones de AcOEt y *n*-BuOH presentaron la mayor actividad antioxidante frente a las fracciones de hexano y agua con valores de IC₅₀ de 0.230 y 0.190 mg/mL, respectivamente, Estos datos coinciden con los resultados del ensayo ABTS⁺⁺ cuyos valores fueron de 5.509 y 4.662 mg VEAC/g extracto seco, siendo estas fracciones, las que mostraron mayor inhibición de radicales libres, es importante señalar que no se han encontrado estudios sobre la actividad antioxidante de *Coccocypselum hirsutum*.

Las fracciones de AcOEt, *n*-BuOH y agua del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de la planta *Coccocypselum hirsutum* a través de un screening citotóxico demostraron tener efecto antiproliferativo sobre células de cáncer de mama MCF-7, al 5% de extracto, mostrando viabilidad celular del 28.83, 40.15 y 35.04% respectivamente. Este efecto puede ser atribuido a que en esta planta se han aislado componentes como el asperulósido, β -sitosterol y β -caroteno que poseen un marcado efecto tóxico sobre células de cáncer de mama, leucemia promielocítica, cáncer de colon, próstata, entre otros.

Esta misma línea celular presenta sensibilidad significativa frente al asperulósido aislado a las concentraciones de 1 y 0.5 mg/mL, con un porcentaje de células muertas de aproximadamente 78 y 57 % respectivamente. Los resultados de actividad antiproliferativa sobre células de cáncer de mama de los extractos y principio activo permiten considerar a la planta *Coccocypselum hirsutum*, para futuros estudios en un panel de líneas celulares para determinar el espectro de acción e identificar los principios activos.

Por último, la comparación del contenido fitoquímico con plantas recolectadas en diferentes meses del año mediante CCF mostró que no hubo variación en la composición química de los metabolitos encontrados en la primera recolección.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B., Kinghorn, A. D. Drug discovery from natural sources. *The APPS J.* **2006**, 8(2): 239-253.
2. a) Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93(9): 2325-2327. b) Klayman, D. L. Qinghaosu (artemisinin), an antimalarial drug from China. *Sci.*, **1985**, 228(4703): 1049-1055.
3. Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79(3): 629-661.
4. Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.*, **2011**, 162(6): 1239-49.
5. Hernández, M. A. Herbolaria oaxaqueña para la salud. 1ra. Ed., México, **2009**.
- 6 Muñoz, F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Editorial Mundi-Prensa libros, Madrid, **1996**.
7. Llorente, J., Ocegueda, S. Estado del conocimiento de la biota, en capital natural de México. *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, **2008**
8. Cordero, C. C. P., Aristizábal, G. F. A. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Rev. Colombiana Biotecnología.*, **2002**, 4(1): 100-106.
9. Lozoya, X. Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. Ethnobotany and search for new drugs. *Ciba Foundation Symposium*, **1999**, 185: 130-152.
10. Vega, A. E., Espejo, S. A., Alarcón, A. F., Velasco, L. R. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proc. West. Pharm. Soc.*, **2009**, 52: 78-82.
11. Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., Rocha, S. M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mexicana Fitopatología*, **2003**, 21(3): 355-363.
12. Dewick, P. M. Medicinal natural products, a biosynthetic approach. 2da. Ed, John Wiley & Sons. West Sussex, England, **1997**.
13. Ávalos, G. A., Pérez, U.C.E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, **2009**, 2(3): 119-145.
14. López, C. N., Miguel, M., Aleixandre, A. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. Clín. Diet. Hosp.*, **2012**, 32(3): 81-91.
15. Guija, P. E., Inocente, C. M. A., Ponce, P. J., Zarzosa, N. E. Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz. Med.*, **2015**, 15 (1): 57-60.
16. Delgado, O. L., Betanzos, C. G., Sumaya, M.T. Importancia de los antioxidants dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Redalyc*, **2010**, 50: 10-15.
17. Mabberley, D. J. The plant book. Cambridge University Press., Cambridge, **2006**, 858.

18. Castillo, P. M. Estudio dendrológico de la familia Rubiaceae en la zona de Tingo María-Perú. Tingo María, **2013**.
19. Martins, D., Nunez, C. V. Secondary Metabolites from *Rubiaceae* species. *Molecules*, **2015**, 20(7): 13422-13495.
20. Furukawa, M., Kamo, S., Makino, M., Kurita, M., Tabata, K., Matsuzaki, K., Suzuki, T., Uchiyama, T. Triterpenoid glycosides from *Ladenbergia hexandra* Klotzsch. *Phytochemistry*, **2017**, 136: 147-155.
21. Seo, K. H., Lee, D. Y., Lee, Y. G., Baek, N. Dineolignans of 3-O-4' diphenyl ether-type from fruits of *Magnolia obovata*. *Phytochemistry*, **2017**, 136: 133-140.
22. Kang, J., Zhang, P., Gao, Z., Zhang, J., Yan, Z., Wang, H., Chen, R. Naphthohydroquinones, naphthoquinones, anthraquinones, and a naphthohydroquinone dimer isolated from the aerial parts of *Morinda parvifolia* and their cytotoxic effects through up-regulation of p53. *Phytochemistry*, **2016**, 130: 144-151.
23. Mai, L. H., Grellier, P., Prost, E., Lemoine, P., Poullain, C., Dumontet, V., Deguin, B., Vo, T. B., Michel, S., Grougnet, R. Triterpenes from the exudate of *Gardenia urvillei*. *Phytochemistry*, **2016**, 122: 193-202.
24. Berger, A., Kostyan, M. K., Klose, S. I., Gastegger, M., Lorbeer, E., Brecker, L., Schinnerl J. Loganin and secologanin derived tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea crocea* and *Palicourea padifolia* (*Rubiaceae*). *Phytochemistry*, **2015**, 116: 162-169.
25. Martin, N. J., Ferreira, S. F., Barbault, F., Nicolas, M., Lecellier, G., Paetz, C., Gaysinski, M., Alonso, E., Thomas, O. P., Botana, L. M. Raharivelomanana, P. Indole alkaloids from the Marquesan plant *Rauvolfia nukuhivensis* and their effects on ion channels. *Phytochemistry*, **2015**, 109: 84-95.
26. Rungsimakan, S., Rowan, M. G. Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry*, **2014**, 108: 177-188.
27. Cao, X. F., Wang, J. S., Wang, X. B., Luo, J., Wang, H. Y., Kong, L. Y. Monoterpene indole alkaloids from the stem bark of *Mitragyna diversifolia* and their acetylcholine esterase inhibitory effects. *Phytochemistry*, **2013**, 96: 389-396.
28. Qu, Y., Simonescu, R., De Luca, V. Monoterpene Indole Alkaloids from the Fruit of *Tabernaemontana littoralis* and Differential Alkaloid Composition in Various Fruit Components. *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79 (12): 3143–3147.
29. Figueiredo, O. P., Matos, C. M. F., Perdomo, T. R., Kato, H. W., Vinícius, Jr. M., Garcez, B. O., Garcez, S. W. *Rubiaceae*-type cyclopeptides from *Galianthe thalictroides*. *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79 (4): 1165–1169.
30. Paulino, C. G., Van der Heijden, R., Bino, R., de Vos, R., Dagnino, D. Iridoids from *Pentas lanceolata* Jan Schripsema. *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70 (9): 1495–1498.
31. Instituto de Biología. "*Coccocypselum hirsutum*" UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-08-12.

-
32. Cabral, L. E., Salas, M. R. *Coccocypselum pulchellum* (Rubiaceae), nuevo registro para Argentina. *Darwiniana*, **2007**, 45(2): 181-187.
33. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana: medicinatradicionalmexicana.unam.mx
34. Pino B. N., Valois, H. Ethnobotany of four black communities of the municipality of Quibdo, Choco-Colombia. *Lyonia*, **2004**, 7(2): 61-69.
35. Quattrocchi, U., World dictionary of medicinal and poisonous plants, common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology. CRC press Taylor & Francis group. **2012**.
36. <http://bios.conabio.gob.mx>
37. Pino B, N. Botánica y screening fitoquímico de doce plantas usadas en medicina tradicional en el departamento del Chocó, Colombia. *Rev. Latinoamericana Rec. Nat.*, **2006**, 2(1): 33-44.
38. <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/rubiaceae/coccocypselum-lanceolatum-baga-de-capitao>
39. Carbonó, D. E., Dib, D. J. C. Plantas medicinales usadas por los cogui en el río palomino, sierra nevada de santa Marta (Colombia). *Caldasia*, **2013**, 35(2): 333-350.
40. Taborda, M. M. E., Estudio fitoquímico preliminar y actividad antimalárica del extracto etanólico total de *Coccocypselum hirsutum* (Rubiaceae). *DUAZARY*, **2009**, 6(2): 118-123.
- 41 Bravo, K., Alzate, F., Osorio, E. Fruits of selected wild and cultivated andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Industrial Crops and Products*, **2016**, 85: 341-352.
42. Mongrand, S., Badoc, A., Patouille, B., Lacomblez, A., Chavent, M., Benssoule, J. J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, **2005**, 66: 549-559.
- 43 Ming, L. J., Lin, H. P., Yao, Q., Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*, **2010**, 14(4): 849-860.
44. Londoño, L. J., Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Ed. Corporación Universitaria Lasallista, **2012**, cap. 9, parte III.
45. Brand, W. W., Cuvelier, M. E., Berset, C., Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, **1995**, 28: 25-30.
46. Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., Kunz, W. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*, **2016**, 19: 754-765.
47. Villanueva, T. J., Condezo, H. L., Asquiere, R. E. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2010**, 30: 151-160.
48. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala A., Yang, M., Rice, E. C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay free radic. *Biol Med*, **1999**, 26(9-10): 1231-7.

49. Oliveira, S., Alves, S. G., Rodriguez, E. C., Alves, S. T., Silva, S. E., Aparecida, F. O., Pena, F. J., Romoff, P., Baader, J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quim. Nova.*, **2014**, 37(3): 497-503.
50. Escobar, M. L., Rivera, A., Aristizábal, G. F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *VITAE*, **2010**, 17: 67-74.
51. Arencibia, A. D., Rosario, F. L., Curveco, S. D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel*, **2009**, 40-52.
52. Sharapin, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, 1ra ed, CYTED, Colombia, **2000**.
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. 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.
56. Azuola, R., Vargas, P. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EAU). *TM*, **2007**, 20(4): 30-40.
57. Rodríguez, R. Z., Robaina, M. M., Jáuregui, H. U., Blanco, G. A., Rodríguez, C. J. Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *CENIC*, **2014**, 45(1): 139-147.
58. Brand, W. W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, **1995**, 28(1): 25-30.
59. Guerra Ramírez D, Hernández López A, Guerra Ramírez P, Reyes, Trejo B, Ibarra Vega P, Estudio de la actividad biológica de *Heliocarpus appendiculatus* turcz en *Artemisa franciscana*, *congreso internacional de productos naturales de Chapingo, México*. **2009**.
60. Re, R., Pellegrini, N., Preteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, E. C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 26 9(10): 121-37.
61. Demirezer, L.O., Gurbuz, F., Guvenalp, Z., Stroch, K., Zeeck, A. Iridoids, Flavonoids and Monoterpene Glycosides from *Galium verum* subsp. *Verum*. *Turk. J. Chem.*, **2006**, 30: 5525-534.
62. Deans, B. J., Bissember, A. C., Smith J. A. Practical Isolation of Asperuloside from *Coprosma quadrifida* via Rapid Pressurised Hot Water Extraction. *Aust. J. Chem.*, **2016**, 69(11): 1219-1222.
63. Ríos, M. Y. Química y farmacología de iridoides. **2015**, cap. 4, 95-113.
64. Fujikawa, T., Hirata, T., Hosoo, S., Nakajima, K., Wada, A., Yurugi, Y., Soya, H., Matsui, T., Yamaguchi, A., Ogata, M., Nishibe, S. Asperuloside stimulates metabolic function in rats across

several organs under high-fat diet conditions, acting like the major ingredient of *Eucommia* leaves with anti-obesity activity. *J. Nutr. Sci.*, **2012**, 10: 1-10.

65. Vu, H. G., Ninh, K. B., Nguyen, X. N., Phan, V. K., Minh, C. V., Hoang, L. T. A., Pham, H. Y., Buit, H. T., Nguyen, X. C., Nguyen H. N., Kim, S. H., Kwon, Y. I., Kim, Y. H. Soluble epoxide hydrolase Inhibitory and anti-inflammatory components from the Leaves of *Eucommia ulmoides* liver (Duzhong) Bull. *Korean Chem. Soc.*, **2013**, 34: 1555.

66. Bai, M., Shi, W., Tian, J. Lei, M., Kim, J. H., Sun, Y. N., Kim. Y. H., Gao, J. Soluble epoxide Hydrolase Inhibitory and anti-inflammatory components from the Leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver (Duzhong). *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63: 2198.

67. Eng, k. h., Azlan, A., Teng, T. S., Meng. L. S. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food Nutr. Res.*, **2017**, 61: 1-21.

68. Fedenko, S. V., Shemet, A. S., Landi, M. UV-vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: an overview of *in vitro* and *in vivo* techniques. *J. Plant Physiol.*, **2017**, 212: 13-28.

69. Yoshida, K., Mori, M., Kondo, T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, 26(7): 884–915.

70. Filip, M., Vlassa, M., Copaciu, F., Coman, V. Identification of anthocyanins and anthocyanidins from Berry fruits by chromatographic and spectroscopic techniques to establish the juice authenticity from market. *J. Planar Chromatogr.*, **2012**, 25(6): 534-541.

71. Smyk, B., Pliszka, B., Drabent, R. Interaction between Cyanidin 3-glucoside and Cu (II) ions. *Food Chem.*, **2008**, 107: 1616-1622.

72. Cretu, C. G., Morlock, E. G. Analysis of anthocyanins in powdered Berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chem.*, **2014**, 146: 104-112.

73. Ortiz, A. M., Vargas, R. M., Chew, M. R., Meza, V. J. Propiedades funcionales de las antocianinas, *Biotecnía*, **2011**, 13(2): 16-22.

74. Garzón, A. G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colomb.*, **2008**, 13(3): 27-36.

75. Feduchi, C. E. Bioquímica conceptos esenciales, *Madrid: médica panamericana*, D. L, 1ª Ed **2010**.

76. McMurry, E. J. Química orgánica, Thomson/Brooks/cole ©, 7ª Ed., capítulo 25, **2018**.

77. Van Putten, R-J, Van Der Waal, J. C., De Jong, E., Rasrendra, C. B., Heeres, H. J., De Vries, J. G. Hydroxymethylfurfural, a versatile platform chemical made from renewable resources. *Chem. Rev.*, **2013**, 113: 1499.

78. Zeraik, M. L., Yariwake H. J. Extração de β -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. *Quim. Nova*, **2008**, 31(5): 1259-1262.

79. Rao, A. V., Rao L. G. Carotenoids and human health. *Pharm. Res*, **2007**, 55: 207-216.

80. Paiva, S. A., Russell, R. M. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.*, **1999**, 18(5): 426-33.
81. Hermus, R. J. J., Kok, F. J. Beta-carotene and cáncer risk: a trial in smokers using biomarkers as intermediate endpoints, *Europa J. Cancer*, **1993**, 29(9): 1335-1344.
82. Habib, M., Nikkon, F., Rahman, M., Haque, Z., Karim, M. Isolation of stigmasterol and b-sitosterol from methanolic extract of root. *Pak. J. Biol. Sci*, **2007**, 10: 4174-4176.
83. Soodabeh, S., Azadeh, M., Ahmad R. G., Mohammad, A. The story of beta-sitosterol- a review. *European J. Med. Plant.*, **2014**, 4(5): 590-609.