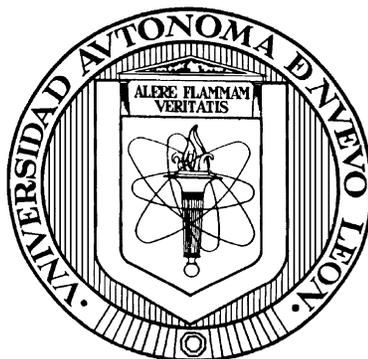


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
E INMUNOMODULADORA DE
Juglans mollis y *Turnera diffusa***

Por

Q.F.B. JONATHAN PÉREZ MESEGUER

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Química Biomédica**

Febrero, 2008

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
ANTIOXIDANTES E INMUNOMODULADORES DE
Juglans mollis Y *Turnera diffusa***

Aprobación de la Tesis:

DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Directora de Tesis

DR. RICARDO SALAZAR ARANDA
Co-Director de Tesis

DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO
Comisión de Tesis

DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Comisión de Tesis

DRA. PAULA CORDERO PÉREZ
Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
ANTIOXIDANTES E INMUNOMODULADORES DE
Juglans mollis Y *Turnera diffusa***

Presentado por:

Q.F.B. Jonathan Pérez Meseguer

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica y en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la co-dirección del Dr. Ricardo Salazar Aranda.

DIRECTORA

Dra. Noemí Waksman de Torres

Co-DIRECTOR

Dr. Ricardo Salazar Aranda

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi cariño

A mi madre

Zita Beatriz Elizabeth Meseguer Rossi

A mi ángel

Paulina Rossi Flores de Meseguer

A mi hermano

Lic. Miguel Pérez Meseguer

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por ser la fuerza que mueve mi vida y que permite que todas las cosas sucedan a su debido tiempo.

A mi madre **Beatriz Meseguer Rossi**

Por ser el pilar principal de mi vida y darme todo el apoyo que necesité para llegar hasta el lugar en el que me encuentro. Gracias por enseñarme que se pueden alcanzar las estrellas. Esta vida no me alcanzará para agradecerte por todo lo que me has dado. Con todo mi amor y cariño.

A mi ángel **Paulina Rossi Flores de Meseguer**

Por ser la parte amorosa de una madre y por haberme enseñado que la fe es lo último para perder. Cada día estás en mis pensamientos y siempre te llevaré en mi corazón.

A mi hermano **Miguel Pérez Meseguer**

Por ser tantas veces el ejemplo que necesité seguir. Con toda mi admiración para ti, que eres mi sangre y mi brazo en firme. Gracias por estar conmigo mientras alcanzaba esta meta y cumplía estos sueños.

A la **Dra. Noemí Waksman de Torres**

Por ser guía en esta etapa de mi vida. Por todas sus enseñanzas y todo el tiempo invertido en este proyecto. Gracias por ayudarme a cumplir esta meta y haberme dado la oportunidad de ingresar en su grupo de trabajo.

A mis profesores de postgrado, especialmente a la **Dra. Verónica Rivas Galindo, Dra. Rosalía Ramírez Durón, Dra. Ma. Luz Salazar Cavazos, Dr. Adolfo Caballero Quintero, Dr. Ricardo Salazar Aranda, Dr. Mario César Salinas Carmona y Dr. Lucio Vera Cabrera y Dr. Oliverio Welsh Lozano**. Ustedes han sido el corazón de mi formación como doctor, a cada uno les debo gratitud por transmitirme sus conocimientos y sus experiencias.

A mis compañeros de postgrado **David, Alicia, Erika, Graciela, Brenda, Jorge, Gerardo, Víctor, Cecilia, Margarita, Ricardo, Anabel, Marcela, Yael, Magda, Elda, Liliana, Adolfo, Aurora y Blanca**. Por haberme integrado a sus vidas y haberse convertido en mi nueva familia. Con todo mi cariño y agradecimiento para cada uno de ustedes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por el apoyo al proyecto **CONACYT 40236**, por el Apoyo Integral para la Formación de Doctores en Ciencias y por la beca de manutención con registro **181798** otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

RESUMEN

QFB Jonathan Pérez Meseguer

Fecha de graduación: Febrero 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título de estudio **AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES E
INMUNOMODULADORES DE *Juglans mollis* y *Turnera diffusa***

Número de páginas: 130

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método del Estudio:

Desde hace algunos años la investigación de plantas medicinales ya no es vista como un folklore, sino, como una relevante actividad científica, ya que resulta ser una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, con la obtención de nuevas moléculas bioactivas que se manifiesten en diferentes mecanismos de acción. Para el estudio de la actividad antioxidante existen una gran diversidad de métodos, siendo uno de los más utilizados: la captura de radicales libres con DPPH (1,1 difenil-2,-picrilhidrazilo). Estudios recientes aplicados a seis plantas de la región, mostraron una actividad antioxidante importante en extractos hidroalcohólicos de *Juglans mollis* (nogalillo) y *Turnera diffusa* (damiana), por lo que en el presente trabajo se utilizan estas dos especies para determinar cuál de sus fracciones posee mayor actividad antioxidante y aislar sus compuestos activos.

Contribuciones y Conclusiones:

Se aislaron tres flavonoides glicosilados a partir de las especies *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*, mediante fraccionamiento biodirigido monitoreado con la técnica de CCF revelada con DPPH. Los tres compuestos presentaron una buena actividad antioxidante comparada con los controles utilizados. De la especie *Juglans mollis* se obtuvieron fracciones poco polares con actividad inmunomoduladora, la cual fue evaluada en base a la proliferación de células mononucleares.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dra. Noemí Waksman de Torres

ÍNDICE

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antioxidantes	1
1.2 Evaluación de la actividad antioxidante	3
1.3 Flavonoides y otros compuestos fenólicos	5
1.4 Medicina herbolaria	7
1.4.1 Medicina tradicional Mexicana	9
1.4.1.1 Damiana (<i>Turnera Diffusa</i>)	11
1.4.1.2 Nogalillo (<i>Juglans mollis</i>)	13
1.5 Justificación	15
1.6 Objetivo general	15
1.7 Objetivos específicos	16
2 MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.1 Material, Equipos y Reactivos	17
2.1.1 Material	17
2.1.2 Equipo	18
2.1.3 Reactivos generales	19
2.1.4 Reactivos especiales	20
2.1.5 Material biológico	20

2.1.6 Cromatografía en capa fina	20
2.1.6.1 Sistemas de elución	21
2.1.6.1.1 Polares	21
2.1.6.1.2 No polares “A”	21
2.1.6.1.3 No polares “B”	21
2.1.6.2 Reveladores	21
2.1.6.2.1 Actividad antioxidante A	21
2.1.6.2.2 Fenoles	21
2.1.6.2.3 Productos naturales	21
2.1.7 Condiciones de elución para HPLC-DAD	22
2.1.7.1 Sistema A	22
2.2 Colecta de plantas	22
2.3 Obtención de extractos primarios	23
2.4 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante con DPPH por cromatografía en capa fina (CCF)	23
2.5 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante con DPPH por espectrofotometría de UV-Vis.	24
2.6 Determinación de citotoxicidad de los extractos primarios	25
2.7 Determinación del efecto inmunomodulador de los extractos primarios	26
2.8 Obtención de extractos diferenciales	27
2.9 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales	28
2.10 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales.	28

2.11 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de <i>Juglans mollis</i>	29
2.12 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de <i>Turnera diffusa</i>	31
2.13 Análisis por HPLC de los compuestos aislados	32
2.14 Análisis por RMN de los compuestos aislados	32
2.15 Cuantificación de la actividad antioxidante de los compuestos aislados mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis y DPPH	33
2.16 Determinación de la actividad inmunomoduladora de los compuestos aislados, en base a la proliferación de células mononucleares de bazo de ratón	34
2.17 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos aislados	35
3 RESULTADOS	37
3.1 Colecta y autenticación de las plantas	37
3.2 Obtención de extractos primarios	38
3.3 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante con DPPH por cromatografía en capa fina	38
3.4 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante con DPPH por espectrofotometría de UV-Vis	39
3.5 Determinación de citotoxicidad de los extractos primarios	40
3.6 Determinación del efecto inmunomodulador de los extractos primarios	40
3.7 Obtención de extractos diferenciales	41
3.8 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales	43
3.9 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales	44

3.10 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de <i>Juglans mollis</i>	45
3.11 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de <i>Turnera diffusa</i>	49
3.12 Análisis por HPLC de los compuestos aislados	53
3.13 Análisis por RMN de los compuestos aislados	55
3.14 Cuantificación de la actividad antioxidante de los compuestos aislados mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis y DPPH	67
3.15 Determinación de la actividad inmunomoduladora de los compuestos aislados, en base a la proliferación de células mononucleares de bazo de ratón Balb/c	69
3.16 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos aislados	70
4 DISCUSIÓN	71
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	94
5.1 Conclusiones	94
5.2 Perspectivas	96
APÉNDICE A	97
REFERENCIAS	100

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Diseño del ensayo de citotoxicidad y de inmunomodulación para extractos primarios.	27
2	Diseño del ensayo de citotoxicidad e inmunomodulación para fracciones y compuestos aislados de <i>Juglans mollis</i> .	35
3	Recolección y autenticación de plantas.	37
4	Porcentajes de recuperación de extractos metanólicos de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	38
5	Porcentajes de reducción de DPPH de los extractos metanólicos de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	39
6	Porcentajes de viabilidad celular frente a los extractos metanólicos de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	40
7	Promedios de cuentas por minuto e índices de proliferación de extractos metanólicos de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	41
8	Nomenclatura de los extractos diferenciales de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	42
9	Porcentajes de recuperación de los extractos diferenciales de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	42
10	Porcentaje de reducción de DPPH de los extractos de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	44
11	Correlaciones NOE de D1	66
12	Promedios de porcentajes de reducción de DPPH para los compuestos puros, fracción D2 y controles.	67
13	CI ₅₀ de los compuestos aislados, la fracción D2 y controles.	68

14	Promedios de cuentas por minuto e índices de proliferación.	69
15	Porcentajes de viabilidad celular.	70
16	Desplazamientos químicos de los hidrógenos de N1 y sus constantes de acoplamiento.	80
17	Desplazamientos químicos de los hidrógenos de N2 y sus constantes de acoplamiento.	84
18	Desplazamientos químicos de los hidrógenos de D1 y sus constantes de acoplamiento.	87
19	Lecturas de absorbancia a 517nm y porcentajes de reducción por triplicado de miricetrina.	97
20	Lecturas de absorbancia a 517nm y porcentajes de reducción por triplicado de quercitrina.	97
21	Lecturas de absorbancia a 517nm y porcentajes de reducción por triplicado de 8-C [6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-xylohexopiranos-3-ulosido] luteolina.	98
22	Lecturas de absorbancia a 517nm y porcentajes de reducción por triplicado de la fracción D2.	98
23	Lecturas de absorbancia a 517nm y porcentajes de reducción por triplicado de quercetina.	98
24	Lecturas de absorbancia a 517nm y porcentajes de reducción por triplicado de rutina.	99
25	Lecturas de absorbancia a 517nm y porcentajes de reducción por triplicado de hidroxitolueno butilado.	99

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras de un flavonoide y una isoflavona.	6
2	<i>Turnera diffusa</i> .	11
3	<i>Juglans mollis</i> .	13
4	Análisis cualitativo de actividad antioxidante de extractos metanólicos de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	39
5	Análisis cualitativo de actividad antioxidante de extractos de las distintas partes de <i>Turnera diffusa</i> y <i>Juglans mollis</i> .	43
6	Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo de corteza de <i>Juglans mollis</i> mediante una columna de sílica gel en modalidad flash.	45
7	Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo de corteza de <i>Juglans mollis</i> mediante una columna de sílica gel en modalidad flash.	46
8	Cromatografía en capa fina de la fracción F3', obtenida mediante columna Lobar RP-18, a partir de la fracción F3 proveniente del extracto de corteza de <i>Juglans mollis</i> .	47
9	Actividad antioxidante de la fracción F3' obtenida mediante columna Lobar RP-18, a partir de la fracción F3 proveniente del extracto de corteza de <i>Juglans mollis</i> .	48
10	Cromatografía en capa fina de los compuestos aislados N1 y N2.	48
11	Cromatografía en capa fina de la extracción en fase sólida del extracto aéreo de <i>Turnera diffusa</i> .	49
12	Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de la parte aérea de <i>Turnera diffusa</i>	50

	(F50) mediante una columna de sílica gel.	
13	Fracciones F3' y F3'' obtenidas a partir de F3 mediante una columna Lobar RP-18.	51
14	Cromatografía en capa fina de los compuestos D1 y fracción D2.	52
15	Cromatografía en capa fina de la fracción D2.	52
16	Cromatograma del extracto de AcOEt de <i>J. mollis</i> .	53
17	Cromatograma del compuesto N1 de <i>J. mollis</i> y espectro de absorción UV-Vis.	54
18	Cromatograma del compuesto N2 de <i>J. mollis</i> y espectro de absorción UV-Vis.	54
19	Espectro ¹ HRMN del compuesto N1 en MeOD.	55
20	Espectro ¹³ CRMN del compuesto N1 en MeOD.	56
21	Espectro DEPT-90 del compuesto N1 en MeOD.	56
22	Espectro COSY del compuesto N1 en MeOD.	57
23	Espectro HMQC del compuesto N1 en MeOD.	57
24	Espectro HMBC del compuesto N1 en DMSO	58
25	Espectro ¹ HRMN del compuesto N1 en DMSO.	58
26	Espectro ¹ HRMN del compuesto N2 en MeOD.	59
27	Espectro ¹³ CRMN del compuesto N2 en MeOD.	60
28	Espectro DEPT-135 del compuesto N2 en MeOD.	60
29	Espectro COSY del compuesto N2 en MeOD.	61
30	Espectro HMQC del compuesto N2 en MeOD.	61
31	Espectro HMBC del compuesto N2 en MeOD.	62

32	Espectro ¹ HRMN del compuesto D1 en MeOD.	63
33	Espectro ¹³ CRMN del compuesto D1 en MeOD.	63
34	Espectro DEPT-135 de D1 en MeOD.	64
35	Espectro COSY de D1 en MeOD.	64
36	Espectro HMQC de D1 en MeOD.	65
37	Espectro HMBC de D1 en MeOD.	65
38	Espectro ¹ HRMN del compuesto D1 en DMSO.	66
39	Porcentaje de reducción de DPPH para los compuestos puros, fracción D2 y controles.	68
40	Estructura general de los flavonoides.	79
41	Estructura de la miricetina.	81
42	Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los hidrógenos de ramnosa.	82
43	3- <i>O</i> -L-ramnosil-miricetina. <i>Miricetrina</i> .	83
44	3- <i>O</i> -L-ramnosil-quecetina. <i>Quercitrina</i> .	86
45	Acoplamiento NOE de D1	89
46	8- <i>C</i> [6-deoxi-2- <i>O</i> -(α-L-ramnopiranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulosido] luteolina	90

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados centígrados
¹³CRMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
¹HRMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
AcOEt	Acetato de etilo
BHT	Hidroxitolueno butilado
ButOH	Butanol
C18	Octadecilsilano
CCF	Cromatografía en capa fina
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
cm	centímetro
COSY	Homonuclear correlated spectroscopy
DAD	Detector de arreglo de diodos
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo
EtOH	Etanol
g	gramos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	Cromatografía de líquido de alta resolución
Hz	Hertz

MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
NL	Nuevo León
nm	Nanómetro
NOE	Nuclear overhauser efect
NPR	Natural products reagent
OMS	Organización mundial de la salud
PEG	Polietilenglicol
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP-18	Fase inversa de octadecilsilano
t_R	Tiempo de retención
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VLC	Cromatografía de líquidos a vacío
µg	Microgramo
µg/mL	Microgramo por mililitro

μM	Micromolar
λ	Longitud de onda
%	Por ciento

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos que poseen la capacidad de evitar el daño oxidativo de un sustrato potencialmente oxidable, cuando se encuentran en el medio en cantidades relativamente bajas. El mecanismo para evitar o disminuir el proceso oxidativo depende de la naturaleza del antioxidante. Se conocen antioxidantes de tipo terpenoide como los carotenoides (luteína, vitamina A, licopeno), de tipo proteico, ácido grasos (omega-3) y compuestos polifenólicos como los flavonoides (Torres F y cols., 2006). Una gran cantidad de estos compuestos se presenta en el reino vegetal en forma de compuestos polifenólicos (Cos y cols., 2000), y de estos se han reportado una enorme cantidad de estudios, de muy variadas fuentes naturales (Pietta, 2000; Luk y cols., 2007; Seeram, 2008; Zhang y cols., 2008; Shukitt-Hale, 2008).

La importancia que han logrado cobrar los antioxidantes como “sustancias para prevenir el envejecimiento” nació a partir de la observación de una relación directa entre personas que llevaban una dieta rica en frutas y vegetales y la disminución de padecimientos tales como enfermedades cardiovasculares, reumatoides y distintos tipos

de cáncer. En particular se han encontrado sustancias que tienen la capacidad de reducir los agentes oxidantes que producen el estrés oxidativo, el cual a su vez, deriva en la muerte celular (Cos y cols., 2000).

Los antioxidantes han sido utilizados ampliamente como aditivos de alimentos para contrarrestar la degradación oxidativa de éstos, por lo que juegan un papel muy importante en la industria alimenticia. En la actualidad se sabe que las especias que han sido utilizadas desde la antigüedad para incrementar el sabor a los alimentos, como la canela, el clavo, orégano y pimienta, poseen propiedades antioxidantes.

Durante los últimos años se han obtenido algunos antioxidantes mediante síntesis orgánica, como el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT) y la *tert*-butilhidroquinona (TBHQ). Estos son usados ampliamente en la industria alimenticia, sin embargo, hay reportes de que BHA y BHT pueden producir daño hepático y carcinogénesis; por ello en las últimas décadas se ha incrementado la búsqueda para el descubrimiento y el uso de antioxidantes más efectivos de origen natural (Elmastas y cols., 2004).

El sistema de defensa antioxidante humano consiste en un sistema enzimático y otro no enzimático. El sistema enzimático incluye enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHPx), catalasa, entre otras. El sistema no enzimático es clasificado en dos grupos: de origen endógeno y de origen exógeno.

El glutatión reducido (GSH), ácido úrico y albúmina son algunos de los antioxidantes endógenos, mientras que la vitamina C, E y beta caroteno, y compuestos polifenólicos como los flavonoides, son del tipo exógeno (Elmastas y cols., 2004; Pietta y cols., 2000).

A la vez, estos últimos se han dividido en dos clases:

1. Los preventivos, que reducen la velocidad de iniciación de la reacción en cadena por radicales libres (disminuyen la acción oxidativa de los radicales libres).
2. Los interruptores de la reacción en cadena, que interfieren con su propagación.

La presencia de compuestos antioxidantes en los vegetales ha cobrado mayor importancia entre especialistas de la salud quienes han recurrido a la fitoterapia con el fin de conseguir antioxidantes más potentes que los ya conocidos.

1.2 Evaluación de la actividad antioxidante

Alrededor del mundo se realizan estudios de un gran número de plantas y alimentos de tipo vegetal para conocer sus propiedades antioxidantes. Según la base de datos Medline, los manuscritos que mencionan la palabra “antioxidante” incrementaron en 340 % en los pasados diez años, mientras que el número de manuscritos en el área de

plantas, animales y humana ha incrementado solo un 39 %. Hasta ahora, se han elucidado más de 8.000 estructuras que poseen esta actividad biológica. Incluso se han obtenido compuestos semisintéticos a partir de los metabolitos aislados, cuya actividad antioxidante ha resultado ser mayor que la de sus predecesores (Prior y cols., 2005).

Si bien se han llegado a establecer varios mecanismos de acción de los antioxidantes, aún no se ha establecido un método que evalúe de manera general esta actividad, debido a que es todavía un tema complejo, y los resultados de los estudios publicados varían considerablemente (Huang y cols., 2005; Zaporozhets y cols., 2004).

En la literatura se han reportado diversos ensayos que evalúan la actividad antioxidante de plantas de uso común en las regiones donde éstas son endémicas. Debido a que se conocen algunos de los mecanismos de acción de los antioxidantes (captura de radicales libres, disminución de singulete del oxígeno, quelación de metales de transición, inhibición de enzimas) se han podido desarrollar algunos ensayos de actividad biológica, siendo los más utilizados:

- La captura de radicales libres utilizando DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) como radical (Hu y Kitts, 2000; Charanjit y cols., 2002; Bergman y cols., 2002).
- Inhibición de enzimas (xantina oxidasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa) (Charanjit y cols., 2002; Alfaro y cols., 2003; Lin y cols., 2000).

- Cuantificación de fenoles totales con el reactivo Folin-Ciocalteu (Velásquez y cols., 2004; Picerno y cols., 2003).
- Medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) (OXItek TBARS assay kit).
- Oxidación de lípidos mediante la utilización de liposomas (Picerno y cols., 2003).
- Capacidad en equivalentes Trolox utilizando 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Cos y cols., 2000).
- Disminución del oxígeno singulete (Alfaro y cols., 2003).
- Resonancia de espín electrón (Cos y cols., 2000).
- Capacidad reductora de Fe^{+3} (Prior y cols., 2005).

1.3 Flavonoides y otros compuestos fenólicos.

Muchos estudios han demostrado que la actividad antioxidante de los productos naturales se debe a compuestos como flavonoides, isoflavonas y otros compuestos fenólicos (figura 1) (Velásquez y cols., 2000; Pietta, 2000; Heo y cols., 2005; Fabjan y cols., 2003). Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, sobre todo en las partes aéreas de las plantas. Los compuestos fenólicos se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y salen al citoplasma celular para realizar su función (Pietta, 2000).

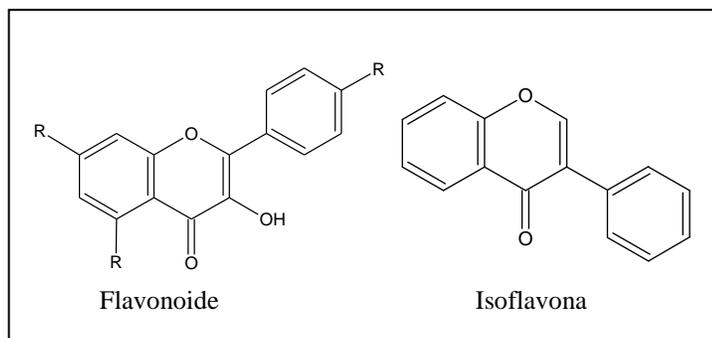


Figura 1. Estructuras de un flavonoide y una isoflavona.

Los flavonoides actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, repelentes, atractores visuales, etc. (Pietta y cols., 2000; Mahoney y cols., 2004). La capacidad de los flavonoides de actuar como antioxidantes *in vitro* ha sido sujeto de muchos estudios, lo que estableció una relación importante entre la estructura de los flavonoides y su capacidad antioxidante (Cos y cols., 2000; Pietta, 2000). La capacidad antioxidante de los flavonoides *in vivo* está menos documentada debido a que no se conoce bien como actúa en los humanos. Estudios *in vivo* han demostrado que al ser ingeridos, los flavonoides son metabolizados a ácidos fenólicos, algunos de los cuales poseen la capacidad de capturar radicales libres (Bergman y cols., 2002; Pietta, 2000).

Una cantidad importante de estudios han indicado que muchos compuestos polifenólicos además de actuar como antioxidantes, poseen actividad hepatoprotectora (Luk y cols., 2007; Mayer y cols., 2005), anticancerígena (Seeram, 2008; Zhang y cols., 2008; Kresty y cols., 2008) y neuroprotectora (Shukitt-Hale y cols., 2008). Por otra parte, una gran número de publicaciones reportan una relación entre la actividad antioxidante de algunos extractos de plantas o compuestos aislados a partir de fuentes

naturales, con una actividad inmunomoduladora (inmunoestimulante en la mayoría de los casos) (Koganov y cols., 1999), antialérgica, antiinflamatoria (Wei y cols., 2005; Martínez y cols., 1997) y antiviral (Benavente y cols., 1997). Otros estudios indican que la actividad inmunomoduladora de algunos flavonoides ocurre mediante mecanismos donde se incluye la capacidad de reducir la formación de radicales libres, así como la capacidad de capturarlos (Garza y cols., 2006; Nordberg y cols., 2001; Arner, 2001; Wang y cols., 1999; Chef, 1993). De tal forma que la relación establecida entre actividad antioxidante e inmunomoduladora en algunos componentes de origen natural (Koganov y cols. 1999), abre una nueva posibilidad de estudio sobre plantas utilizadas para aliviar síntomas de enfermedades donde se vea incluido un factor inmunológico.

1.4 Medicina herbolaria.

La herbolaria tuvo su origen con el conocimiento de las propiedades medicinales de un gran número de plantas, por parte de los pueblos primitivos. Estos conocimientos se han acumulado y transmitido de generación en generación y han trascendido a través de las mismas, mediante la descripción de dichas plantas medicinales y su utilidad. Un rico acervo literario es prueba de la importancia que han tenido las plantas en la salud del hombre (Domínguez, 1978).

Obtener compuestos con actividad biológica a partir de fuentes naturales se ha realizado desde hace mucho tiempo. En las últimas décadas se ha racionalizado la forma

de aislar estos compuestos mediante el fraccionamiento biodirigido, para lo cual se consultan previamente los usos tradicionales que la población hace de las plantas.

Por este motivo la investigación de plantas medicinales ya no es vista como un folklore, sino como una relevante actividad científica, ya que las mismas son una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, en la obtención de nuevas moléculas bioactivas que se manifiesten en diferentes mecanismos de acción.

Desarrollar nuevos medicamentos a partir de plantas medicinales, se justifica debido a que la probabilidad de encontrar nuevas moléculas en las especies vegetales utilizadas por la medicina tradicional es notablemente alta, así como su posibilidad de expresar diferentes mecanismos de acción, ofreciendo una nueva estrategia terapéutica.

La investigación de plantas medicinales abarca diferentes disciplinas como la etnomedicina, la farmacología, la fitoquímica, la toxicología, la investigación clínica, la biotecnología y el diseño de medicamentos. La interacción entre estas disciplinas ha dado como resultado la creación de catálogos, colecciones, bancos de datos sobre medicina tradicional, recursos humanos, recursos naturales, plantas medicinales, y organización social de médicos tradicionales (IMSS, 2005).

La OMS reconoció la importancia de este recurso terapéutico y generó un programa de reconocimiento y promoción de la medicina herbolaria, y en 1990

promovió una serie de recomendaciones para la regularización de los medicamentos herbolarios (Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005).

1.4.1 Medicina tradicional Mexicana

La cultura popular de la fitoterapia en México tiene una tradición de más de 3,000 años. Se han reportado unas 3,000 especies curativas de las 30,000 especies existentes en nuestro país; de estas especies curativas sólo el 10% de las plantas medicinales han sido estudiadas científicamente (Adame y Adame, 2000).

La Secretaría de Salud reconoce que muchas de las plantas medicinales conocidas por la población, están siendo utilizadas como remedios para el tratamiento de diversas enfermedades, y que esta práctica tiene mayor relevancia cada día, por lo que ha construido el marco para la regulación de estos productos (medicamentos herbolarios) a través de diversos instrumentos. Uno de ellos es la propuesta del nuevo Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario, que regula las actividades, establecimientos, productos y servicios y se precisa la manera en que estos productos deben ser tratados. El nuevo reglamento reconoce tres tipos de medicamentos: el químico farmacéutico, el homeopático y el herbolario (IMSS, 2005).

Por otro lado, la mayoría de las publicaciones sobre herbolaria mexicana, provienen de plantas del centro del país, las cuales son plantas muy diferentes a las de

nuestra región. El norte del país cuenta con una gran variedad de flora que crece bajo condiciones climáticas extremas y por tanto desarrollan una enorme cantidad de metabolitos secundarios para su protección y supervivencia. Diversas plantas se utilizan tradicionalmente en nuestra región para combatir síntomas, que hoy se sabe, están relacionados con la presencia de radicales libres.

Estudios etnofarmacológicos de la región noreste del país, muestran que un número considerable de especies vegetales son utilizadas como tratamiento tradicional para diversas enfermedades, incluyendo las de tipo crónico-degenerativo (Luk y cols., 2007). Hoy en día se sabe que muchas de estas enfermedades (como el cáncer, la enfermedad de Parkinson, el mal de Alzheimer, diabetes, enfermedades reumáticas y problemas vasculares) están mediadas por procesos oxidativos que derivan en la muerte celular y daño de tejidos, o bien, en la modificación del metabolismo celular y consiguiente desequilibrio fisiológico (Jung y cols., 2006; Seeram, 2008; Zhang y cols., 2008; Shukitt-Hale, 2008). Tales procesos oxidativos están dados por la presencia de especies reactivas al oxígeno (ROS) entre las que se incluyen los radicales libres, enzimas oxidasas, sustancias inorgánicas oxidantes, etc. (Shukitt-Hale, 2008; Seeram, 2008; Luk, 2007; Pietta, 2000). Lo anterior indica entonces una relación entre el uso tradicional de plantas que contienen componentes antioxidantes, y el alivio de algunos de los padecimientos relacionados con procesos oxidativos.

Recientemente se describió la determinación de la actividad antioxidante de 15 plantas de la región. En este trabajo se utilizaron los ensayos de secuestro de radical

libre DPPH, determinación de fenoles totales e inhibición de xantina oxidasa. Dos de las 15 plantas utilizadas mostraron una importante actividad antioxidante: damiana (*Turnera diffusa*) y nogalillo (*Juglans mollis*). Este trabajo de investigación fue realizado en el Departamento de Química Analítica de nuestra Facultad de Medicina (Pozos, 2005).

1.4.1.1 Damiana (*Turnera Diffusa*)



Figura 2. *Turnera diffusa*.

Planta herbácea de la familia de las turneráceas que mide entre 30 y 70 cm de altura. Su tallo es ramoso con hojas alternas ovaladas y aromáticas. Las flores son pequeñas de color blanco o amarillo.

Uso tradicional: Es usada para tratar el resfriado común, dispepsia, desbalance hormonal, depresión, desórdenes nerviosos y aperitivo. Sus hojas son utilizadas para elaborar una infusión que actúa como antianémica, conceptiva, contrarrestar la frigidez

y la impotencia. Actúa también como diurética, contra malestar menstrual, problemas de próstata, tónico general y cerebral (Alcaraz y cols., 2004; Arletti y cols., 1999).

Crece al sur de los Estados Unidos, México y países centroamericanos. No se ha descrito en Europa. Su uso ha dado buenos resultados en casos de astenia, debilidad, agotamiento físico o intelectual y estrés. Se han descrito algunos principios activos como: cineol (0.5-1%), α y β -pinenos, *p*-cimeno, timol, sesquiterpenos (alfa-copaeno, delta-cadineno, calameneno), taninos (3.5), eterósidos hidroquinónicos, robutósido, eterósidos cianogénicos, alcaloides (7%); beta-sitosterol, damianina (principio amargo); resina (6-14%), goma (13.5%), proteínas (15%) (Adame, 2000; Alcaraz y cols., 2004; Domínguez, 1976; Spencer y cols., 1981; Piacente y cols., 2002; Hernández y cols., 2003). Un estudio reciente describe también el aislamiento de algunos derivados glicosilados de la luteolina, de la apigenina, siringetina y laricitina, para lo cuales aún no se ha reportado actividad biológica (Zhao y cols., 2007).

Es comercializada para los usos antes descritos de manera individual o en mezclas herbales que incluyen plantas como el ginkgo (*Ginkgo biloba*), ginseng (*Panax ginseng*) y sabal enano (*Serenoa repens*) (Zhao y cols., 2007).

1.4.1.2 Nogalillo (*Juglans mollis*)



Figura 3. *Juglans mollis*.

Árbol de la familia de las juglandáceas, que alcanza 15 metros de altura. Su madera es dura rojiza y parda, con hojuelas ovales y puntiagudas. Se ha descrito su distribución en todo México.

Uso tradicional: Las hojas se utilizan en cataplasmas contra el reumatismo. El cocimiento de las hojas favorece la cicatrización de las llagas rebeldes, alivia las aftas, leucorrea y además se emplea como antiescrofuloso. Para curar intoxicaciones, se usa la infusión de las hojas. El mesocarpio del fruto se usa para las ronchas, aplicando una cataplasma en la parte afectada (Martínez, 1994; Adame, 2000).

No hay estudios fitoquímicos para *Juglans mollis*, sin embargo, para otras especies de *Juglans* han sido descritos diversos compuestos polifenólicos (entre ellos algunos flavonoides glicosilados) (Min y cols., 2000; Joe y cols., 1996; Tsao y cols.,

2006; Colaric y cols., 2005), ácidos grasos, terpenoides y vitaminas (Li y cols., 2007; Amaral y cols., 2004; Lee y cols., 2002; Amaral y cols., 2005), naftoquinonas (Mahoney y cols., 2000), y varios carbohidratos y esteroides (Jurd, 1956).

1.5 Justificación

En base a los reportes que muestran la capacidad antioxidante de extractos de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*, y que no se encontraron antecedentes de aislamiento de compuestos procedentes de estas especies con dicha actividad, y estudios de actividad inmunomoduladora en conjunto, resulta ser de gran interés el aislamiento y caracterización biológica de compuestos antioxidantes e inmunomoduladores procedentes de estas dos especies de plantas.

1.6 Objetivo general

Aislar, purificar y caracterizar compuestos antioxidantes de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa* y determinar su actividad inmunomoduladora.

1.7 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antioxidante y citotóxica de extractos de las distintas partes de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*.
2. Obtener extractos diferenciales de la parte más activa de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*.
3. Aislar y purificar el o los metabolitos con mayor actividad antioxidante de *Juglans mollis*.
4. Caracterizar los compuestos aislados de *Juglans mollis* mediante técnicas espectroscópicas.
5. Aislar y purificar el o los metabolitos con mayor actividad antioxidante de *Turnera diffusa*.
6. Caracterizar los compuestos aislados de *Turnera diffusa* mediante técnicas espectroscópicas.
7. Evaluar la actividad biológica de los compuestos antioxidantes aislados.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, Equipos y Reactivos.

2.1.1 Material

- Tubos de ensayo 13 x 100
- Tubos de ensayo 18 x 150
- Matraces bola de 100 mL, 500 mL y 1000 mL con esmeril 24/40
- Matraces Erlenmeyer de 125 mL, 250 mL, 500 mL y 1000 mL
- Probeta de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL
- Pinzas de disección
- Pinzas de tres dedos
- Espátula para polvos
- Gradillas para 60 tubos
- Cartucho de SPE C₁₈ 1000 mg/8.0 mL marca Alltech
- Cromatoplasmas de sílica gel 60F₂₅₄ 20x20 marca Merck
- Columna Lobar LiChroprep RP-18 (40-120 µm) marca Merck

- Columna de HPLC Licospher Chromolith C₁₈e (100x4.6 mm)marca Merck
- Placas de porcelana de 12 pozos
- Microplacas estériles de poliestireno con 96 pozos de fondo plano y tapa
- Capilares de 5 y 10 µL marca Drummon Wiretrol
- Frascos de boca ancha de vidrio ámbar
- Cubas cromatográficas de 121 x 108 x 80 mm
- Papel filtro Whatman 40
- Pipetas automáticas Research de 1000 µL y 100 µL marca Eppendorf
- Puntillas de 0.5 y 1.5 mL
- Acrodiscos de 0.45 y 0.22 µm de PTFE marca Millipore
- Embudos de separación
- Embudos de filtración de vidrio de tallo corto
- Tubos Eppendorf de 2.0 mL
- Aspersor de vidrio marca Sigma

2.1.2 Equipo

- Espectrofotómetro DU 7500 marca Beckman
- HPLC modelo 600 Controller marca Waters. Detector DAD modelo 2996 marca Waters. Automuestreador modelo 717plus Autosampler marca Waters.
- RMN modelo Avance DPX400 de 400MHz marca Bruker
- Balanza granataria Scout-Pro marca Ohaus
- Balanza analítica GR-120 marca AND

- Rotavapor Laborota 4000 marca Heidolph
- Bomba de vacío modelo 2025 marca Welch
- Sistema refrigerante modelo K20 y recirculador modelo DC1 marca Haake
- Ultrasonido modelo 2510 marca Branson
- Agitador Unimax 1010 marca Heidolph
- Vórtex marca VWR
- Microcentrífuga Micro-MB marca IEC
- Bomba peristáltica Econo-Pump marca Bio-Rad
- Colector de fracciones modelo 2128 marca Bio-Rad
- Invertoscopio
- Incubadora con controlador de humedad y CO₂
- Contador de centelleo marca Beckman

2.1.3 Reactivos generales

- Metanol grado analítico marca Fermont
- Metanol grado HPLC marca Fermont
- Acetato de etilo grado analítico marca Fermont
- Hexano grado analítico marca Fermont
- Tolueno grado analítico marca Fermont
- Butanol grado analítico marca Fermont
- Etanol grado analítico marca Fermont
- Cloruro de metileno grado analítico marca Fermont

- Ácido acético glacial grado analítico marca Fermont
- Ácido fórmico grado analítico marca Fermont
- Dimetil-sulfóxido marca Fermont
- Sílica gel 60G (0.2-0.5 mm) marca Merck
- Nitrógeno gas de alta pureza grado 5.0 marca AGA
- Agua destilada

2.1.4 Reactivos especiales

- DMSO-*d*₆ 99.96 % D marca Aldrich
- Metanol-*d*₄ 100 % D marca Aldrich
- 1,4 bis [2-(5 feniloxalil)] benceno (POPOP)
- 2,5-difeniloxazol-benceno (PPO)
- ³H Timidina marca Amersham
- NPR (aminoetil-difenil-éster del ácido bórico) 0.5%.
- PEG (polietilenglicol) 5%.
- DPPH 0.05 mg/mL. Se disolvió 5 mg de DPPH marca Sigma en 100 mL de etanol
- Quercetina marca Roth
- Rutina marca Aldrich
- Hidroxitolueno butilado

2.1.5 Material biológico

- Células mononucleares de bazo de ratón Balb/c
- Medio de cultivo RPMI 1640

2.1.6 Cromatografía en capa fina (CCF)

Cromatoplasmas de sílica gel 60F₂₅₄ marca Merck.

2.1.6.1 Sistemas de elución

2.1.6.1.1 Polares

Acetato de etilo: agua: ácido acético: ácido fórmico (25:1:1:3)

2.1.6.1.2 No polares “A”

Tolueno: acetato de etilo (98:2)

2.1.6.1.3 No polares “B”

Tolueno: acetato de etilo: ácido acético (15:15:1)

2.1.6.2 Reveladores

2.1.6.2.1 Actividad antioxidante A

DPPH (2.0 mg/mL).

Se disolvió 2.0 mg de DPPH en 100 mL de etanol.

2.1.6.2.2 Fenoles

Cloruro de hierro (III) en solución saturada.

Se agregó cloruro férrico en 20 mL de agua destilada hasta que no se observaba más disolución.

2.1.6.2.3 Productos naturales

Natural Products Reagent (0.5 %). Se disolvieron 500 mg del reactivo Natural Products marca Fluka en 100 mL de etanol / Polietilenglicol (5.0 %). Se disolvieron 5 g de polietilenglicol 1000 marca Fluka en 100 mL de etanol.

2.1.7 Condiciones de elución para HPLC-DAD.

2.1.7.1 Sistema A.

Tiempo (min)	% MeOH	% Agua
0	30	70
1	30	70
10	50	50
15	50	50
16	30	70
20	30	70

Flujo: 1mL/min., λ 254nm

2.2 Colecta de plantas.

La colecta de *Juglans mollis* se llevó a cabo en el mes de mayo del 2006 en Villaldama, N.L.

La colecta de *Turnera diffusa* se llevó a cabo en el mes de diciembre del 2005 en Cadereyta, N.L.

Especímenes de ambas plantas fueron enviados al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su identificación y comprobación de especie.

Las plantas fueron separadas en sus diferentes partes y puestas a secar a temperatura ambiente por un tiempo de dos semanas.

2.3 Obtención de extractos primarios.

Se realizaron extractos metanólicos de corteza y hoja de *Juglans mollis*, y extractos metanólicos de raíz, hoja y hoja/tallo de *Turnera diffusa*. Se pesaron aproximadamente 50 g del material seco y molido de planta y se extrajo con 250 mL de metanol, agitando durante una hora a temperatura ambiente, en tres repeticiones. Los tres extractos se filtraron y se juntaron para posteriormente llevarlos a sequedad por evaporación a presión reducida con una temperatura controlada de 37 °C. Los extractos se colocaron en frascos ámbar y finalmente se sellaron con nitrógeno gaseoso y se mantuvieron en refrigeración (4 °C). Se calculó el porcentaje de recuperación para cada uno de los extractos.

2.4 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante con DPPH por cromatografía en capa fina (CCF).

Se prepararon 2 ml de una solución de 1 mg/mL de cada extracto. Se preparó un estándar de quercitina a la misma concentración.

Cada una de las soluciones preparadas se analizó mediante cromatografía de capa delgada; para ello se sembraron 10 μ L de cada solución en una placa cromatográfica de sílica gel 60F₂₅₄.

La cromatografía se eluyó con la fase móvil del apartado 2.1.6.1.1.

Como revelador de compuestos antioxidantes se preparó una solución DPPH de concentración 2 mg/mL en etanol, la cual se resguardó de la luz para evitar su degradación.

La placa se secó y posteriormente se reveló con la solución de DPPH, mediante un aspersor con corriente de nitrógeno. Luego de una hora se obtuvo el total de las bandas positivas, que aparecieron en color amarillo en un fondo violeta.

2.5 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante con DPPH por espectrofotometría de UV-Vis.

Se determinó el porcentaje de reducción del radical libre por espectroscopia de UV-Vis a 517nm de acuerdo al método utilizado por Hu y cols. (2000). Se prepararon soluciones de cada uno de los extractos a una concentración de 1 mg/mL.

Se colocó en tubos 0.5 mL de cada extracto y se adicionó 0.5 mL de la solución de DPPH a cada tubo. Los tubos se agitaron y dejaron reaccionar en oscuridad por 30 minutos.

La medición espectrofotométrica se realizó a 517 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico y 1 mL de capacidad. Se utilizó una solución de quercetina de 1 mg/ml como control positivo.

La reducción del DPPH se calculó a partir de la decoloración del reactivo con etanol (control) mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = \frac{(\text{Absorbancia del control}) - (\text{Absorbancia de muestra})}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

2.6 Determinación de citotoxicidad de los extractos primarios.

Para probar la citotoxicidad de los extractos se hicieron cultivos celulares en una placa de 96 pozos, colocando 100,000 células mononucleares de bazo de ratón Balb/c en un volumen de 100 μ L de medio RPMI 1640. Se probaron los extractos de corteza y hoja de nogalillo y de hoja y hoja/tallo de damiana, en cantidades de 1, 10, 50 y 500 μ g por pozo (tabla 1). Además se preparó un control del solvente con el que se manejaron los extractos. Los cultivos fueron observados a las 72 horas, mediante el uso de Eosina Y como colorante supravital.

2.7 Determinación del efecto inmunomodulador de los extractos primarios.

La actividad inmunomoduladora se evaluó en base a la proliferación de células mononucleares de acuerdo al método utilizado por Salinas y cols. (1999).

Las células mononucleares se extrajeron de bazo de ratón Balb/C mediante profusión con medio RPMI 1640. Las células mononucleares se separaron del paquete celular por un gradiente de densidad, mediante una solución de ficoll:diatrizoato de sodio (2:1) por centrifugación. Los mononucleares contenidos en la interfase fueron retirados y lavados tres veces con medio RPMI 1640. Las células se ajustaron a una suspensión de 1.0×10^6 células/mL.

Los extractos se prepararon en concentraciones de 1, 10, 50 y 500 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$, disolviéndose en una solución de etanol 50 % y DMSO 5%. 10 μL de las diluciones fueron probadas en una placa de 96 pozos, en donde cada pozo contenía un cultivo de 100,000 células mononucleares, en 100 μL de medio de cultivo RPMI. Cada dilución se probó por triplicado en dos experimentos, uno de ellos en presencia de un mitógeno (fitohemaglutinina PHA), y el otro sin la presencia del mitógeno (tabla 1).

Se tuvieron como controles, células sin estímulo y sin extracto, células con estímulo y sin extracto, células con el solvente de los extractos y sin estímulo, y células con el solvente de los extractos y con estímulo.

A las 48 horas se adicionó a cada pozo 10 μL de ^3H Timidina. El cultivo se hizo de 72 horas. Las células de cada pozo se cosecharon y se colocaron en líquido de centelleo (preparado con 0.05 g de (1,4 bis [2-(5 feniloxalil)] benceno) (POPOP) y 6.0 g de 2,5-difeniloxazol-benceno (PPO) en 1 L de tolueno), para posteriormente obtener los valores de cuentas por minuto.

Se calculó el índice de proliferación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de proliferación} = \frac{\text{Cuentas/min de células estimuladas}}{\text{Cuentas/min de células sin estímulo}}$$

Tabla1. Diseño del ensayo de citotoxicidad y de inmunomodulación para extractos primarios. H=extracto de hoja, H/T= extracto de hoja y tallo, C= extracto de corteza.

	500mg			50mg			10mg			1mg		
H T. diffusa												
H/T T. diffusa												
C J. mollis												
H J. mollis												

2.8 Obtención de extractos diferenciales.

Se realizó una extracción diferencial a los extractos metanólicos de la parte aérea de damiana, y de los extractos metanólicos de corteza y hoja de nogalillo.

Se pesó aproximadamente 1.0 g de cada extracto y se resuspendió en 10 ml de etanol 90 %. Para la extracción diferencial se usó hexano, acetato de etilo y butanol. Se hicieron tres extracciones con 30 mL cada una, para cada solvente. Las fracciones se llevaron a sequedad evaporando a presión reducida y con corriente de nitrógeno.

Se calculó el porcentaje de recuperación de cada fracción, en base al peso del extracto original.

2.9 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales.

Se prepararon soluciones de 1mg/mL de cada uno de los extractos diferenciales de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*.

Cada solución se analizó por CCF mediante el procedimiento indicado en el punto 2.4.

2.10 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales.

Se obtuvo el porcentaje de reducción de cada extracto diferencial siguiendo el mismo procedimiento que se describe en el punto 2.5. Los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó el promedio y la desviación estándar para cada uno.

2.11 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de *Juglans mollis*.

Partiendo del extracto de acetato de etilo de corteza de *Juglans mollis*, se sembró 1.0 g del extracto en una columna de sílica gel de 150 mL. Se eluyó mediante la aplicación de baja presión en la modalidad flash, con los siguientes sistemas de eluentes: AcOEt:hexano (1:1), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH. Se pasaron 450 mL de cada solvente.

Las cuatro fracciones fueron analizadas por CCF y reveladas con solución de DPPH para rastrear la presencia de los compuestos activos, tal como se describió en el punto 2.4.

Se continuó el aislamiento con la fracción eluída con acetato de etilo. Se sembró aproximadamente 100 mg de esta fracción, en una columna Lobar RP-18 (24-140) de 24 mL, y se eluyó con un gradiente de MeOH acuoso (30-100 %). Se pasaron 40 mL de cada mezcla de solventes con un flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 4 mL cada una.

Las fracciones obtenidas se analizaron por CCF. Se seleccionaron las que contenían los compuestos de interés y fueron sometidas a sucesivas separaciones cromatográficas con la columna Lobar RP-18, esta vez, mediante gradiente de MeOH acuoso (40-80%) hasta la purificación de dos compuestos, denominados N1 y N2.

Un tercer compuesto fue purificado a partir de la fracción de MeOH 30%, obtenida en la primera columna de fase inversa. Esta fracción fue sometida a una separación por cromatografía en capa delgada preparativa, de sílica gel. La placa preparativa fue eluída con la misma fase móvil descrita en el punto 2.4. Inmediatamente se extrajo la banda de interés en la placa, con acetato de etilo y posteriormente metanol. El compuesto obtenido se denominó N3.

2.12 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de *Turnera diffusa*.

Partiendo del extracto metanólico de la parte aérea de *Turnera diffusa*, se realizó una extracción líquido-líquido con hexano. Posteriormente la fracción soluble en metanol se sometió a una extracción en fase sólida con un cartucho de fase inversa C18 para la eliminación de clorofilas. El cartucho se eluyó con MeOH 50 % y posteriormente con MeOH acuoso 70 % y MeOH 100 %. Se continuó trabajando con la fracción de MeOH 50 %.

Esta fracción fue sometida a una cromatografía de sílica gel en modalidad a vacío (VLC). La muestra se eluyó con los siguientes sistemas de eluentes de menor a mayor polaridad: CH₂Cl₂, AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH. Se pasaron 150 mL de cada uno de los solventes.

Las fracciones fueron analizadas por CCF y se decidió continuar con la fracción eluída con AcOEt. Esta fracción fue sometida a una segunda VLC, la cual se eluyó con un gradiente de tolueno, tolueno:AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH.

A la fracción de AcOEt:MeOH obtenida mediante columna de sílica gel, se le realizó una cromatografía de fase inversa utilizando una columna Lobar RP-18 (24-140) de 24 mL, la cual se eluyó con un gradiente de MeOH acuoso (30-100 %). Se pasaron 40 mL de cada mezcla de eluentes con un flujo de 1 mL/min. Se colectaron 80 fracciones de 4 mL cada una, las fracciones fueron analizadas mediante CCF. Se seleccionaron las fracciones que contenían el compuesto de interés, las cuales se repurificaron por medio de sucesivas cromatografías con la columna Lobar RP-18, con un gradiente de MeOH acuoso (30-50 %) hasta el aislamiento de un compuesto puro denominado D1.

2.13 Análisis por HPLC de los compuestos aislados.

Los compuestos aislados de *Juglans mollis* fueron analizados junto con el extracto de acetato de etilo de corteza, por HPLC-DAD. Se utilizó el sistema de elución indicado en el punto 2.1.7.1. Se utilizó una columna Chromolith C18e marca Merck.

2.14 Análisis por RMN de los compuestos aislados.

A los compuestos N1 y N2 se les realizaron espectros de resonancia magnética nuclear de: $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ y DEPT, y espectro de doble dimensión COSY, HMBC y HMQC. Para todos los experimentos anteriores se utilizó MeOD, y en el caso de N1, se realizaron también espectros de $^1\text{HRMN}$ en DMSO.

Al compuesto D1 se le realizaron espectros de resonancia magnética nuclear de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ y DEPT, y espectro de doble dimensión COSY, HMBC y HMQC. Todos los experimentos anteriores se hicieron en solución de MeOD. Además se realizó un experimento NOE para D1 en MeOD y un espectro $^1\text{HRMN}$ en DMSO.

2.15 Cuantificación de la actividad antioxidante de los compuestos aislados mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis y DPPH.

Se cuantificó la actividad antioxidante de los compuestos aislados N1, N2, D1 y la fracción D2. Como controles positivos se utilizaron quercetina, rutina y hidroxitolueno butilado (BHT).

Se prepararon soluciones de 1 mg/mL de los compuestos aislados, la fracción D2 y los controles. Se tomó una alícuota de 40 μL de la solución de 1 mg/mL y se agregó en

el primer tubo con 960 μL de etanol. Se homogenizó el contenido del tubo y se tomaron 500 μL de esta solución y se pasaron a un segundo tubo que contenía 500 μL de etanol. Se tomaron 500 μL de esta nueva solución y se pasaron a un tercer tubo con 500 μL de etanol. Esto se repitió con cinco tubos más. Del tubo siete se tomaron 500 μL de solución y se desecharon. Se adicionaron a cada tubo 500 μL de una solución de DPPH 0.05 mg/ml y se dejó reposar en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Se tomaron lecturas por espectroscopia de UV-Vis a 517 nm con una celda de cuarzo de 1 mL y 1cm de trayecto óptico. Como control se utilizó un tubo que contenía 500 μL de etanol y 500 μL de la solución de DPPH 0.05 mg/mL. Este control fue tratado de la misma manera que las diluciones seriadas. Las concentraciones finales de las muestras probadas fueron de 20, 10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se calculó el 50 % de reducción de DPPH o concentración mínima inhibitoria 50 (CI_{50}) de cada experimento. Se calculó el promedio y la desviación estándar para cada uno.

2.16 Determinación de la actividad inmunomoduladora de los compuestos aislados, en base a la proliferación de células mononucleares de bazo de ratón.

Se determinó la actividad inmunomoduladora de los compuestos N1, N2 y N3 aislados de *Juglans mollis*, así como de las fracciones de Hexano:AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo de

corteza de *Juglans mollis* por medio de la columna flash. El estudio se hizo siguiendo la metodología indicada anteriormente en el punto 2.7. El compuesto N1 y todas las fracciones antes mencionadas fueron probados en cantidades de 500, 50, 10 y 1 µg por pozo. Los compuestos N2 y N3 fueron probados en cantidades de 50, 10 y 1 µg por pozo. Los compuestos aislados fueron disueltos en agua destilada y las fracciones fueron disueltas en DMSO 5%.

Los experimentos se realizaron por triplicado, con estimulación de PHA y sin estimulación. Se utilizaron como controles células con estímulo y sin estímulo, y células con el solvente utilizado, con y sin estímulo de PHA (tabla 2).

Tabla 2. Diseño del ensayo de citotoxicidad e inmunomodulación para fracciones y compuestos aislados de *Juglans mollis*.

	500µg			50µg			10µg			1µg		
Fracción 1												
Fracción 2												
Fracción 3												
Fracción 4												
N1												
N2												
N3												

A las 48 horas se adicionó a cada pozo 10 µL de ³H timidina. El cultivo se incubó por 72 horas. Las células de cada pozo se cosecharon y se colocaron en líquido de centelleo, para posteriormente obtener los valores de cuentas por minuto.

Se calculó el índice de proliferación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de proliferación} = \frac{\text{Cuentas/min de células estimuladas}}{\text{Cuentas/min de células sin estímulo}}$$

2.17 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos aislados.

Se montó en un placa de 96 pozos el mismo experimento de inmunomodulación, agregando las mismas cantidades de compuesto puro y fracciones de *Juglans mollis*, en cultivos de 100,000 células mononucleares de bazo de ratón Balb/c en un volumen de 100 µL. Se analizó simultáneamente un control de células solas y un control de solvente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (tabla 2).

Cada pozo se observó a las 72 horas con un invertoscopio. Se utilizó Eosina Y como colorante supravital.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Colecta y autenticación de las plantas.

Las plantas fueron colectadas de tal manera que ninguna de sus partes fuera dañada. Luego de haber secado completamente las plantas, se enviaron especímenes al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de donde se obtuvieron los números de identificación para cada especie (tabla 3).

Tabla 3. Recolección y autenticación de plantas.

Nombre común	Nombre científico	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Folio
Damiana	<i>Turnera diffusa</i>	Zuazua, NL	Diciembre 2005	23569
Nogalillo	<i>Juglans mollis</i>	Villaldama, NL	Mayo 2005	23894

3.2 Obtención de extractos primarios.

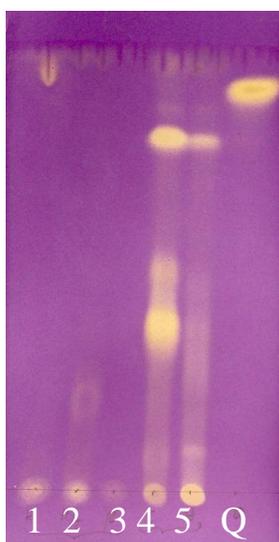
Los porcentajes de recuperación de los extractos metanólicos de corteza y hoja de *Juglans mollis* y raíz, hoja y hoja/tallo de *Turnera diffusa* se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentajes de recuperación de extractos metanólicos de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*.

Especie	Parte extraída	% Recuperación
<i>Turnera diffusa</i>	Raíz	5.40%
<i>Turnera diffusa</i>	Hoja	16.20%
<i>Turnera diffusa</i>	Hoja/Tallo	18.45%
<i>Juglans mollis</i>	Corteza	7.95%
<i>Juglans mollis</i>	Hoja	9.15%

3.3 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante con DPPH por cromatografía en capa fina.

Los extractos primarios de las diferentes partes de cada especie y un control de quercetina fueron analizados por CCF y revelados con una solución de DPPH. La coloración amarilla en contraste con el fondo violeta de la placa, indicó la presencia de compuestos antioxidantes (figura 4).



	Extracto
1	Hoja de <i>T. diffusa</i>
2	Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i>
3	Raíz de <i>T. diffusa</i>
4	Corteza de <i>J. mollis</i>
5	Hoja de <i>J. mollis</i>
Q	Quercetina

Figura 4. Análisis cualitativo de actividad antioxidante de extractos metanólicos de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*. Fase móvil 2.1.6.1.1. Revelador 2.1.6.2.1.

3.4 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante con DPPH por espectrofotometría de UV-Vis.

Se determinó el porcentaje de reducción del radical libre por espectroscopia de UV-Vis a 517nm.

Tabla 5. Porcentajes de reducción de DPPH de los extractos metanólicos de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*.

Extracto	% Reducción
Control	0
Hoja de <i>T. diffusa</i>	63.20±1.4
Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i>	86.48±0.8
Raíz de <i>T. diffusa</i>	85.80±1.6
Corteza de <i>J. mollis</i>	72.34±2.2
Hoja de <i>J. mollis</i>	78.78±1.3
Quercetina	66.08±0.9

3.5 Determinación de citotoxicidad de los extractos primarios.

Se determinó el porcentaje de viabilidad celular en cultivos de mononucleares para cada extracto primario de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*. En la tabla 6 se muestran los promedios de los ensayos que se realizaron por triplicado. En todos los ensayos se tuvo un porcentaje de viabilidad mayor al 90%.

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad celular frente a los extractos metanólicos de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*.

Extracto	500µg	50µg	10µg	1µg
Hoja de <i>T. diffusa</i>	95.0±0.0%	95.0±0.0%	95.0±0.0%	98.3±2.8%
Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i>	90.0±0.0%	95.0±0.0%	95.0±0.0%	95.0±0.0%
Corteza de <i>J. mollis</i>	95.0±0.0%	95.0±0.0%	98.3±2.8%	98.3±2.8%
Hoja de <i>J. mollis</i>	95.0±0.0%	95.0±0.0%	98.3±2.8%	98.3±2.8%

3.6 Determinación del efecto inmunomodulador de los extractos primarios.

Se obtuvieron las cuentas de centellas por minuto para cada ensayo realizado por triplicado, para los extractos de hoja y hoja/tallo de *Turnera diffusa* y corteza y hoja de *Juglans mollis*. Se calculó el promedio de los triplicados y el índice de proliferación.

Tabla 7. Promedios de cuentas por minuto e índices de proliferación de extractos metanólicos de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*.

<i>Muestra</i>	<i>Cuentas/min sin PHA</i>	<i>Cuentas/min con PHA</i>	<i>Índice de estimulación</i>
Células control	2865±14	29675±54	10.36
DMSO 5%	2689±5	29107±72	10.82
Hoja de <i>T. diffusa</i> – 500µg	1828±26	6904±60	3.78
Hoja de <i>T. diffusa</i> – 50µg	1780±5	6009±39	3.38
Hoja de <i>T. diffusa</i> – 10µg	2067±11	3790±28	1.83
Hoja de <i>T. diffusa</i> – 1µg	2290±21	3587±41	1.57
Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i> – 500µg	1998±16	6938±53	3.47
Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i> – 50µg	2147±34	6624±52	3.09
Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i> – 10µg	2460±13	6496±25	2.64
Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i> – 1µg	2570±9	6231±23	2.42
Corteza de <i>J. mollis</i> – 500µg	3008±6	42932±156	14.27
Corteza de <i>J. mollis</i> – 50µg	3291±54	39746±48	12.08
Corteza de <i>J. mollis</i> – 10µg	2455±38	9654±53	3.93
Corteza de <i>J. mollis</i> – 1µg	2285±41	6790±101	2.97
Hoja de <i>J. mollis</i> – 500µg	2393±48	8479±79	3.54
Hoja de <i>J. mollis</i> – 50µg	2830±26	6541±76	2.31
Hoja de <i>J. mollis</i> – 10µg	2667±30	3256±132	1.22
Hoja de <i>J. mollis</i> – 1µg	2285±12	2436±48	1.07

3.7 Obtención de extractos diferenciales.

A partir de los extractos primarios de la parte aérea de *Turnera diffusa* y de corteza y hoja de *Juglans mollis* se realizaron extracciones diferenciales con hexano, acetato de etilo y butanol. Los extractos diferenciales fueron nombrados como se indica en la tabla 8.

Tabla 8. Nomenclatura de los extractos diferenciales de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*.

Extracto	Hexano	Acetato de etilo	Butanol
Hoja de <i>T. diffusa</i>	1F1	1F2	1F3
Hoja/Tallo de <i>T. diffusa</i>	2F1	2F2	2F3
Corteza de <i>J. mollis</i>	3F1	3F2	3F3
Hoja de <i>J. mollis</i>	4F1	4F2	4F3

Para cada nueva fracción se calculó el porcentaje de recuperación (tabla 9). Se partió de las cantidades de extracto primario, mostradas a continuación:

Turnera diffusa hoja (1) = 0.869g

Turnera diffusa hoja/tallo (2) = 1.981g

Juglans mollis corteza (3) = 1.100g

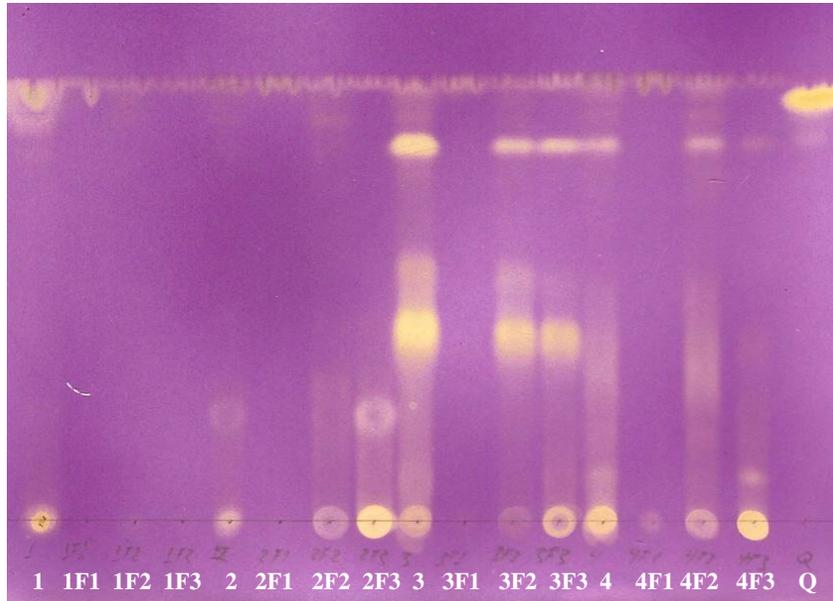
Juglans mollis hoja (4) = 1.992g

Tabla 9. Porcentajes de recuperación de los extractos diferenciales de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*. Nomenclatura de los extractos de acuerdo a la tabla 8.

Extracto diferencial	Peso	% Recuperación
1F1	0.155	17.92
1F2	0.090	10.37
1F3	0.119	13.73
2F1	0.432	21.80
2F2	0.293	14.79
2F3	0.227	11.50
3F1	0.161	14.68
3F2	0.522	47.50
3F3	0.325	29.60
4F1	0.232	11.66
4F2	0.347	17.42
4F3	0.537	26.99

3.8 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales.

De los 16 extractos diferenciales probados en CCF y revelados con DPPH, se observó mayor evidencia de presencia de compuestos antioxidantes en los extractos de acetato de etilo y butanol de hoja/tallo de *Turnera diffusa* y en los extractos de acetato de etilo y butanol de corteza y hoja de *Juglans mollis* (figura 5).



(1) Ext MeOH H *T. diffusa*, (1F1) Hexano H *T.diffusa*, (1F2) AcOEt H *T. diffusa*, (1F3) Butanol H *T. diffusa*, (2) H/T *T. diffusa*, (2F1) Hexano H/T *T.diffusa*, (2F2) AcOEt H/T *T. diffusa*, (2F3) Butanol H/T *T. diffusa*, (3) C *J. mollis*, (3F1) Hexano C *J. mollis*, (3F2) AcOEt C *J. mollis*, (3F3) Butanol C *J. mollis*, (4) H *J. mollis*, (4F1) Hexano H *J. mollis*, (4F2) AcOEt H *J. mollis*, (4F3) Butanol H *J. mollis*, (Q) Quercetina. H = hoja, H/T = hoja/tallo, C = corteza

Figura 5. Análisis cualitativo de actividad antioxidante de extractos de las distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*. Fase móvil 2.1.6.1.1. Revelador 2.1.6.2.1.

3.9 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante de los extractos diferenciales.

Los promedios de los porcentajes de reducción de DPPH para cada uno de los extractos diferenciales se calcularon con el ensayo que se llevó a cabo por triplicado (tabla 10). Los porcentajes de reducción más altos fueron de los extractos de acetato de etilo y butanol de la parte aérea de *Turnera diffusa* y el extracto de acetato de etilo de corteza de *Juglans mollis*.

Tabla 10. Porcentaje de reducción de DPPH de los extractos distintas partes de *Turnera diffusa* y *Juglans mollis*. Nomenclatura de los extractos de acuerdo a la tabla 8.

Soluciones 1mg/mL	% Reducción
Control EtOH	0.00±0.00
1	63.20±1.41
1F1	5.31±0.06
1F2	48.62±1.04
1F3	2.37±0.09
2	86.48±1.67
2F1	55.44±1.35
2F2	95.86±2.42
2F3	93.55±2.38
3	72.34±1.18
3F1	92.30±1.67
3F2	93.42±3.42
3F3	83.72±2.16
4	78.78±1.54
4F1	85.16±0.97
4F2	91.23±1.31
4F3	87.29±0.86
Quercetina	66.08±0.53

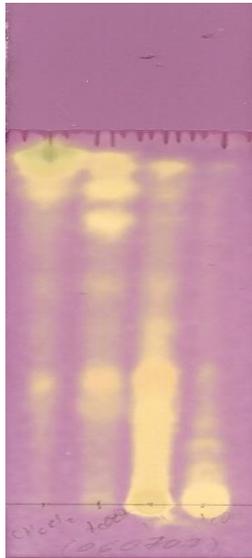
3.10 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de

Juglans mollis.

Se obtuvieron cuatro fracciones después de pasar el extracto de acetato de etilo de corteza de *Juglans mollis* por una columna de sílica gel en modalidad flash. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por CCF junto con el extracto original de corteza (figura 6). La figura 7 muestra las fracciones obtenidas reveladas con DPPH.



Figura 6. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo de corteza de *Juglans mollis* mediante una columna de sílica gel en modalidad flash. Fase móvil 2.1.6.1.1. Sin revelador.



C=extracto de AcOEt de corteza de *J. mollis*
F1=fracción de Hexano:AcOEt
F2=fracción de AcOEt (1:1)
F3=fracción de AcOEt:MeOH
F4=fracción de MeOH

Figura 7. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo de corteza de *Juglans mollis* mediante una columna de sílica gel en modalidad flash. Fase móvil 2.1.6.1.1. Revelador 2.1.6.2.1.

La fracción F3 se pasó a través de una columna de fase inversa de baja presión Lobar RP-18 (24-149) y se eluyó con un gradiente de MeOH acuoso (40 %-100 %) de donde se obtuvo la fracción F3' (figura 8).

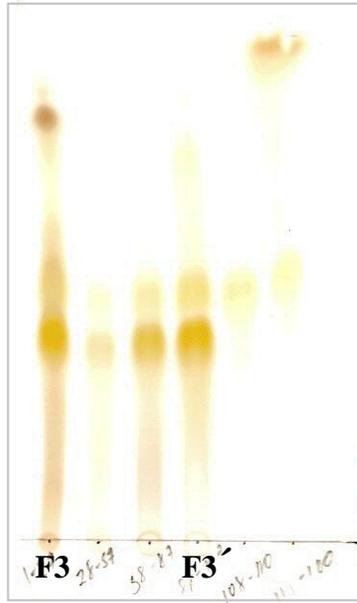
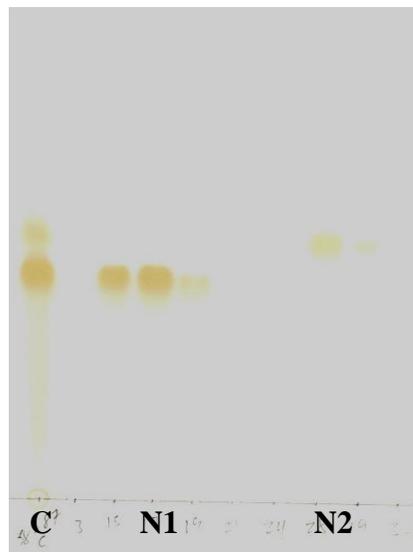


Figura 8. Cromatografía en capa fina de la fracción F3', obtenida mediante columna Lobar RP-18, a partir de la fracción F3 proveniente del extracto de corteza de *Juglans mollis*. Fase móvil 2.1.6.1.1.

A partir de la fracción F3' se obtuvieron, mediante purificaciones sucesivas, dos compuestos que fueron nombrados N1 y F2. Para esto, se utilizó una columna Lobar RP-18 eluída con un gradiente de MeOH acuoso (30-50 %). Se analizaron los compuestos aislados mediante CCF y se reveló con DPPH para determinar su actividad antioxidante (figura 9). Los compuestos se analizaron también por CCF revelada con NPR/PEG, donde se observó una coloración naranja en cada uno (figura 10).



Figura 9. Actividad antioxidante de la fracción F3' obtenida mediante columna Lobar RP-18, a partir de la fracción F3 proveniente del extracto de corteza de *Juglans mollis*. Fase móvil 2.1.6.1.1.Revelador 2.1.6.2.1.

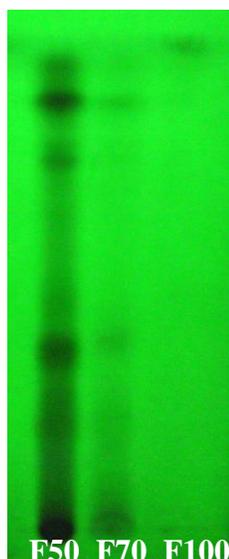


C=Fracción F3', N1=compuesto N1, N2=compuesto N2

Figura 10. Cromatografía en capa fina de los compuestos aislados N1 y N2. Fase móvil 2.1.6.1.1. Revelador 2.1.6.2.3.

3.11 Aislamiento y purificación de compuestos con actividad antioxidante de *Turnera diffusa*.

Se realizó una extracción líquido-líquido con hexano al extracto metanólico de la parte aérea de *Turnera diffusa*. El extracto hexánico fue descartado y se continuó trabajando con la fracción soluble en metanol. Se obtuvieron tres fracciones (nombradas F50, F70 y F100) a partir de la fracción soluble en metanol mediante una extracción en fase sólida con un cartucho de fase inversa. Las fracciones obtenidas se analizaron por CCF con la fase móvil 2.1.6.1.1 y se observaron bajo luz UV de 254nm (figura 11).



F50=Fracción MeOH 50%, F70=Fracción MeOH 70%,
F100=Fracción MeOH 100%

Figura 11. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas por extracción en fase sólida del extracto aéreo de *Turnera diffusa*. Fase móvil 2.1.6.1.1. UV 254nm.

Mediante una separación por columna de sílica gel de la fracción F50 de extracto aéreo de *Turnera diffusa* se obtuvieron fracciones de CH₂Cl₂, AcOEt,

AcOEt:MeOH y MeOH. Las fracciones se analizaron por CCF con la fase móvil 2.1.6.1.1 (figura 12).



F1=fracción CH₂Cl₂, F2=fracción AcOEt,
F3=fracción AcOEt:MeOH, F4=fracción MeOH

Figura 12. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de la parte aérea de *Turnera diffusa* (F50) mediante una columna de sílica gel. Fase móvil 2.1.6.1.1.

La fracción F3 fue sometida a una separación por cromatografía en columna de fase inversa Lobar RP-18 de donde se obtuvieron 80 fracciones. Las fracciones se analizaron por CCF con la fase móvil 2.1.6.1.1 (figura 13). Se seleccionaron dos fracciones que fueron denominadas F3' y F3'' con las que se continuó el aislamiento.

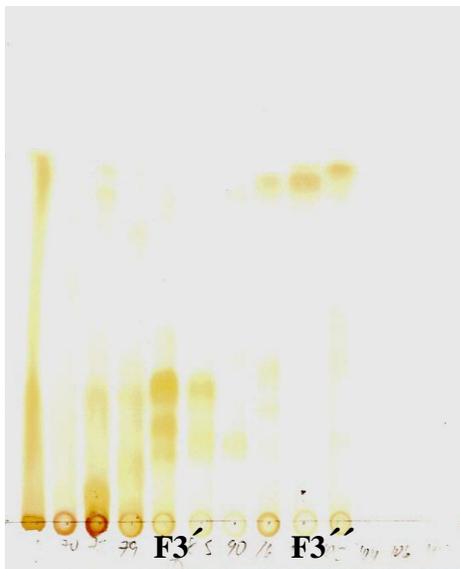


Figura 13. Fracciones F3' y F3'' obtenidas a partir de F3 mediante una columna Lobar RP-18. Fase móvil 2.1.6.1.1.

Se realizaron tres separaciones sucesivas mediante columna de fase inversa Lobar RP-18 (24-140). Se purificó el compuesto al que se denominó D1 y se obtuvo una fracción a la que se le llamó D2. Ambas muestras se analizaron por CCF con la fase móvil indicada en el punto 2.1.6.1.1 y se revelaron con NPR/PEG (figura 14). La fracción D2 fue analizada por CCF eluída con la fase móvil 2.1.6.1.3 y se reveló con NPR/PEG. En la placa se observaron por lo menos cinco compuestos de coloración amarillo-naranja (figura 15).

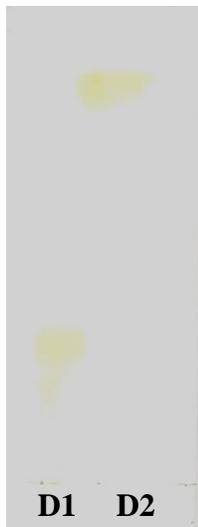


Figura 14. Cromatografía en capa fina de los compuestos D1 y fracción D2. Fase móvil 2.1.6.1.1. Revelador 2.1.6.2.3.

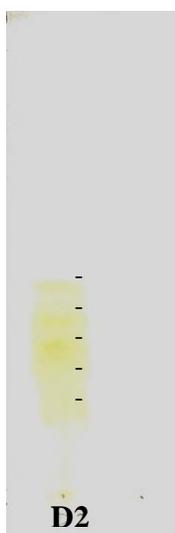


Figura 15. Cromatografía en capa fina de la fracción D2. Fase móvil 2.1.6.1.3. Revelador 2.1.6.2.3.

3.12 Análisis por HPLC de los compuestos aislados.

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas de HPLC para el extracto de AcOEt de corteza de *Juglans mollis* (figura 16), el compuesto N1 (figura 17) y el compuesto N2 (figura 18). Para ello se utilizó una columna de fase inversa Chromolith C18e y el sistema indicado en 2.1.7.1.

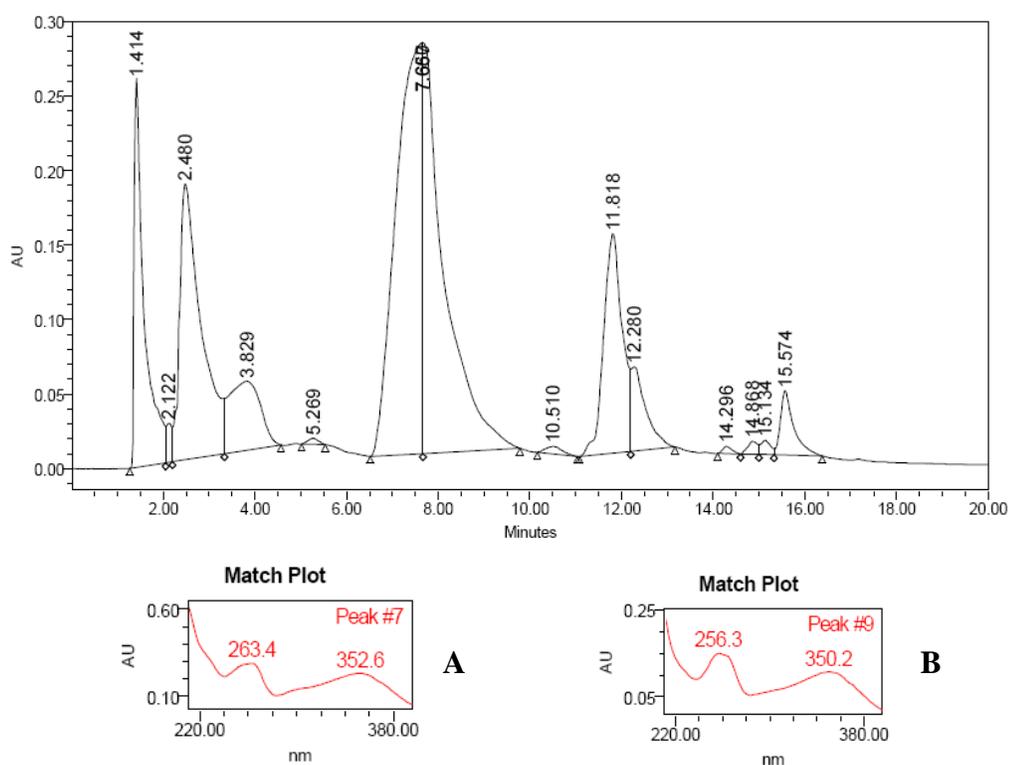


Figura 16. Cromatograma del extracto de AcOEt de *J. mollis*. A=Espectro de absorción UV-Vis del compuesto N1, t_R 7.66 min. B=Espectro de absorción UV-Vis del compuesto N2, t_R 11.81 min. Condiciones de elución 2.1.7.1.

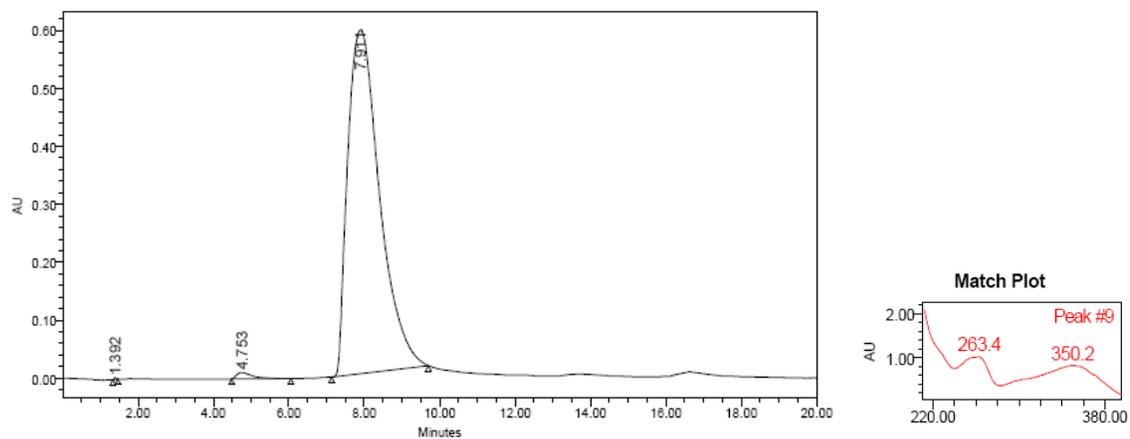


Figura 17. Cromatograma del compuesto N1 de *J. mollis* y espectro de absorción UV-Vis, t_R 7.91 min. Condiciones de elución 2.1.7.1.

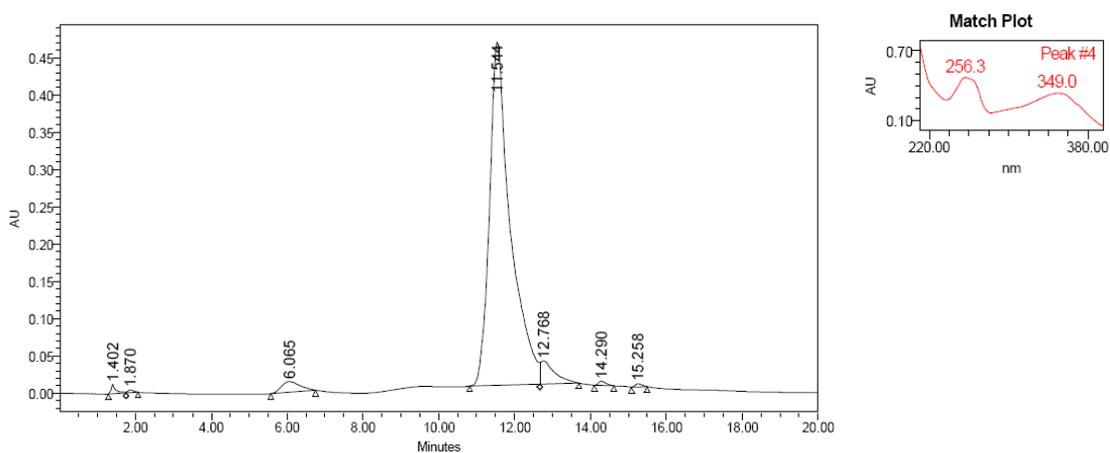


Figura 18. Cromatograma del compuesto N2 de *J. mollis* y espectro de absorción UV-Vis, t_R 11.54 min. Condiciones de elución 2.1.7.1.

3.13 Análisis por RMN de los compuestos asilados.

Se obtuvieron espectros de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ y DEPT, y espectros de doble dimensión COSY, HMQC y HMBC para el compuesto N1, todos en MeOD (figuras 19-24). Además se obtuvo un espectro de $^1\text{HRMN}$ en DMSO (figura 25).

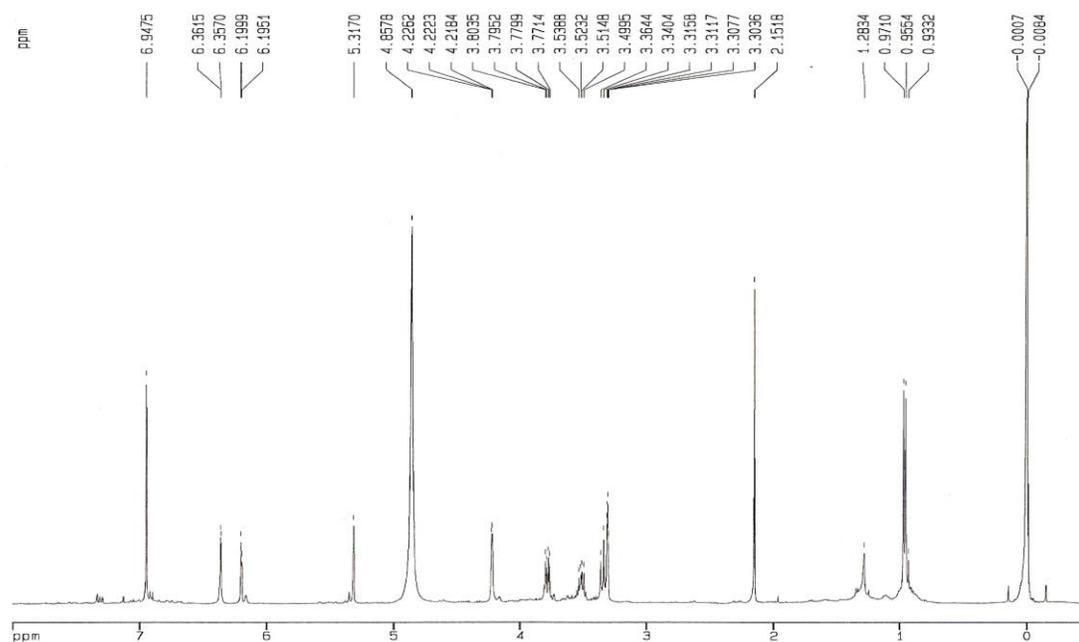


Figura 19. Espectro $^1\text{HRMN}$ del compuesto N1 en MeOD.

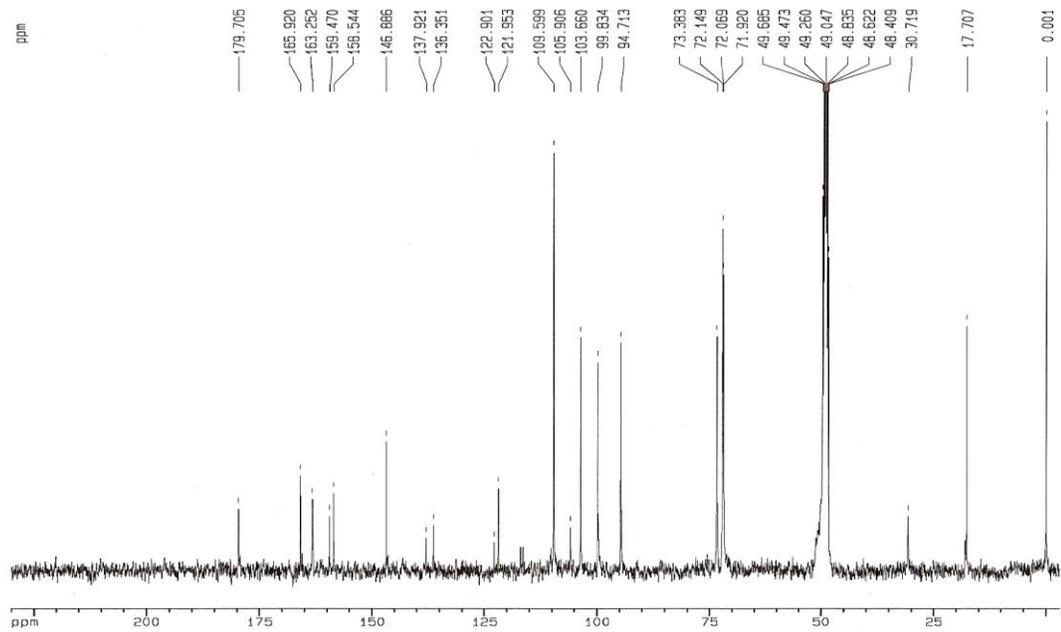


Figura 20. Espectro ^{13}C RMN del compuesto N1 en MeOD.

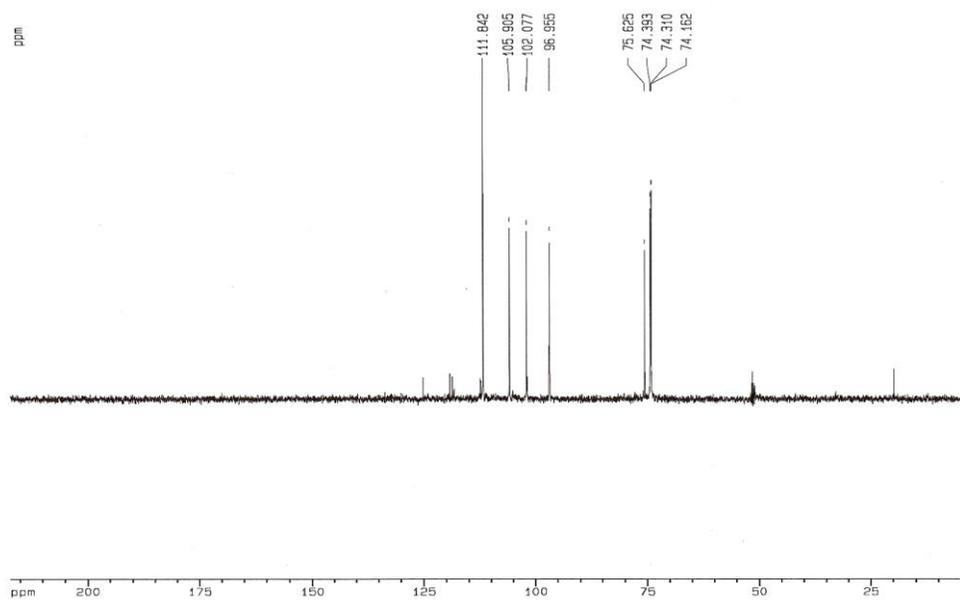


Figura 21. Espectro DEPT-90 del compuesto N1 en MeOD.

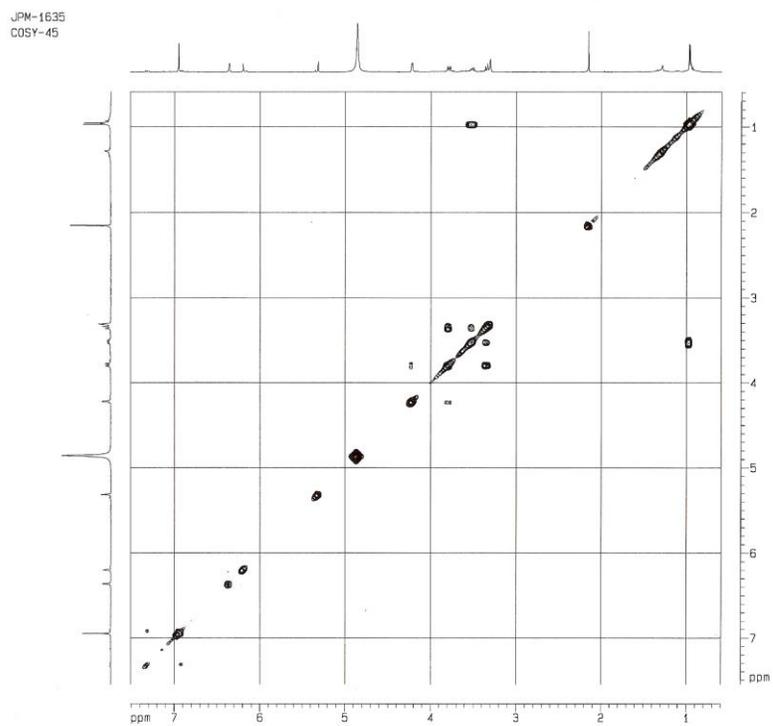


Figura 22. Espectro COSY del compuesto N1 en MeOD.

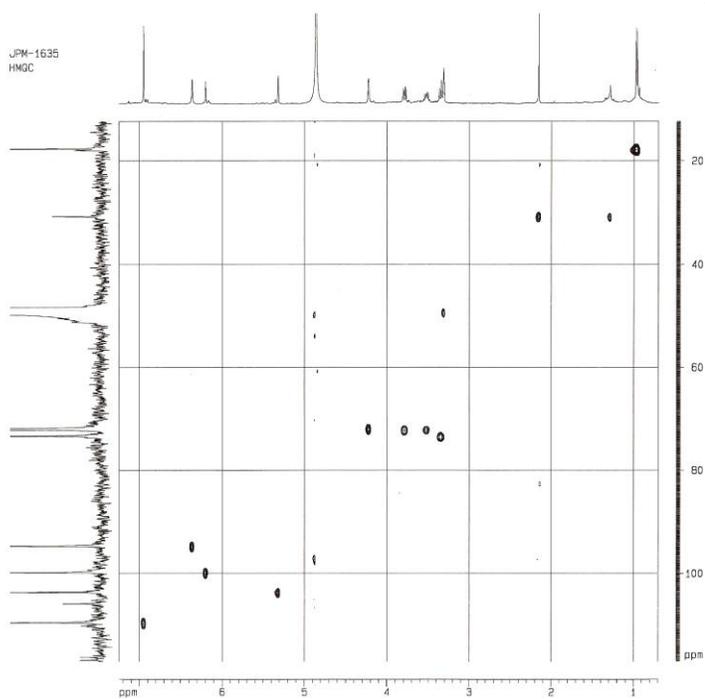


Figura 23. Espectro HMQC del compuesto N1 en MeOD.

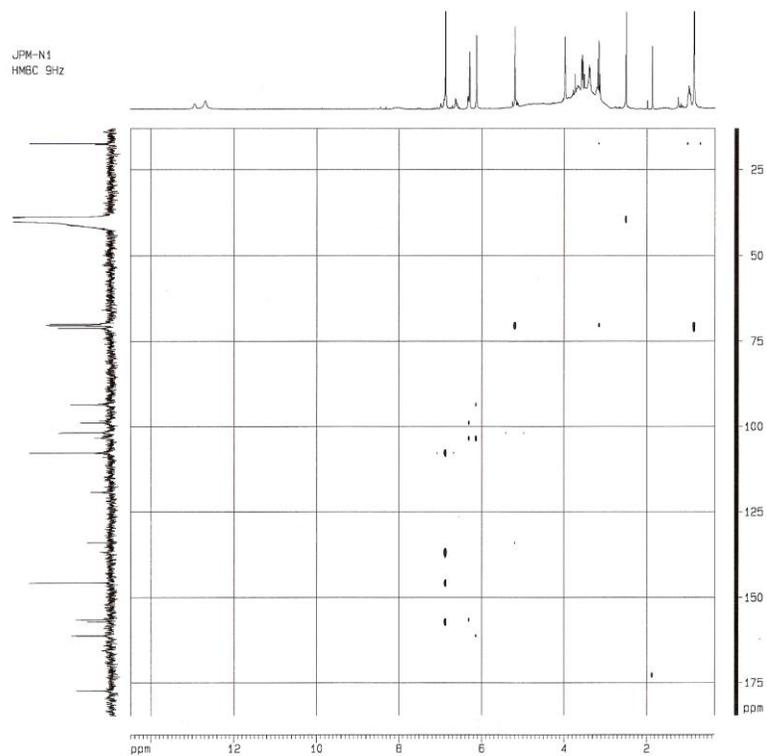


Figura 24. Espectro HMBC del compuesto N1 en DMSO

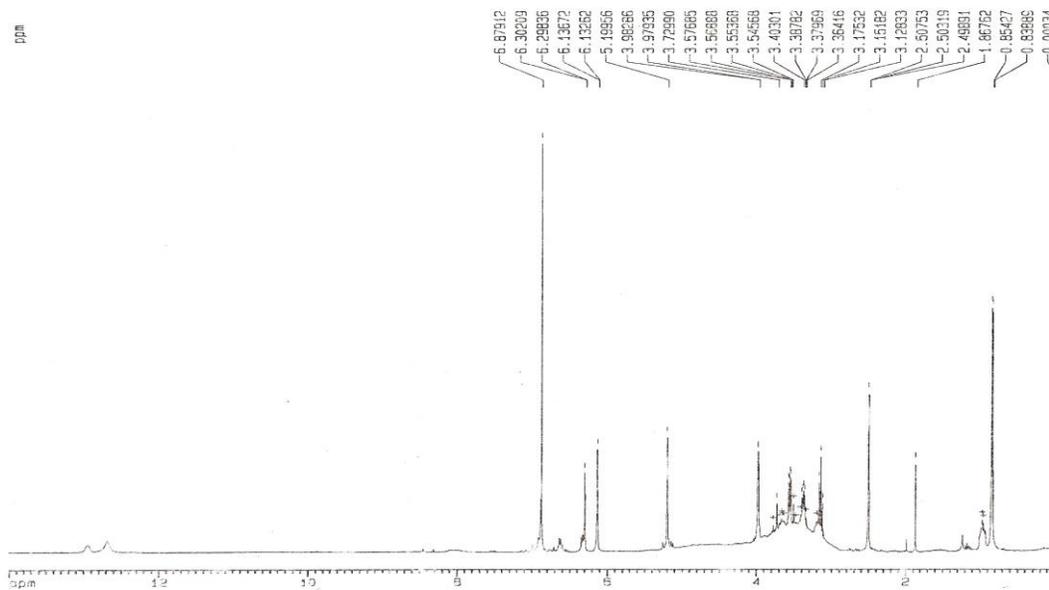


Figura 25. Espectro ^1H RMN del compuesto N1 en DMSO.

Se obtuvieron espectros de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ y DEPT, y espectros de doble dimensión COSY, HMQC y HMBC para el compuesto N2, todos en MeOD (figuras 26-31).

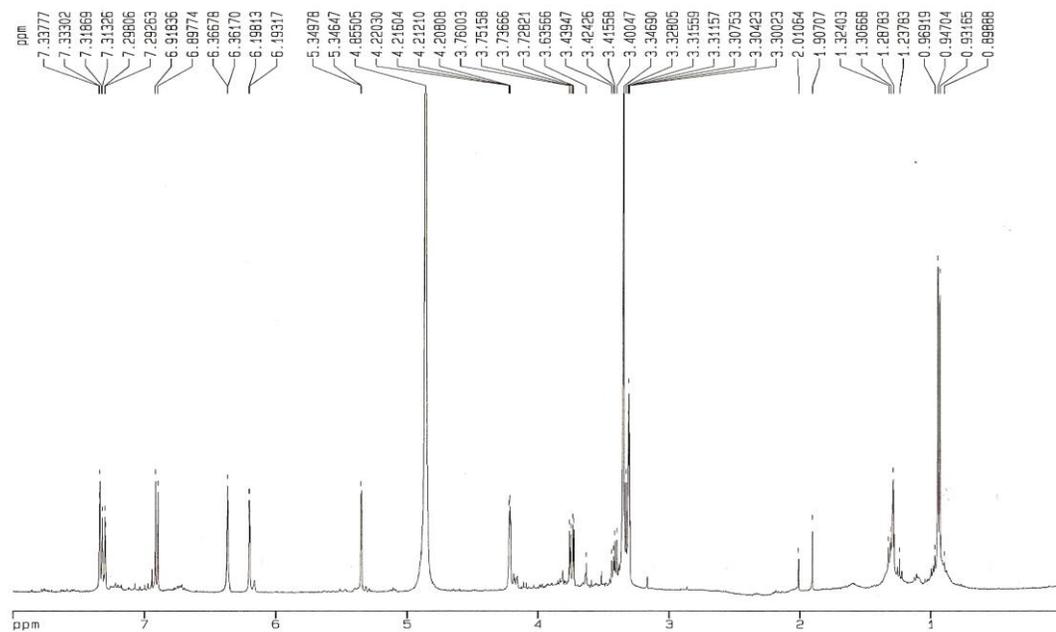


Figura 26. Espectro $^1\text{HRMN}$ del compuesto N2 en MeOD.

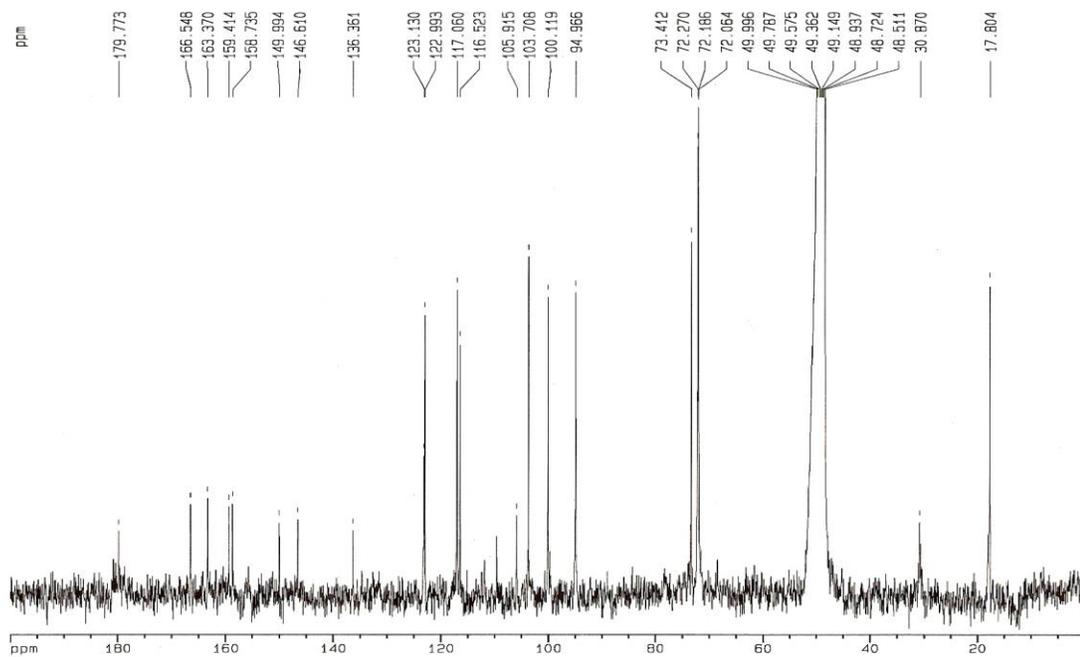


Figura 27. Espectro ^{13}C RMN del compuesto N2 en MeOD.

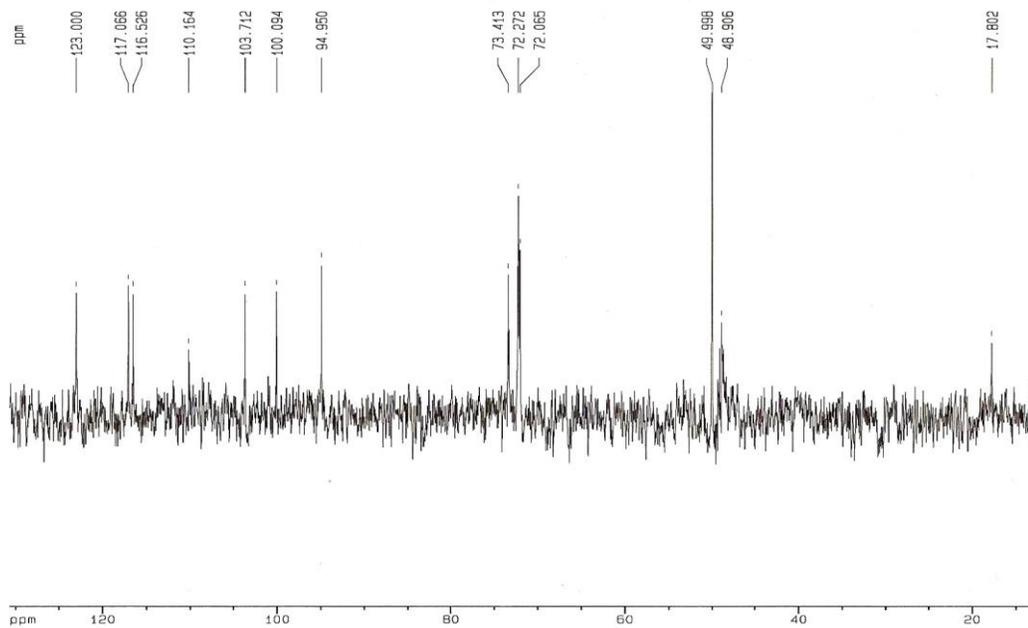


Figura 28. Espectro DEPT-135 del compuesto N2 en MeOD.

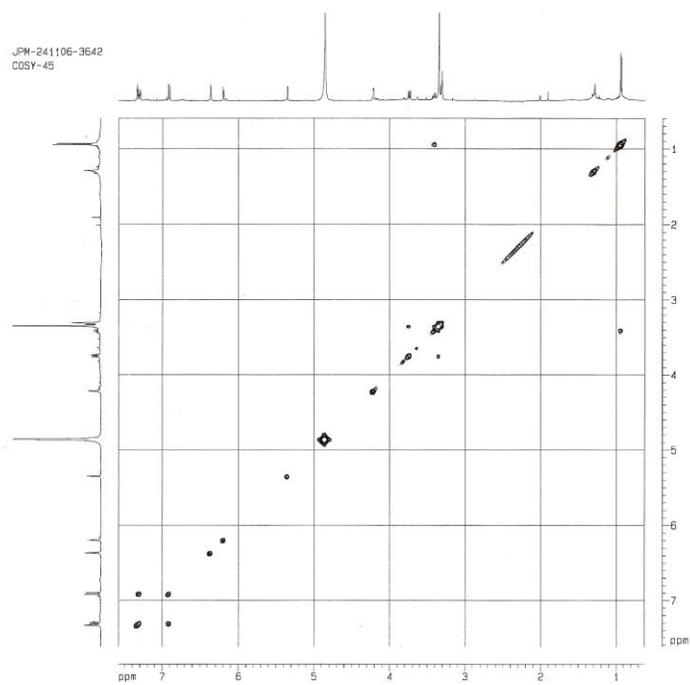


Figura 29. Espectro COSY del compuesto N2 en MeOD.

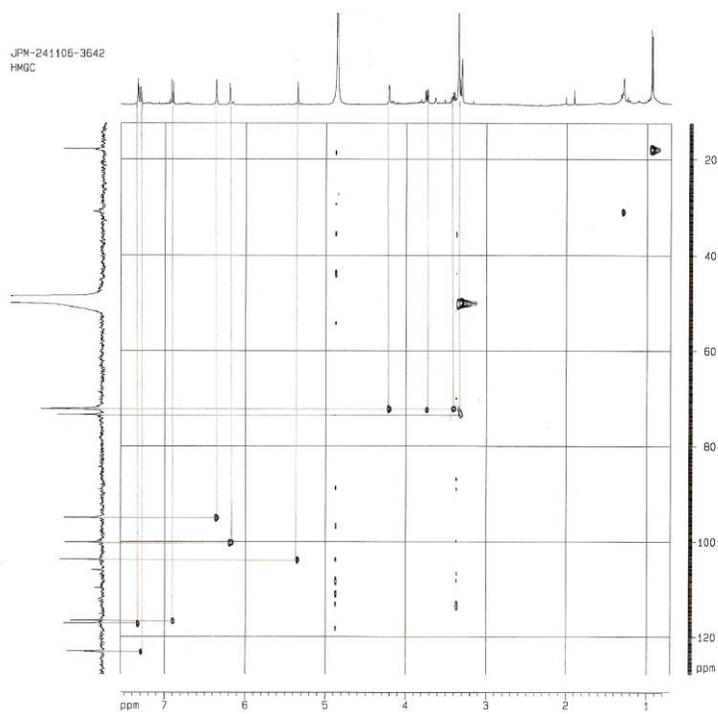


Figura 30. Espectro HMBC del compuesto N2 en MeOD.

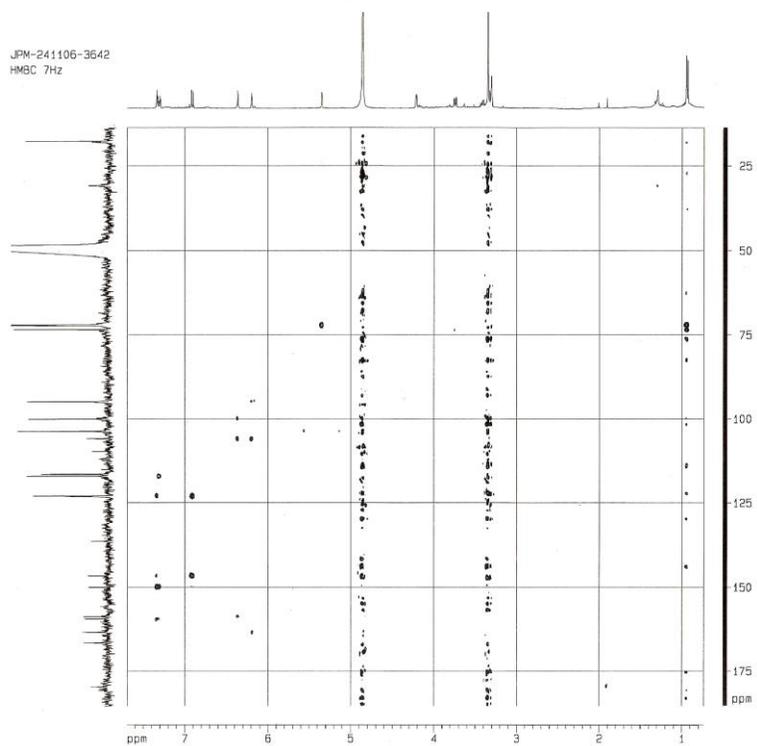


Figura 31. Espectro HMBC del compuesto N2 en MeOD.

Se obtuvieron espectros de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ y DEPT, y espectros de doble dimensión COSY, HMBC y HMQC para el compuesto D1, todos en MeOD (figuras 32-37). Se obtuvieron además espectros NOE en MeOD (tabla 11) y $^1\text{HRMN}$ en DMSO (figura 38).

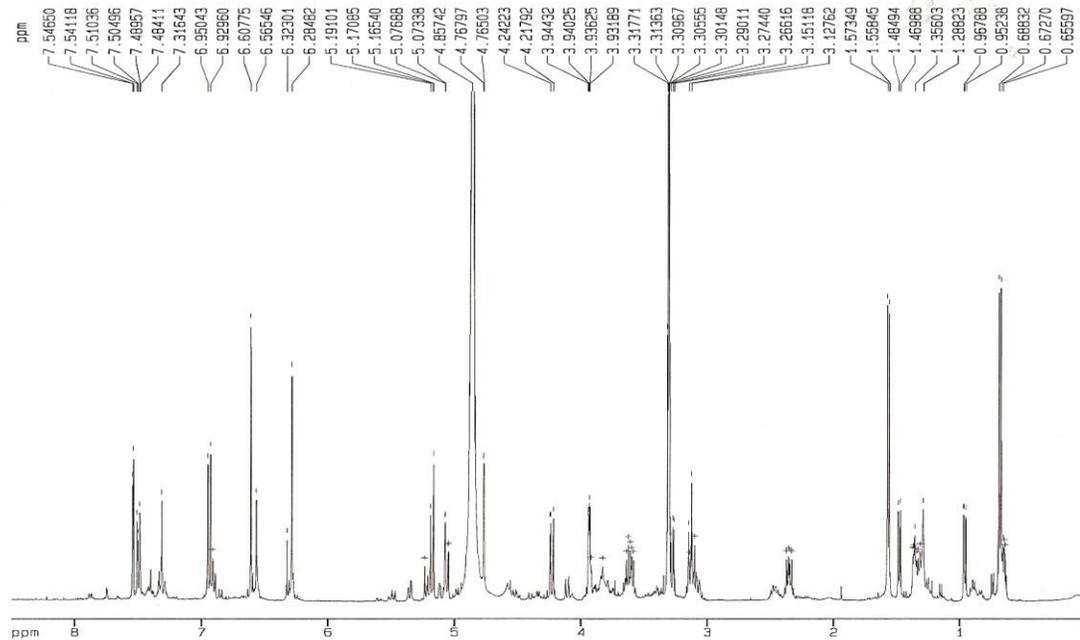


Figura 32. Espectro ^1H RMN del compuesto D1 en MeOD.

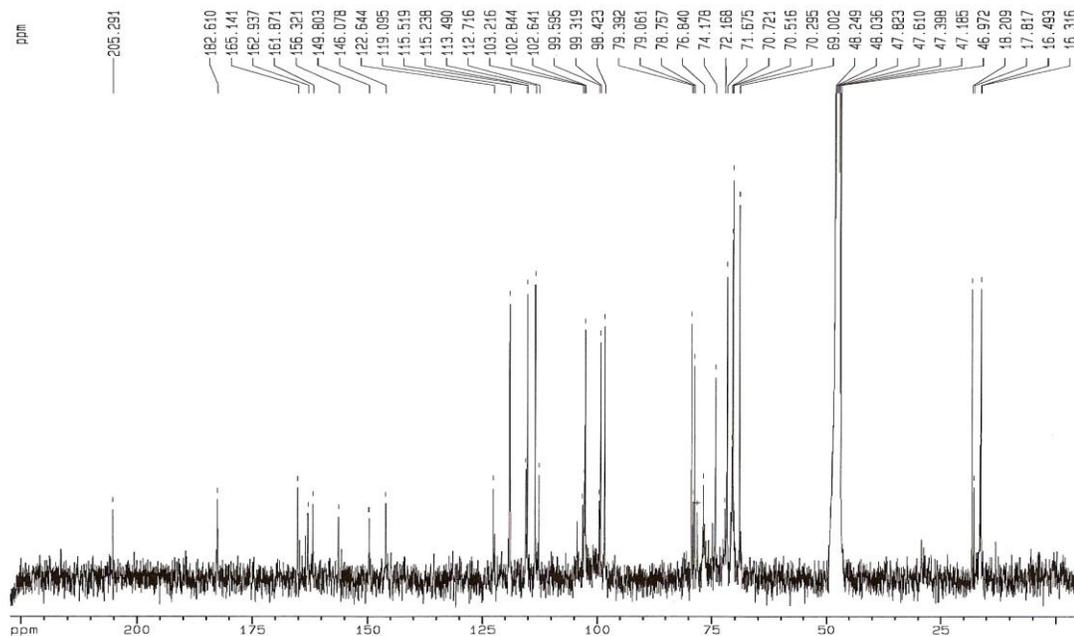


Figura 33. Espectro ^{13}C RMN del compuesto D1 en MeOD.

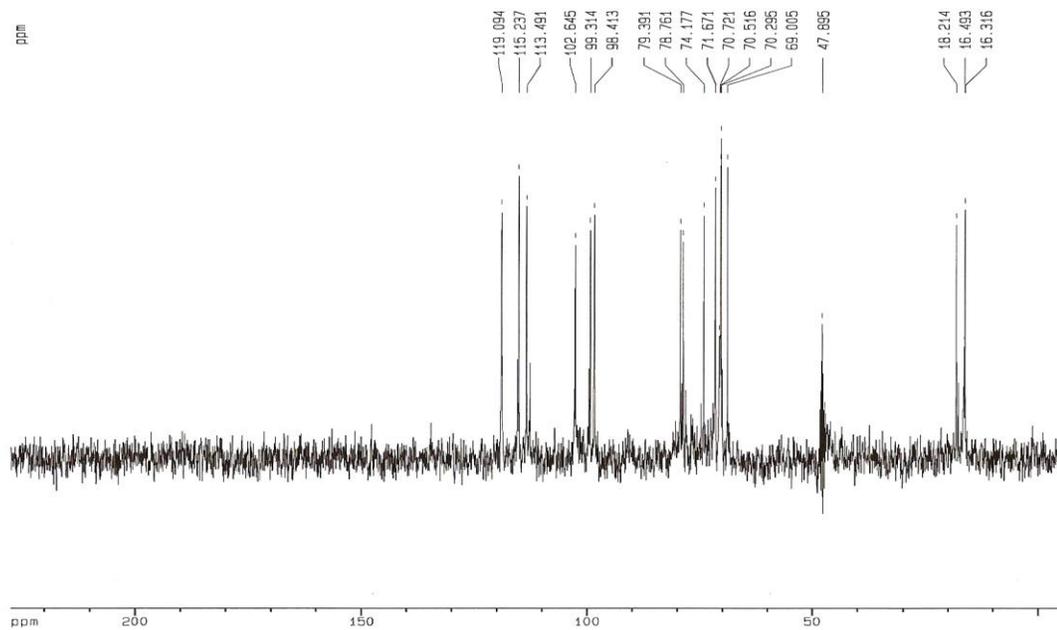


Figura 34. Espectro DEPT-135 de D1 en MeOD.

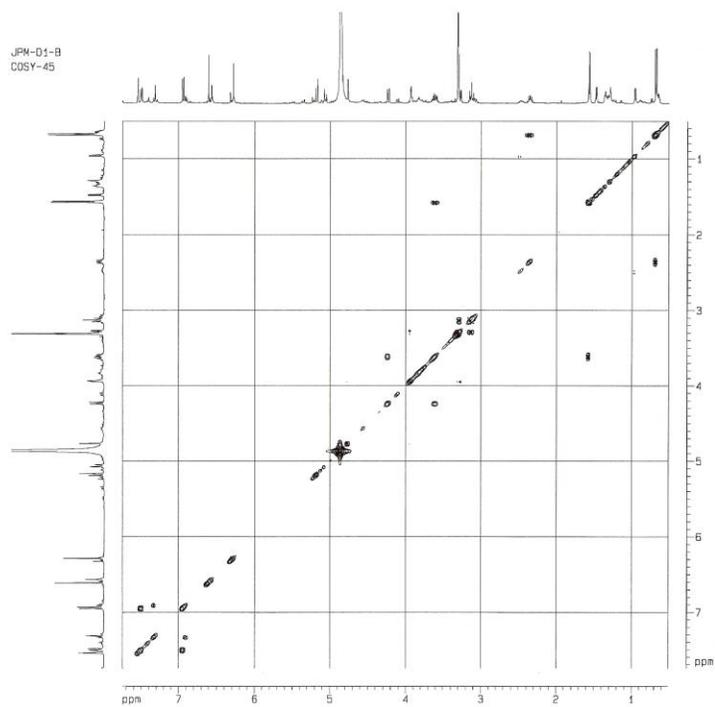


Figura 35. Espectro COSY de D1 en MeOD.

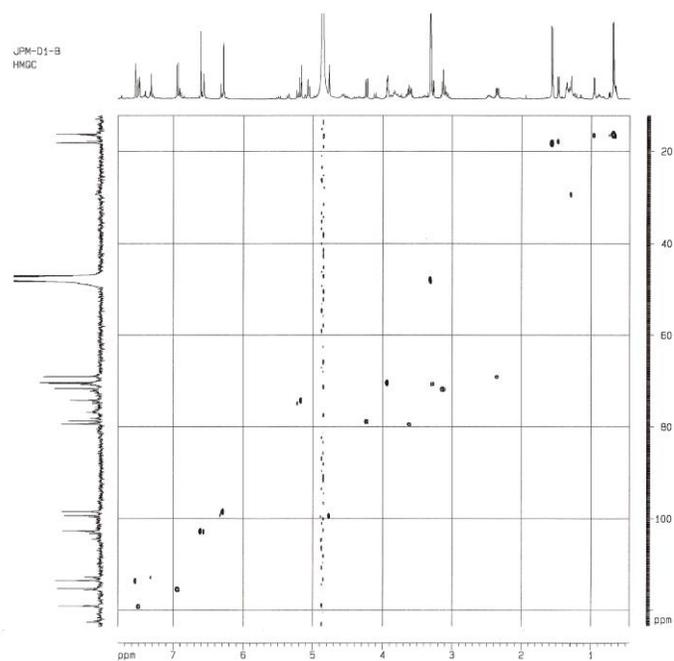


Figura 36. Espectro HMQC de D1 en MeOD.

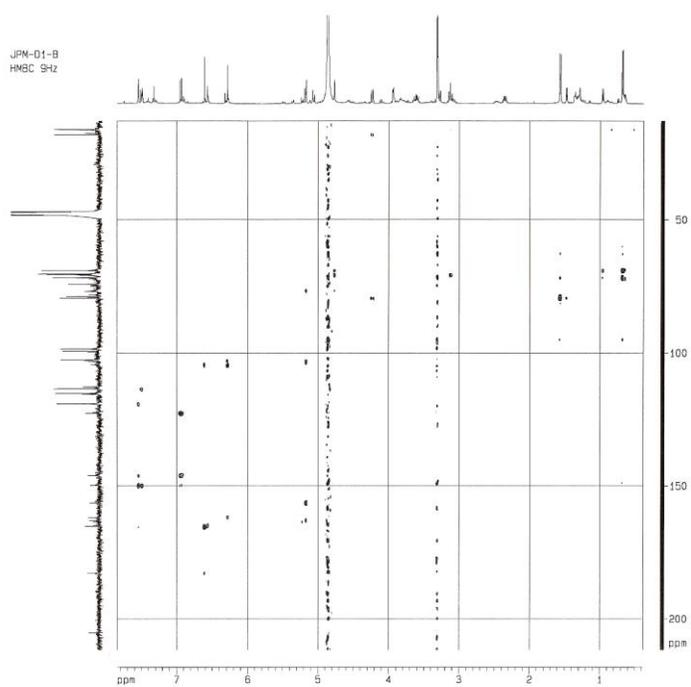


Figura 37. Espectro HMBC de D1 en MeOD.

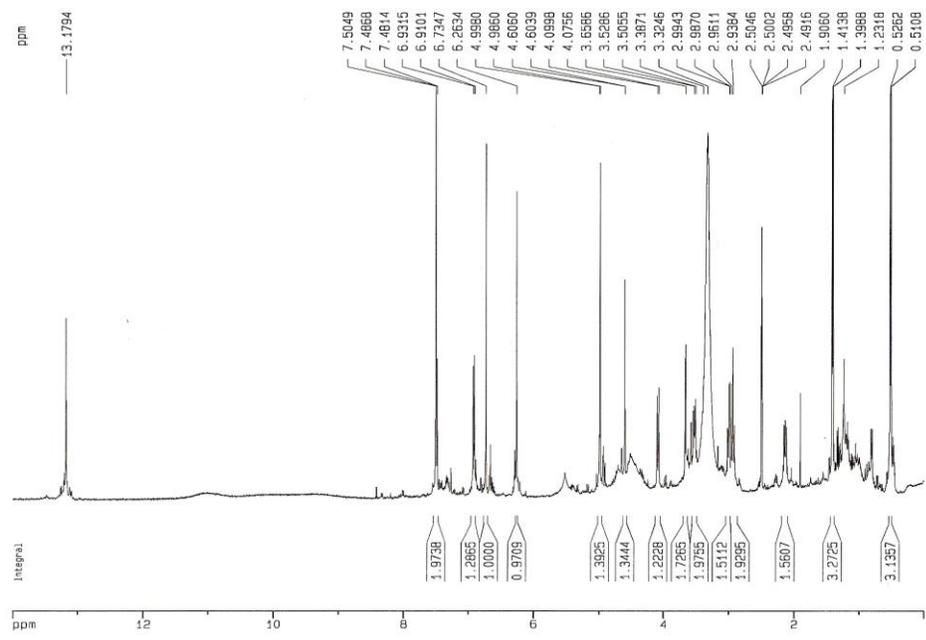


Figura 38. Espectro ¹HRMN del compuesto D1 en DMSO.

Tabla 11. Correlaciones NOE del compuesto D1.

Señal radiada	NOE
6.61 ppm	Con 7.55, 7.5, 7.31
6.28 ppm	Con nada
5.18 ppm	Con 3.62
5.06 ppm	Con 4.76*, 4.23*, 7.55**
4.76 ppm	Con 5.06, 3.93
4.23 ppm	Con 7.55, 5.06, 1.57
3.93 ppm	Con 4.76, 3.27
3.62 ppm	Con 5.18, 1.57*
3.27 ppm	Con 3.93, 2.35*
3.12 ppm	Con 2.35, 0.67*
2.35 ppm	Con 3.27, 3.13, 0.67
1.57 ppm	Con 3.62, 4.23, 7.55**
0.67 ppm	Con 2.35, 3.12

* poco, ** muy poco

3.14 Cuantificación de la actividad antioxidante de los compuestos aislados mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis y DPPH.

Se calcularon los porcentajes de reducción para distintas concentraciones de cada compuesto aislado, fracción D2 y controles propuestos. Los ensayos y cálculos de porcentaje de reducción se hicieron por triplicado (Apéndice A).

Se obtuvieron los promedios de los porcentajes de reducción de cada muestra probada (tabla 12) y se graficaron en conjunto (figura 39).

Tabla 12. Promedios de porcentajes de reducción de DPPH para los compuestos puros, fracción D2 y controles.

$\mu\text{g/mL}$	N1	N2	D1	D2	Q	R	BHT
10.0	79.5 \pm 0.91	76.1 \pm 1.35	80.6 \pm 0.94	55.9 \pm 0.86	82.8 \pm 0.57	78.3 \pm 0.25	53.4 \pm 1.49
5.0	56.3 \pm 0.50	52.3 \pm 0.60	50.3 \pm 0.17	34.2 \pm 1.81	82.0 \pm 0.49	43.3 \pm 0.07	37.3 \pm 1.79
2.5	30.1 \pm 0.21	29.1 \pm 2.34	26.1 \pm 0.26	14.8 \pm 0.23	64.5 \pm 0.53	25.1 \pm 0.84	24.3 \pm 0.68
0.6	16.7 \pm 0.71	15.7 \pm 0.85	21.7 \pm 0.91	11.0 \pm 1.59	31.9 \pm 0.88	11.2 \pm 0.54	13.5 \pm 0.43
0.3	8.3 \pm 1.11	13.8 \pm 0.43	7.1 \pm 1.68	8.5 \pm 0.93	17.1 \pm 1.70	6.8 \pm 0.03	11.5 \pm 0.39
0.1	5.9 \pm 0.71	10.8 \pm 0.56	3.9 \pm 0.32	5.3 \pm 0.18	7.0 \pm 0.64	4.6 \pm 0.22	4.7 \pm 0.55

Q=quercetina, R=rutina, BHT=hidroxitolueno butilado.

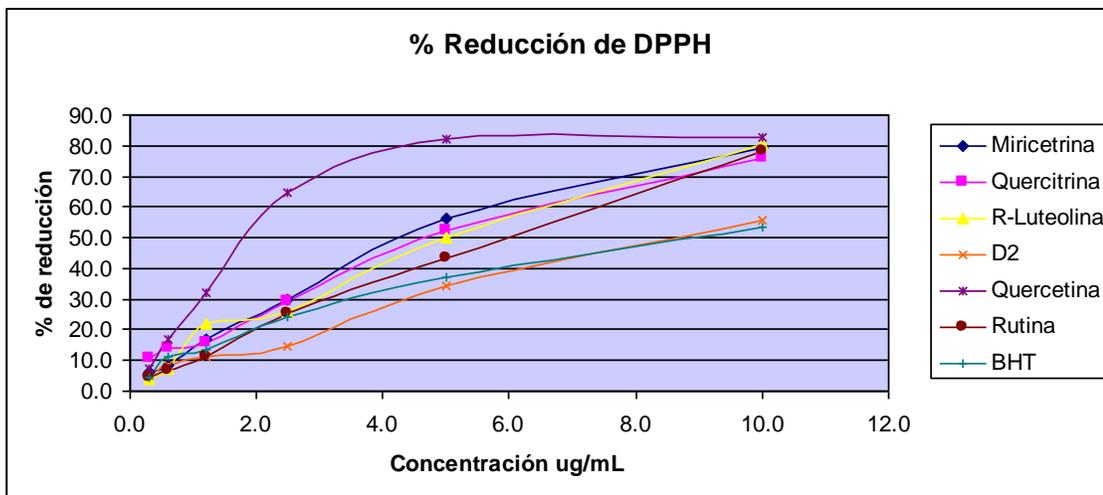


Figura 39. Porcentaje de reducción de DPPH para los compuestos puros, fracción D2 y controles.

Se calculó el porcentaje de reducción 50 o concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para cada ensayo triplicado para cada sustancia probada, para ello se tomaron los puntos alrededor de la CI_{50} y mediante la ecuación de la recta, se obtuvo la media de los valores de CI_{50} y su desviación estándar para cada compuesto, fracción y control probado (tabla 13). Los valores de CI_{50} se calcularon en $\mu\text{g/mL}$ y en concentración molar, excepto para la fracción D2, por no ser un compuesto puro.

Tabla 13. CI_{50} de los compuestos aislados, la fracción D2 y controles.

Antioxidante	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	CI_{50} μM
Miricetrina	5.38 ± 0.09	11.59 ± 0.18
Quercitrina	5.62 ± 0.06	12.55 ± 0.12
RO-Luteolina	5.56 ± 0.02	9.62 ± 0.04
D2	10.17 ± 0.11	NC
Quercetina	2.35 ± 0.03	7.77 ± 0.11
Rutina	6.04 ± 0.02	9.90 ± 0.03
BHT	8.67 ± 0.34	39.34 ± 1.56

NC=no calculado.

3.15 Determinación de la actividad inmunomoduladora de los compuestos aislados, en base a la proliferación de células mononucleares de bazo de ratón Balb/c

Se obtuvieron las cuentas por minuto para cada ensayo realizado por triplicado, para las fracciones y compuestos aislados de *Juglans mollis*. Se calculó el promedio de los triplicados y el índice de proliferación (tabla 14).

Tabla 14. Promedios de cuentas por minuto e índices de proliferación.

<i>Muestra</i>	<i>Cuentas con PHA</i>	<i>Cuentas sin PHA</i>	<i>Índice de estimulación</i>
Células control	10447.5±12.4	2681.5±3.5	3.90
DMSO 5%	13456.6±8.3	4072.0±9.8	3.30
Fracción 1 – 500µg	230711.0±115.2	367.5±0.4	627.79
Fracción 1 – 50µg	327.0±0.8	254.0±0.7	1.29
Fracción 1 – 10µg	452.3±0.3	387.4±1.4	1.17
Fracción 1 – 1µg	3809.0±1.2	775.0±2.8	4.91
Fracción 2 – 500µg	348363.5±128.6	364.6±10.5	955.47
Fracción 2 – 50µg	244.0±0.3	661.5±11.6	0.37
Fracción 2 – 10µg	230.0±0.2	2558.0±34.5	0.09
Fracción 2 – 1µg	1145.0±1.9	2823.0±5.8	0.41
Fracción 3 – 500µg	130233.6±48.3	214.0±2.8	608.57
Fracción 3 – 50µg	856.0±0.9	362.0±2.1	2.36
Fracción 3 – 10µg	1945.5±0.9	283.0±0.7	6.87
Fracción 3 – 1µg	1874.5±1.3	2666.3±1.8	0.70
Fracción 4 – 500µg	57982.0±10.4	278.0±0.9	208.57
Fracción 4 – 50µg	3379.0±5.3	563.3±0.9	6.00
Fracción 4 – 10µg	586.6±1.6	1293.0±3.8	0.45
Fracción 4 – 1µg	708.0±1.1	4429.0±15.8	0.16
N1 – 500µg	901.5±0.9	1767.0±13.5	0.51
N1 – 50µg	3480.0±2.5	416.5±2.8	8.36
N1 – 10µg	2861.0±6.5	1863.3±16.3	1.54
N1 – 1µg	8331.5±27.9	5407.3±56.2	1.54
N2 – 50µg	392.5±12.5	3905.0±15.9	0.10
N2 – 10µg	1256.0±54.7	511.0±4.5	2.46
N2 – 1µg	3297.5±38.6	2780.0±38.7	1.19
N3 – 50µg	2669.3±32.6	933.0±27.3	2.86
N3 – 10µg	2940.5±31.7	295.0±1.5	9.97
N3 – 1µg	3933.3±45.8	1175.0±17.8	3.35

3.16 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos aislados.

Se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular para cada ensayo por triplicado, mediante cuenta visual de células vivas por cada cien. Se calculó la media y la desviación estándar para cada ensayo (tabla 15).

Tabla 15. Porcentajes de viabilidad celular.

	500mg	50mg	10mg	1mg
Fracción 1	95.0 \pm 0.0%	98.3 \pm 2.8%	98.3 \pm 2.8%	98.3 \pm 2.0%
Fracción 2	98.3 \pm 2.8%	100 \pm 0.0%	98.3 \pm 2.8%	100 \pm 0.0%
Fracción 3	95.0 \pm 0.0%	98.3 \pm 2.8%	98.3 \pm 2.8%	98.3 \pm 2.8%
Fracción 4	95.0 \pm 0.0%	98.3 \pm 2.8%	100 \pm 0.0%	100 \pm 0.0%
N1	93.3 \pm 2.8%	95.0 \pm 0.0%	98.3 \pm 2.8%	98.3 \pm 2.8%
N2	NP	98.3 \pm 2.8%	98.3 \pm 2.8%	100 \pm 0.0%
N3	NP	100 \pm 0.0%	100 \pm 2.8%	100 \pm 0.0%

NP= no probado. % Viabilidad celular para control de DMSO 5% = 98.3 \pm 2.8%.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En base a un reporte reciente del estudio de actividad antioxidante de extractos obtenidos de 15 plantas de la región noreste de México (Pozos, 2005), para el presente trabajo se seleccionaron las dos especies que presentaron mayor actividad antioxidante en los ensayos de captura de radicales libres utilizando DPPH, cuantificación de fenoles totales e inhibición de la enzima xantina oxidasa. Estas especies fueron *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*.

Juglans mollis es una juglandácea que según reportes etnofarmacológicos, su parte aérea es utilizada para favorecer la cicatrización de laceraciones y quemaduras, así también, para disminuir la inflamación de diversas heridas y golpes. La cáscara del fruto es utilizada para aliviar el prurito y salpullido, y su corteza es utilizada en infusiones como tónico general (Adame, 2000).

Turnera diffusa, es un arbusto de las turneráceas que ha sido utilizado como afrodisíaco, conceptivo, antidepresivo y antianémico. Otros usos que se han reportado para esta especie, son: como diurético, para disminuir el malestar menstrual y los

problemas de próstata, como tónico general y cerebral, y para contrarrestar el agotamiento físico e intelectual (Alcaraz y cols., 2004).

El objeto de utilizar las especies mencionadas, es encontrar compuestos antioxidantes cuya presencia justifique el efecto al que refiere la etnofarmacología, en cuanto al uso tradicional que se les ha venido dando (Adame y cols., 2000). Así también, comprobar si los compuestos antioxidantes aislados tuvieran un efecto inmunomodulador y establecer, si así fuera, una relación entre la especie estudiada y el tipo de afecciones de carácter inmunológico para las que se reporta su uso.

En la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de plantas, es importante la selección de un solvente adecuado para realizar la extracción primaria. En este estudio se utilizó metanol como solvente de extracción para los extractos primarios, ya que se buscaba obtener la mayor cantidad de compuestos posibles para cada parte de las plantas trabajadas. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron de 5.40 % a 18.45 %, similares a los reportados en el trabajo en el cuál se basó este estudio (Pozos, 2005), donde se utilizó etanol 90% para obtener los extractos primarios.

Para la determinación cualitativa de actividad antioxidante de los extractos primarios, se probaron los extractos obtenidos a una misma concentración con la solución del radical libre DPPH. Este radical presenta un color violeta que se decolora hasta amarillo en presencia de sustancias antioxidantes, debido a la reducción del radical DPPH, de tal manera, que en el análisis de cromatografía en capa fina los

compuestos activos se presentan como manchas amarillas en un fondo violeta. En la CCF donde se analizaron los extractos primarios de ambas especies (figura 4), se observó con respecto a *Turnera diffusa*, una mayor cantidad de componentes activos en el extracto de la mezcla hoja/tallo que en el extracto de hoja. En el extracto de raíz casi no se observó la presencia de componentes activos. En cuanto a *Juglans mollis*, el extracto de corteza mostró mayor cantidad de componentes activos que el extracto de hoja.

Para la determinación cuantitativa de la actividad antioxidante, se evaluó por espectroscopía de UV-Vis el porcentaje de reducción del radical DPPH por parte de los extractos; en este caso, la absorbancia de las soluciones obtenidas después de la reacción es inversamente proporcional al porcentaje de reducción. Los resultados indicaron que en el caso de *Turnera diffusa*, la mayor actividad la tuvieron el extracto de hoja/tallo y el de raíz, mientras que para *Juglans mollis*, tanto el extracto de corteza como el de hoja tuvieron actividad similar (72.34 y 78.78 % respectivamente) (tabla 5). En base a estos resultados se decidió que la actividad citotóxica e inmunomoduladora se probaría en los extractos de hoja y corteza de *Juglans mollis*, y en los extractos de la parte aérea de *Turnera diffusa*.

En el ensayo de citotoxicidad, las células vivas presentaban una refringencia en el invertoscopio, mientras que las células muertas solo se observaban teñidas y opacas debido al rompimiento de sus membranas. Los porcentajes de viabilidad celular fueron

de 90 a 100 % en las cuentas individuales (tabla 6), lo que indicó que para todas las cantidades probadas en el ensayo, ningún extracto resultó ser citotóxico.

En base a los resultados de citotoxicidad, se decidió utilizar las mismas cantidades de los extractos para llevar a cabo el estudio de inmunomodulación y garantizar que las células se mantuvieran viables durante el ensayo. Este experimento permite determinar la proliferación celular de manera indirecta, midiendo la radiactividad generada por la ^3H -timidina incorporada por las células durante la mitosis, que puede ser espontánea o inducida (mediante el mitógeno PHA). En los resultados se observó que el extracto de corteza de *Juglans mollis* en cantidades de 500 μg , presenta un índice de estimulación por encima del control positivo de células con PHA, lo que nos indica que a este nivel, el extracto se comporta como mitógeno (tabla 7). Por otra parte, los índices de estimulación para los extractos de la parte aérea de *Turnera diffusa* fueron similares al control de células sin estímulo, lo que indica que estos extractos no inducen una actividad positiva ni negativa en la proliferación celular espontánea o no inducida.

En base a los resultados cualitativos y cuantitativos de actividad antioxidante, se continuó trabajando con los extractos de la parte aérea de *Turnera diffusa* y los extractos de corteza y hoja de *Juglans mollis* para la obtención de extractos diferenciales por extracción líquido-líquido con hexano, acetato de etilo y butanol. Los porcentajes de recuperación para estos extractos variaron en un rango de 10.37 % a

47.50 % (tabla 9). No se observó una relación entre el porcentaje de recuperación y la especie o parte utilizada.

En la determinación cualitativa de actividad antioxidante de los extractos diferenciales, se observó una mayor cantidad de componentes con actividad en los extractos de acetato de etilo y butanol de hoja/tallo de *Turnera diffusa* y en los extractos de acetato de etilo y butanol de corteza de *Juglans mollis* (figura 5).

En el estudio cuantitativo de actividad antioxidante, los porcentajes de reducción más altos se observaron en los extractos de acetato de etilo y butanol de *Turnera diffusa* (95.86 % y 93.55 % respectivamente) y en el extracto de acetato de etilo de *Juglans mollis* (93.42 %) (Tabla 10). Lo anterior se correlaciona con los resultados del ensayo cualitativo por CCF. Por lo tanto se decidió continuar la parte del aislamiento biodirigido con los extractos de la parte aérea de *Turnera diffusa* y el extracto de acetato de etilo de *Juglans mollis*.

A partir del extracto de acetato de etilo de corteza de *Juglans mollis* se obtuvieron cuatro fracciones mediante cromatografía en columna de sílica gel, eluídas con hexano:AcOEt, AcOEt, AcOEt:MeOH y MeOH, denominadas F1, F2, F3 y F4 respectivamente. El análisis de estas fracciones por CCF mostró que la fracción F3 contenía la mayor cantidad de compuestos con actividad antioxidante (figura 6), por lo que se decidió continuar el aislamiento con esta fracción.

Se consideró purificar la fracción F3 por medio de una columna de fase inversa de baja presión. Se probaron diferentes sistemas de elución, se comenzó primero con MeOH:Agua (20:80) hasta llegar a MeOH 100% con intervalos de incremento de 10% con respecto al MeOH. El sistema de solventes que presentó mejores resultados fue MeOH acuoso (40-100 %) incrementado en intervalos de 10 %. Mediante este sistema se obtuvieron 70 fracciones a partir de la fracción F3. Estas fracciones fueron analizadas por CCF y se juntaron las que resultaron similares, para dar origen a seis fracciones principales (figura 8). Una de estas fracciones mostró dos componentes principales y activos frente al DPPH. A esta fracción se le nombró F3' y se utilizó para continuar con la purificación.

La fracción F3' fue pasada a través de una columna de fase inversa de baja presión Lobar RP-18, se probaron distintas proporciones de MeOH acuoso para la elución. El sistema que dio mejores resultados fue MeOH acuoso (30-50%). Mediante este sistema, se obtuvieron dos compuestos puros denominados N1 y N2, a partir de la fracción F3'. Mediante el análisis cualitativo por CCF, se observó que ambos compuestos fueron activos frente al DPPH. Además, en el análisis de CCF revelada con NPR/PEG los compuestos presentaron una pigmentación amarillo-naranja indicativa de compuestos polifenólicos de tipo flavonoide (figura 10).

Un tercer compuesto fue aislado de la fracción F3', al que se nombró N3. El compuesto presentó actividad antioxidante frente al DPPH en el análisis cualitativo por CCF. Por otro lado, no presentó pigmentación característica de compuesto polifenólico

al revelarse con NPR/PEG. Cabe mencionar que durante la purificación de este compuesto, se tuvieron pérdidas significativas del mismo debido a que se degradaba con facilidad, al precipitar en color oscuro y perder su actividad antioxidante.

El extracto metanólico de *Turnera diffusa* fue extraído con hexano para descartar la fracción no activa frente al DPPH. La fracción soluble en metanol fue pasada por una columna de sílica gel tipo VLC con un sistema de solventes de menor a mayor polaridad. Se obtuvieron cuatro fracciones de composición muy similar, y en donde además se observó la presencia de clorofila en todas ellas. Se decidió entonces realizar una extracción en fase sólida con un cartucho de fase inversa de octadecilsilano con un gradiente de elución de MeOH acuoso 50, 70 y 100 %. Según lo observado en el análisis de CCF en UV 254 nm, las clorofilas se extrajeron en la fracción de MeOH 100%, y el resto de los componentes eluyeron inicialmente en la fracción de MeOH acuoso 50 % (denominada F50). Esta es la fracción con la que se decidió continuar con el aislamiento (figura 11). La fracción 50 fue pasada por una columna de sílica gel tipo VLC con el mismo sistema de solventes anteriormente usado. En esta ocasión, se obtuvieron cuatro fracciones de distinta composición, en base al análisis de CCF revelada con DPPH; la fracción donde se tenía mayor cantidad de compuestos antioxidantes fue la fracción F3, por lo que se continuó trabajando con ésta. La fracción F3 fue pasada por una columna de fase inversa de baja presión con un gradiente de elución de MeOH acuoso (20 % - 100 %). Con este sistema cromatográfico se obtuvieron 80 fracciones que a su vez fueron analizadas y agrupadas de acuerdo a su composición en diez nuevas fracciones. Dos de estas fracciones resultaron de interés

para continuar con el aislamiento de compuestos, a las que se les denominó F3' y F3''. La fracción F3' fue pasada a través de una columna de fase inversa de baja presión con un gradiente de MeOH acuoso (30 % - 100 %). Se tomó la fracción donde se encontraba el compuesto de interés, y éste fue purificado con tres columnas sucesivas de fase inversa mediante un gradiente de MeOH acuoso (40 % - 80 %) donde se incrementaba en intervalos de 10 % el MeOH. De esta manera se purificó el compuesto que se denominó D1. El compuesto D1 fue analizado por CCF y revelado con NPR/PEG. Se observó coloración característica de un compuesto polifenólico de tipo flavonoide (figura 14).

La fracción F3'' se pasó a través de una columna de fase inversa de baja presión con un gradiente de elución de MeOH acuoso (60 % - 100 %) incrementándose el MeOH en intervalos de 10 %. Mediante dos columnas sucesivas de este tipo, logró aislarse lo que se creía era el compuesto D2. Debido a que en el análisis por CCF se observaba una sola banda que migraba casi con el frente de elución, D2 fue analizado por CCF con una fase móvil poco polar (2.1.6.1.3), con lo que se pudieron resolver por lo menos cinco compuestos que al ser revelados con NPR/PEG mostraron coloración característica de compuestos polifenólicos de tipo flavonoide (figura 14). Aunque no se continuó con el aislamiento de los compuestos de la fracción D2, se decidió utilizar esta fracción en el estudio cuantitativo de actividad antioxidante. Hasta ese punto se había aislado un compuesto polifenólico de *Turnera diffusa* (D1) con actividad antioxidante.

Al final del aislamiento se evaluó la pureza de los compuestos aislados por HPLC. Los compuestos se observaron libres de impurezas en los cromatogramas obtenidos. El compuesto N1 dio a una señal con un t_R de 7.9 min. y un espectro de UV con máximos de absorción de 263.4 nm y 250.2 nm (figura 17). El compuesto N2 dio a una señal de t_R de 11.5min y un espectro de UV con máximos de 253.3 y 249 nm (figura 18). Ambos compuestos correspondieron con el t_R y espectros de absorción de UV de dos picos principales del extracto de acetato de etilo de corteza de *Juglans mollis* (figura 16).

Para elucidar la estructura de los compuestos aislados se revisaron los resultados de los espectros de RMN. Dado que la prueba cualitativa con NPR/PEG indicaban que los compuestos aislados de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa* correspondían a compuestos polifenólicos de tipo flavonoide, el análisis de los datos de RMN se basó en la búsqueda de estas moléculas (figura 40).

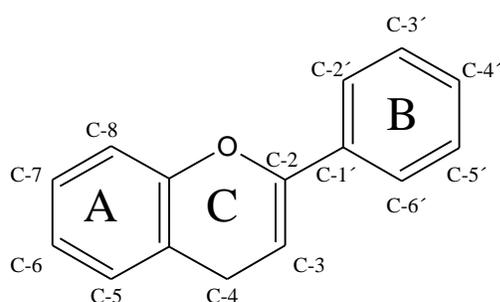


Figura 40. Estructura general de los flavonoides

Se obtuvieron las siguientes señales del espectro de $^1\text{HRMN}$ del compuesto N1 en MeOD.

Tabla 16. Desplazamientos químicos de los hidrógenos de N1 y sus constantes de acoplamiento

$^1\text{HRMN}$ para N1	
δ en ppm	
H-6	6.36 (<i>d</i>) $J=2.0$ Hz
H-8	6.19 (<i>d</i>) $J= 2.0$ Hz
H-2' H-6'	6.94 (<i>s</i>)
H-1''	5.31 (<i>d</i>) $J=1.4$ Hz
H-2''	4.22 (<i>dd</i>) $J=1.7, 3.4$ Hz
H-3''	3.79 (<i>dd</i>) $J=3.4, 9.5$ Hz
H-4''	3.31 (<i>dd</i>) $J=9.5, 10.0$ Hz
H-5''	3.52 (<i>m</i>) $J=6.2, 9.5$ Hz
H-6''	0.95 (<i>d</i>) $J=6.2$ Hz

El espectro de $^{13}\text{CRMN}$ del compuesto N1 (figura 20) indicó la presencia de por lo menos 21 carbonos en la estructura, de los cuales, uno es CH_3 , por lo menos ocho son CH (DEPT-90, figura 21) y el resto son carbonos cuaternarios. Se observaron señales en la zona de aromáticos, características de flavonoides, y una señal de carbonilo a 179.7 ppm que también es característica de este tipo de compuestos (Breitmaier, 1987).

En el espectro de $^1\text{HRMN}$ de N1 en DMSO (figura 25) se tuvo una señal correspondiente a un grupo OH, cuyo desplazamiento químico, por encima de 9 ppm indicó que éste debía encontrarse en el C-5 del anillo A del flavonoide, que al formar puente de hidrógeno con el carbonilo, aparece a campos menores que los otros grupos OH; a su vez, en el espectro de $^1\text{HRMN}$ en MeOD se tuvieron dos dobletes a 6.19 y 6.36 ppm, cada uno integró para un hidrógeno. El valor de la constante de acoplamiento

($J=2.0$ Hz) nos indica que debe tratarse de dos hidrógenos en posición meta (tabla 16). Se pudo establecer que son los hidrógenos de C-6 y C-8 del anillo A del flavonoide.

En el espectro de $^1\text{HRMN}$ en MeOD también se observó una señal a 6.94 ppm, que integraba para dos hidrógenos. De acuerdo con el espectro de HMQC, estos hidrógenos correlacionan con la señal de 109.5 ppm en el espectro de $^{13}\text{CRMN}$. De acuerdo las referencias de desplazamientos de $^{13}\text{CRMN}$ para flavonoides (Breitmaier, 1987), esta señal correspondería a dos carbonos químicamente equivalentes del anillo B del flavonoide. El resto de los carbonos del anillo B deberían estar sustituidos por grupos OH. De esta manera se pudo establecer que el flavonoide base era miricetina (figura 41).

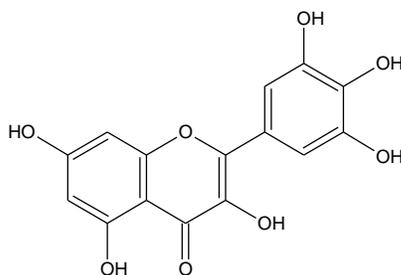


Figura 41. Estructura de la miricetina.

Se observaron señales de $^{13}\text{CRMN}$ en la zona de alifáticos, las cuales correlacionaron, según el espectro de HMQC, con las señales de $^1\text{HRMN}$ de la zona de 3.52 ppm – 5.31 ppm, características de un carbohidrato. Se estableció la correlación en estas señales de hidrógeno por medio del espectro COSY, y pudo determinarse que se trataba de un sistema cíclico correspondiente a un carbohidrato, que por presentar un

grupo metilo ($^1\text{HRMN}$ 0.95 ppm, $^{13}\text{CRMN}$ 17.7 ppm), podía ser ramnosa o fucosa. Ambos carbohidratos son epímeros en el C-2. De acuerdo con los valores de constante de acoplamiento calculados a partir de los valores de $^1\text{HRMN}$, se estableció que el carbohidrato tiene la conformación mostrada en la figura 42.

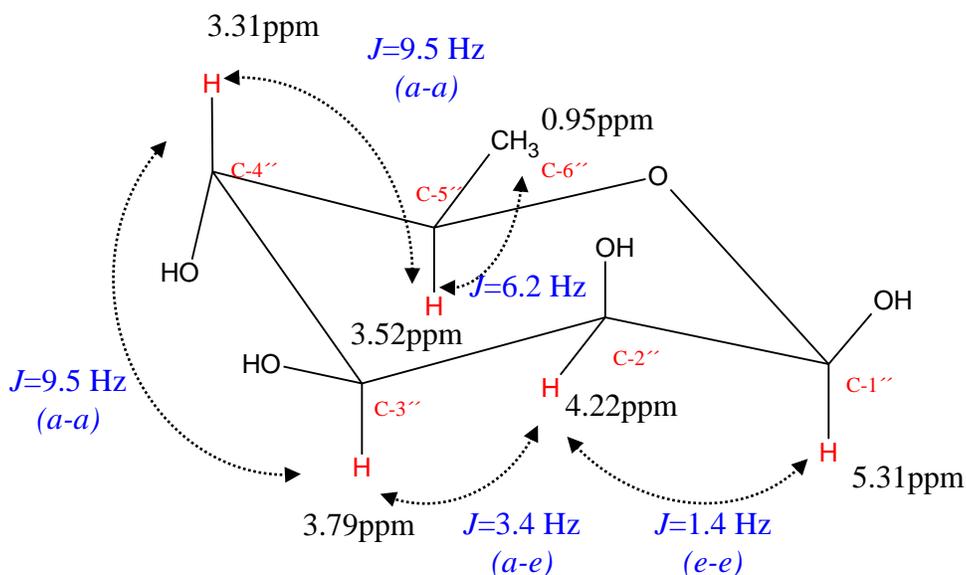


Figura 42. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los hidrógenos de ramnosa.

La ramnosa tiene los hidrógenos correspondientes a C-2 y C-3 en *cis*, mientras que en la fucosa están en *trans*. El valor encontrado de $J=3.4$ Hz, concuerda con la posición *cis* para esos dos hidrógenos. Por otro lado, el hidrógeno anomérico ($\delta=5.31$ ppm) presenta una constante de acoplamiento de $J=1.4$ Hz con el hidrógeno de C-2, lo cual indica que el hidrógeno anomérico están en α , por lo tanto el resto del carbohidrato es α -L-ramnosil.

La posición de unión del *O*-L-ramnosil al flavonoide se determinó en el oxígeno del C-3 del anillo C, en base a los datos encontrados en la literatura (Breitmaier, 1987).

Los espectros de doble dimensión (HMQC y HMBC) confirmaron la estructura propuesta para el compuesto N1, el cual se trataba de un derivado de la miricetina con una unidad de α -ramnosa (3-*O*-L-ramnosil-miricetina) mostrado en la figura 43.

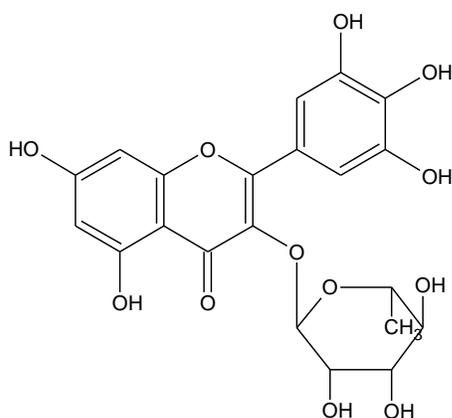


Figura 43. 3-*O*-L-ramnosil-miricetina. *Miricetrina*.

Para el compuesto N2 se obtuvieron las siguientes señales del espectro de $^1\text{HRMN}$ en MeOD.

Tabla 17. Desplazamientos químicos de los hidrógenos de N2 y sus constantes de acoplamiento.

	$^1\text{HRMN para N2}$ δ en ppm
H-6	6.36 (<i>d</i>) $J=1.9$ Hz
H-8	6.19 (<i>d</i>) $J=1.9$ Hz
H-2'	7.33 (<i>d</i>) $J=2.1, 8.2$ Hz
H-5'	6.91 (<i>d</i>) $J=8.2$ Hz
H-6'	7.31 (<i>dd</i>) $J=2.1$ Hz
H-1''	5.34 (<i>d</i>) $J=1.3$ Hz
H-2''	4.21 (<i>dd</i>) $J=1.6, 3.4$ Hz
H-3''	3.73 (<i>dd</i>) $J=3.4, 9.5$ Hz
H-4''	3.31 (<i>dd</i>) $J=9.5, 9.5$ Hz
H-5''	3.42 (<i>m</i>) $J=6.1, 9.5$ Hz
H-6''	0.94 (<i>d</i>) $J=6.1$ Hz

El espectro de $^{13}\text{CRMN}$ para el compuesto N2 indicó la presencia de 22 carbonos; uno de ellos CH_3 , diez CH y once carbonos cuaternarios (DEPT-135, figura 28). Se observaron señales en la zona de aromáticos características de flavonoide, incluyendo un grupo carbonilo a 179.7 ppm, similar a lo obtenido en el análisis del compuesto N1.

En el espectro de $^1\text{HRMN}$ en MeOD para N2 se tuvieron dos dobletes a 6.19 y 6.36 ppm; cada uno integró para un hidrógeno, y de acuerdo a su constante de acoplamiento ($J=1.9$ Hz) (tabla 17), deben estar en posición meta. Se estableció que estos hidrógenos se encuentran en el C-6 y C-8 del anillo A del flavonoide.

Se observó también en el espectro de $^1\text{HRMN}$, un doblete a 6.91 ppm ($J=8.2$ Hz) y un doble doblete a 7.29 ppm ($J=8.2, 2.1$ Hz), los valores de J indican que estos dos hidrógenos se encontraban en posición orto. Además, un doblete a 7.33 ppm con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz indicó que este hidrógeno se encontraba en posición meta con respecto al hidrógeno de 7.29 ppm. Siguiendo el patrón del primer compuesto elucidado, los hidrógenos fueron posicionados en los carbonos C-6', C-5' y C-2' del flavonoide. Los carbonos 3' y 4' del anillo B tendrían que estar sustituidos por grupos OH. Se determinó que la base de este flavonoide es quercetina.

Se observaron en el espectro $^{13}\text{CRMN}$ señales en la zona de alifáticos, que de acuerdo al espectro de HMQC, correlacionaron con las señales de $^1\text{HRMN}$ de la zona de 3.42 ppm – 5.34 ppm, características de un carbohidrato. Se estableció la correlación en estas señales de hidrógeno por medio del espectro COSY, con grupo metilo ($^1\text{HRMN}$ 0.94 ppm, $^{13}\text{CRMN}$ 17.8 ppm), lo cual indicó la presencia de una unidad de ramnosa o fucosa. De acuerdo a las constantes de acoplamiento calculadas con el espectro de $^1\text{HRMN}$, se asignaron las posiciones para cada hidrógeno en el carbohidrato. Los hidrógenos correspondientes a C-2'' y C-3'' presentaron una constante de acoplamiento de 3.4 Hz, lo que determinó que se encontraban en *cis*. Con esto se estableció que el carbohidrato era ramnosa y no fucosa, en la cual estos hidrógenos están en posición *trans*. Por otra parte, el hidrógeno anomérico ($\delta=5.34$ ppm) presenta una constante de acoplamiento de 1.3 Hz con el hidrógeno de C-2'', lo que indica que el hidrógeno anomérico está en α y por lo tanto el resto del carbohidrato es α -L-ramnosil.

Se propuso para N2, la estructura de un derivado 3-O-L-ramnosil de quercetina (figura 44).

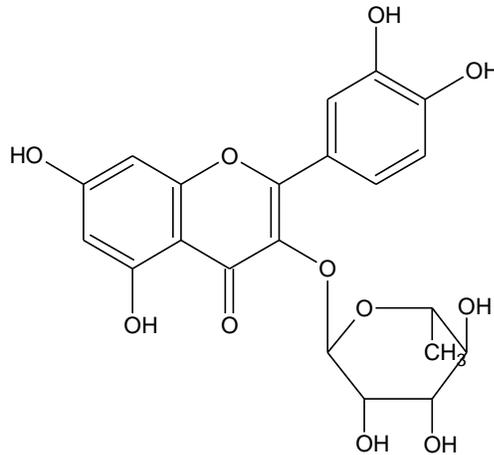


Figura 44. 3-O-L-ramnosil-quercetina. *Quercitrina*.

Estos dos compuestos son flavonoides conocidos y su aislamiento fue reportado recientemente de una especie de juglandácea, *Juglans manshurica* (Min y cols, 2000). El nombre común para estos compuestos es miricetrina y quercitrina, respectivamente.

Con respecto al compuesto D1, se obtuvieron las siguientes señales del espectro de $^1\text{HRMN}$ en MeOD:

Tabla 18. Desplazamientos químicos de los hidrógenos de D1 y sus constantes de acoplamiento.

	$^1\text{HRMN}$ para D1 δ en ppm
H-3	6.55 (<i>d</i>) $J=16.9$ Hz
H-6	6.32 (<i>d</i>) $J=15.2$ Hz
H-2'	7.54 (<i>d</i>) $J=2.1$ Hz
H-5'	7.48 (<i>dd</i>) $J=2.1, 8.3$ Hz
H-6'	6.95 (<i>d</i>) $J=8.3$ Hz
H-1''	5.19 (<i>d</i>) $J=10.3$ Hz
H-2''	5.06 (<i>d</i>) $J=10.3$ Hz
H-4''	4.24 (<i>d</i>) $J=9.7$ Hz
H-5''	3.62 (<i>m</i>) $J=9.7$ Hz
H-6''	1.57 (<i>d</i>) $J=6.0$ Hz
H-1'''	4.76 (<i>d</i>) $J=1.2$ Hz
H-2'''	3.93 (<i>m</i>)
H-3'''	3.27 (<i>d</i>) $J=3.2$ Hz
H-4'''	3.12 (<i>dd</i>) $J=9.5, 9.5$ Hz
H-5'''	2.34 (<i>m</i>) $J=6.2, 9.5$ Hz
H-6'''	0.68 (<i>d</i>) $J=6.2$ Hz

El espectro de $^1\text{HRMN}$ del compuesto D1 muestra también señales en la zona de aromáticos, típica de un flavonoide, así como en la zona de carbohidratos; debido al número de señales se sospechó que se encontraban dos carbohidratos. La presencia de dos grupos metilo a $\delta=0.68$ ppm y $\delta=1.57$ ppm indicó que se trataba de dos residuos de ramnosa o estructuras relacionadas. Estas señales correlacionaron en el espectro HMQC con las señales a $\delta=16.3$ ppm y $\delta=18.3$ ppm respectivamente, en el espectro de $^{13}\text{CRMN}$.

Respecto del flavonoide base, se observaron en el espectro de $^1\text{HRMN}$ cinco señales, dos de ellas con una constante de acoplamiento de 8.3 Hz correspondiente a un acoplamiento en posición orto, a su vez uno de estos hidrógenos tuvo una constante de acoplamiento de 2.1 Hz con otro hidrógeno, lo cual indicó una posición relativa en meta de estos hidrógenos como se indica en la figura 45; de esta manera el anillo C tiene dos grupos OH. Las otras dos señales del espectro de $^1\text{HRMN}$ son singuletes que no presentan acoplamiento en meta, ni alguna correlación en el espectro de HMBC, por lo que uno debe estar en posición C-3 y el otro en posición C-6 o C-8. Esto se comprobó por la correlación entre esta señal a $\delta=6.55$ ppm y la señal del grupo carbonilo del flavonoide ($\delta=182.6$ ppm) en el espectro de HMBC. De esta manera, la base del flavonoide es luteolina, y el carbohidrato debe estar unido a C-6 o C-8, tratándose entonces de un C-glicósido.

Respecto del carbohidrato se observó tanto en $^1\text{HRMN}$ como en $^{13}\text{CRMN}$ las señales típicas de la ramnosa, en forma de un *O*-glicósido. El espectro de $^{13}\text{CRMN}$ indicó que el otro azúcar debía tener un residuo cetónico ($\delta=205.2$ ppm) junto con un metilo ($\delta=18.3$ ppm) y cuatro metinos ($\delta=74.1$ ppm, 76.8 ppm, 78.7 ppm y 79.3 ppm). El espectro COSY mostró correlación entre las señales de $\delta=4.24$ ppm, $\delta=3.62$ ppm y el grupo metilo de $\delta=1.56$ ppm. Por lo tanto el grupo cetónico debe estar en C-3'' y la unión a la ramnosa en C-2''. Esto fue confirmado por las correlaciones de HMBC, además la constante de acoplamiento de $J=10.3$ Hz entre H-1'' y H-2'', y la constante de acoplamiento de $J=9.7$ Hz entre H-4'' y H-5'' indicó que éstos se encontraban en

posición trans-diaxial. Las interacciones NOE (figura 45) entre H-1'' y H-5'', y H-2'' y H-4'' confirmó la estructura de 6-deoxi-ribo-hexos-3-ulosa.

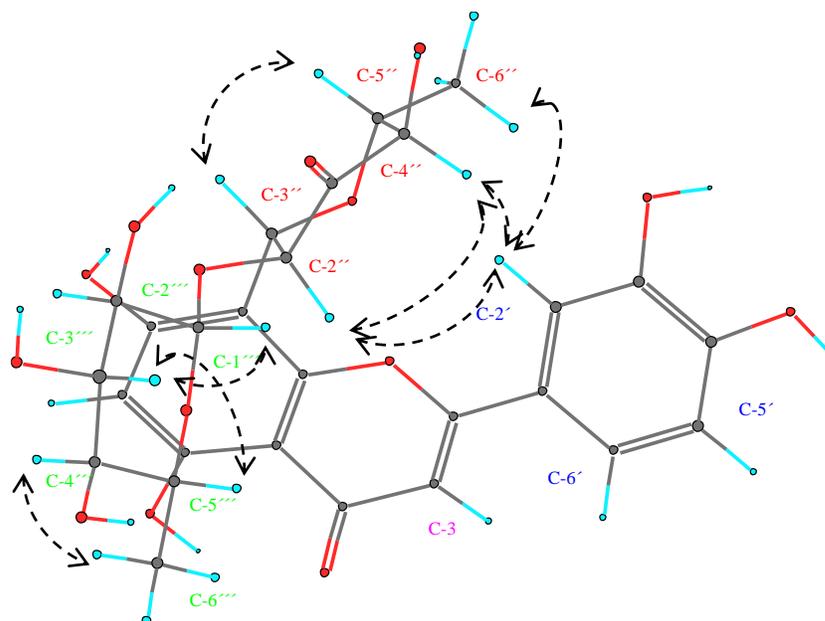


Figura 45. Acoplamientos NOE de D1.

Los valores de desplazamiento químico de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ concordaban más con una unión a C-8 (Zhao y cols., 2007) que a C-6 (Hatano y cols., 1999), sin embargo para confirmar esta unión, se construyeron varios modelos del compuesto, tanto con el disacárido en posición C-6 como en C-8 en el flavonoide. La minimización de energía y el cálculo de distancias interatómicas en la geometría optimizada para cada uno de ellos, permitió decidir que el disacárido debía estar en posición C-8 del flavonoide.

Se estableció que el compuesto aislado D1, es 8-C [6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-*xyl*o-hexopiranos-3-ulosido] luteolina (figura 46), el cual ya ha sido reportado recientemente, a partir de *Turnera diffusa* (Zhao y cols., 2007).

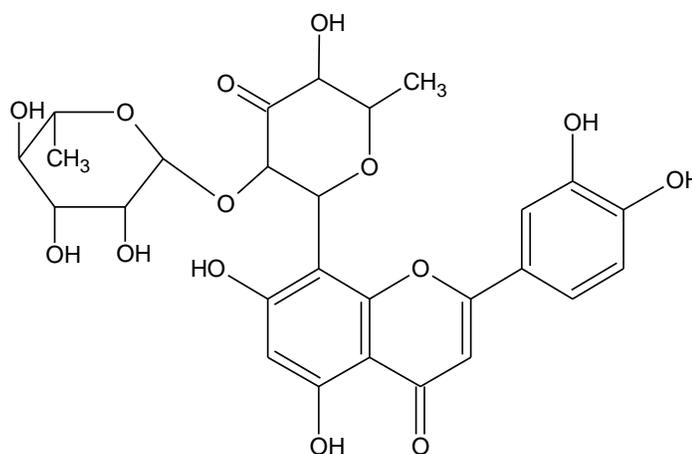


Figura 46. 8-C [6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-*xyl*o-hexopiranos-3-ulosido] luteolina

Hasta el momento, el derivado de luteolina descrito en el presente trabajo sólo ha sido aislado de *Turnera diffusa*, por lo cual consideramos que de ser su única fuente natural, representa un potencial marcador de esta especie para el control de calidad de productos herbales comerciales que digan contener dicha planta.

Para la determinación cuantitativa de la actividad antioxidante de los compuestos aislados, se realizó una dilución seriada de cada muestra, y se adicionó una misma cantidad de DPPH. Los ensayos se realizaron por triplicado y se calcularon los porcentajes de reducción para cada dilución. Los porcentajes de reducción fueron graficados con respecto a la concentración (figura 39). Para todas las muestras se

determinó la concentración inhibitoria 50 del radical libre. Debido a que la respuesta no fue lineal a todas las concentraciones probadas, para obtener la ecuación de una recta y de ahí la CI_{50} , se decidió trabajar con los valores que se encontraban alrededor del 50 % de reducción. Para cada muestra analizada se obtuvo una gráfica de tendencia y la ecuación de la recta. Mediante la ecuación de la recta se calculó la CI_{50} para cada muestra por triplicado, se promedió y se obtuvo la desviación estándar para cada muestra probada.

El resultado indica que los dos compuestos aislados de *Juglans mollis* tienen una CI_{50} micromolar mayor que quercetina. El compuesto aislado de *Turnera diffusa* resultó con mayor actividad antioxidante (CI_{50} menor) que los compuestos aislados de *Juglans mollis*; además resultó con una CI_{50} menor que rutina. Todos los compuestos tuvieron una CI_{50} significativamente menor que el BHT (tabla 13).

Cabe mencionar que anteriormente, otro estudio reportó una actividad antioxidante para quercetina de $9.8 \pm 0.02 \mu\text{M}$ (Torres y cols., 2006), semejante a la que se determinó en este estudio ($7.77 \pm 0.11 \mu\text{M}$).

La CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$ de la fracción D2, estuvo por encima de todas las sustancias probadas, incluyendo los tres controles positivos. Considerando que esta fracción es una mezcla no polar de flavonoides y que entonces su peso molecular podría ser comparable al de la quercetina, tendría aproximadamente cinco veces menos poder antioxidante que la quercetina y que el derivado de luteolina aislado.

Todo lo anterior nos indica que los compuestos aislados poseen una buena actividad antioxidante, lo cual justificaría el uso tradicional que se les ha dado a estas especies.

En cuanto a la actividad inmunomoduladora, se decidió probar únicamente los compuestos aislados de *Juglans mollis* (N1, N2 y N3), ya que solo el extracto de acetato de etilo de corteza de esta especie resultó activo en el ensayo aplicado a los extractos primarios de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*. Cabe mencionar que el índice de estimulación es una relación entre un cultivo celular adicionado con un mitógeno conocido y un cultivo sin mitógeno (en este caso, PHA), en el cual ambos pueden o no contener alguna sustancia para la que se desee conocer su actividad mitogénica, comparándola con un control de células con y sin adición de mitógeno (PHA). Un índice de estimulación positivo se considera cuando su valor está por encima de 10. En este estudio, los compuestos N2 y N3 fueron probados solo en cantidades de 50, 10 y 1 µg, debido a las cantidades reducidas de compuesto con las que se contaba. En el caso del ensayo realizado, se decidió no utilizar los índices de estimulación como referencia debido a que el control de células presentaba un índice menor a 10. Por ello, sólo se realizó una comparación entre los promedios de cuentas con estímulo de PHA. En este caso, se observó que ninguno de los compuestos probados posee una actividad mitogénica similar a la de PHA, sin embargo en los ensayos donde se utilizaron las fracciones F1, F2, F3 y F4 provenientes del extracto de corteza de acetato de etilo de *Juglans mollis*, en cantidades de 500 µg, se tuvo una proliferación de 22, 33, 12 y 5

veces mayor, respectivamente, que el control de PHA; esto indica que la actividad inmunoestimulante que se había visto en el ensayo de extractos primarios, donde el extracto de corteza de *J. mollis* había resultado positivo, permaneció en las fracciones menos polares que se obtuvieron de éste extracto. Cabe mencionar que los compuestos aislados por nosotros de *Juglans mollis* provenían de la fracción F3 (fracción de AcOEt:MeOH), la cual sólo presentó una moderada actividad proliferativa con respecto a las fracciones menos polares.

Además se determinó la citotoxicidad de las fracciones obtenidas F1, F2, F3 y F4 de *Juglans mollis* así como los compuestos puros obtenidos. Se calcularon los promedios de cada ensayo triplicado y su respectiva desviación estándar. En este estudio, los porcentajes de viabilidad celular fueron de 92 % a 100 %. Lo anterior nos indica que ninguno de los compuestos, ni las fracciones analizadas resultaron ser citotóxicas aún en concentraciones de 5 µg/µL.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

- Se aislaron de *Juglans mollis* dos compuestos con actividad antioxidante, N1 y N2, identificados como 3-*O*-ramnosil-miricetina y 3-*O*-ramnosil-quercetina, los cuales habían sido aislados anteriormente de la especie *Juglans mandshurica*.
- De *Turnera diffusa* se aisló el compuesto antioxidante D1, el cual fue identificado como 8-*C* [6-deoxi-2-*O*-(α -L-ramnopiranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulosido] luteolina, el cual había sido aislado recientemente de la misma especie.
- Ninguno de los compuestos aislados de *Juglans mollis* presentó actividad inmunomoduladora sobre la proliferación celular espontánea. Sin embargo, en todas las fracciones probadas, se observó un efecto inmunoestimulante en los ensayos de 5 μ g/mL.
- Ninguno de los compuestos aislados resultó ser citotóxico.

- Los tres compuestos aislados de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa* tienen una CI_{50} mayor que la quercetina. Pero mucho menor que la CI_{50} de rutina.
- El compuesto aislado de *Turnera diffusa* resultó con mayor actividad antioxidante (CI_{50} menor) que los compuestos aislados de *Juglans mollis*.
- Todos los compuestos tuvieron una CI_{50} significativamente menor que el BHT.
- Por primera vez se reporta la capacidad antioxidante del compuesto aislado de *Turnera diffusa* 8-C [6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulosido] luteolina.

5.2 Perspectivas

- Continuar con el aislamiento de las fracciones menos polares del extracto de acetato de etilo de *Juglans mollis* y determinar su capacidad inmunomoduladora.
- Purificar mayor cantidad de 8-C [6-deoxi-2-*O*-(α -L-ramnopiranosil)-xylohexopiranos-3-ulosido] luteolina, aislado de *Turnera diffusa* para utilizarlo como marcador para el control de calidad de los productos herbáceos que dicen contener dicha planta.

APÉNDICE A

Tabla 19. Lecturas de absorbancia a 517 nm y porcentajes de reducción por triplicado de miricetrina. Abs= absorbancia, % R= porcentaje de reducción.

N1 µg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% R 1	% R 2	% R 3
20.0	0.155	0.168	0.169	78.85	76.73	76.82
10.0	0.144	0.155	0.149	80.35	78.53	79.56
5.0	0.316	0.318	0.320	56.89	55.96	56.10
2.5	0.513	0.506	0.508	30.01	29.92	30.32
1.2	0.606	0.607	0.606	17.33	15.93	16.87
0.6	0.664	0.670	0.669	9.41	7.20	8.23
0.3	0.684	0.684	0.686	6.68	5.26	5.90
Control	0.733	0.722	0.729	0.00	0.00	0.00

Tabla 20. Lecturas de absorbancia a 517 nm y porcentajes de reducción por triplicado de quercitrina. Abs.= absorbancia, % R= porcentaje de reducción.

N2 µg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% R 1	% R 2	% R 3
20.0	0.209	0.215	0.211	71.72	70.75	71.17
10.0	0.167	0.186	0.175	77.40	74.69	76.09
5.0	0.351	0.347	0.354	52.50	52.79	51.64
2.5	0.535	0.501	0.527	27.60	31.84	28.01
1.2	0.616	0.625	0.618	16.64	14.97	15.57
0.6	0.635	0.637	0.629	14.07	13.33	14.07
0.3	0.662	0.651	0.655	10.42	11.43	10.52
Control	0.739	0.735	0.732	0.00	0.00	0.00

Tabla 21. Lecturas de absorbancia a 517 nm y porcentajes de reducción por triplicado de 8-C [6-deoxi-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulosido] luteolina. Abs.= absorbancia, % R= porcentaje de reducción.

D1 μg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% R 1	% R 2	% R 3
20.0	0.130	0.125	0.129	83.01	82.73	82.38
10.0	0.156	0.134	0.142	79.61	81.49	80.60
5.0	0.379	0.359	0.365	50.46	50.41	50.14
2.5	0.563	0.536	0.542	26.41	25.97	25.96
1.2	0.593	0.574	0.571	22.48	20.72	21.99
0.6	0.696	0.682	0.684	9.02	5.80	6.56
0.3	0.736	0.693	0.705	3.79	4.28	3.69
Control	0.765	0.724	0.732	0.00	0.00	0.00

Tabla 22. Lecturas de absorbancia a 517 nm y porcentajes de reducción por triplicado de la fracción D2. Abs.= absorbancia, % R= porcentaje de reducción.

D2 μg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% R 1	% R 2	% R 3
20.0	0.102	0.108	0.106	86.49	85.64	86.03
10.0	0.340	0.326	0.333	54.97	56.65	56.13
5.0	0.511	0.482	0.497	32.32	35.90	34.52
2.5	0.645	0.639	0.646	14.57	15.03	14.89
1.2	0.685	0.659	0.672	9.27	12.37	11.46
0.6	0.699	0.683	0.692	7.42	9.18	8.83
0.3	0.715	0.714	0.718	5.30	5.05	5.40
Control	0.755	0.752	0.759	0.00	0.00	0.00

Tabla 23. Lecturas de absorbancia a 517 nm y porcentajes de reducción por triplicado de quercetina. Abs.= absorbancia, % R= porcentaje de reducción.

Q μg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% R 1	% R 2	% R 3
20.0	0.135	0.123	0.129	81.73	82.53	81.93
10.0	0.132	0.118	0.122	82.14	83.24	82.91
5.0	0.136	0.123	0.13	81.60	82.53	81.79
2.5	0.258	0.252	0.256	65.09	64.20	64.15
1.2	0.496	0.482	0.491	32.88	31.53	31.23
0.6	0.599	0.594	0.595	18.94	15.63	16.67
0.3	0.682	0.655	0.668	7.71	6.96	6.44
Control	0.739	0.704	0.714	0.00	0.00	0.00

Tabla 24. Lecturas de absorbancia a 517 nm y porcentajes de reducción por triplicado de rutina. Abs.= absorbancia, % R= porcentaje de reducción.

R $\mu\text{g/mL}$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% R 1	% R 2	% R 3
20.0	0.123	0.125	0.128	82.94	82.59	83.05
10.0	0.155	0.158	0.164	78.50	77.99	78.28
5.0	0.409	0.407	0.429	43.27	43.31	43.18
2.5	0.546	0.538	0.559	24.27	25.07	25.96
1.2	0.640	0.642	0.667	11.23	10.58	11.66
0.6	0.672	0.669	0.704	6.80	6.82	6.75
0.3	0.686	0.686	0.721	4.85	4.46	4.50
Control	0.721	0.718	0.755	0.00	0.00	0.00

Tabla 25. Lecturas de absorbancia a 517 nm y porcentajes de reducción por triplicado de hidroxitolueno butilado. Abs.= absorbancia, % R= porcentaje de reducción.

BHT $\mu\text{g/mL}$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	% R 1	% R 2	% R 3
20.0	0.244	0.257	0.248	65.44	64.55	65.51
10.0	0.318	0.348	0.337	54.96	52.00	53.13
5.0	0.429	0.466	0.454	39.24	35.72	36.86
2.5	0.536	0.553	0.539	24.08	23.72	25.03
1.2	0.610	0.624	0.625	13.60	13.93	13.07
0.6	0.622	0.642	0.639	11.90	11.45	11.13
0.3	0.677	0.689	0.682	4.11	4.97	5.15
Control	0.706	0.725	0.719	0.00	0.00	0.00

REFERENCIAS

Adame J, Adame H. Plantas curativas del Noreste Mexicano (primera edición). Editorial Castillo. México (2000).

Alcaraz L, Delgado J, Real S. Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*. 75 (2004) 696-701.

Alcaraz L, Delgado J, Real S. Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*. 75(2004) 696-701.

Alfaro, C; Urios, A; González, C; Moya, P; Blanco, M. Screening from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. *Mutation Research*. 539(2003) 187-194.

Amaral J, Alves M, Seabra R, Oliveira B. Vitamin E composition of walnuts (*Juglans regia* L.): a 3-year comparative study of different cultivars. *J Agric. Food Chemistry*. 53(2005) 5467-5472.

- Amaral J, Cunha S, Alves M, Pereira J, Seabra R, Oliveira B. Triacylglycerol composition of walnuts (*Juglans regia* L.) cultivars: characterization by HPLC-ELSD and chemometrics. *J Agric. Food Chemistry*. 52(2004) 7964-7969.
- Arletti R, Benelli A, Cavazzuti E, Scarpetta G, Bertolini A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology*. 143(1999) 15-19.
- Arner ES. Superoxide production by dinitrophenyl-derivatized thioredoxin reductase--a model for the mechanism and correlation to immunostimulation by dinitrohalobenzenes. *Biofactors*. 10(1999) 219-26.
- Benavente-García O, Castillo J, Martín F, Ortuño A, Del Río J. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J Agric. Food Chemistry*. 45(1997) 4505-4515.
- Bergman, M., Perelman, A., Dubinsky, Z., Grossman S. Scavenging of reactive oxygen species by novel glucuronated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. *Phytochemistry*. 62(2002) 753-762.
- Breitmaier E, Voelter W. Carbon-13 NMR spectroscopy (third edition). VCH. Alemania (1987).

- Charanjit, K., Kapoor, C. Antioxidant activity and phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*. 37(2002) 153-161.
- Chew BP. Role of carotenoids in the immune response. *J Dairy Sci*. 76(1993) 2804-2811.
- Coban T, Citoglu G, Sever B, Iscan M. Antioxidant activities of plants used in traditional medicine in Turkey. *Pharm Bio*. 41(2003) 608-613.
- Colaric M, Veberic R, Solar A, Hudina M, Stampar F. Phenolic acid, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivar of *Juglans regia*. *J. Agric. Food Chemistry*. 53(2005) 6390-6396.
- Cos, P., Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden, D. Structure- activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. *Studies in Natural Products Chemistry*. 22(2000) 307-339.
- Dominguez XA, Hinojosa M. Isolation of 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy-flavone from *Turnera diffusa*. *Planta Med*. 30(1976) 68-71.
- Domínguez XA. *Métodos de Investigación Fitoquímica (primera edición)*. Editorial Limusa. México (1978).

Elmastas M, Gülcin I, Beydemir S, Irfan O, Aboul-Enein H. A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis L.*) fruit extracts. Analytical Letters. 39(2006) 47-65.

Elmastas M, Ozturk L, Gokce I, Erenler R, Aboul-Enein H. Determination of antioxidant activity on marshmallow flower (*Althaea officinalis L.*). Analytical Letters. 37(2004) 1859-1869.

Estrategia de la Organización Mundial de la Salud sobre medicinal tradicional 2002-2005.

Fabjan N, Rode J, Kosir I, Wang Z, Zhang Z, Kreft I. Tarty buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercetin. J. Agric. Food Chemistry. 51(2003) 6452-6455.

Gálvez M, Martín-Cordero C, Houghton P, Ayuso M. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. J. Agric. Food Chemistry. 53(2005) 1927-1933.

Garza L, Ramírez X, Garza F, Salinas M, Waksman N, Alcaraz Y, Torres O. Evaluación biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. Ciencia UANL. 9(2006) 164-170.

Hatano T, Mizuta S, Ito H, Yoshida T. C-Glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*. *Phytochemistry*. 52(1999) 1379-1383.

Heo H, Lee C. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J. Agric. Food Chemistry*. 53(2005) 1984-1989.

Hernandez T, Canales M, Ávila J, Durán A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J Ethnopharmacol*. 88(2003) 181-188.

Hu C, Kitts D. Studies on the antioxidant activity of *Echinaceae* root extract. *J. Agric. Food Chemistry*. 48(2000) 1466-1472.

Huang D, Ou B, Prior R. The Chemistry behind antioxidants capacity assays. *J. Agric. Food Chem*. 53(2005) 1841-1856.

Informe de la OMS sobre medicina tradicional. Informe de la secretaría A56/18. 2003.

Joe Y, Son J. New naphthalenyl glucosides from the roots of *Juglans manshurica*. *J. Nat. Prod*. 59(1996) 159-160.

- Jung H, Su BN, Keller W, Mehta R, Kinghorn D. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric. Food Chemistry*. 54(2006) 2077-2082.
- Jurd L. The sterol and carbohydrates constituents of walnut (*Juglans regia*). *J. Org. Chem*. 21(1956) 759-760.
- Kim S, Lee K, Son J, Je G, Lee J, Lee C, Cheong C. Cytotoxic compounds from the roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod*. 61(1998) 643-645.
- Koganov M, Dueva O, Tsorin B. Activities of plant-derived phenols in a fibroblast cell culture model. *J. Nat. Prod*. 62(1999) 481-483.
- Kresty L, Howell A, Baird M. Cranberry proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit acid-induced proliferation of human esophageal adenocarcinoma cells. *J. Agric. Food Chemistry*. 56(2008).
- Lakebrink C, Lappczynski S, Maiwald B, Engelhardt U. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chemistry*. 48(2005): 2848-2852.
- Lee K, Kim S, Lee C, Woo M, Lee S. Cytotoxic diarylheptanoids from roots of *Juglans mandshurica*. *J. Nat. Prod*. 65(2002) 1707-1708.

- Lee K, Kim Y, Kim D, Lee H, Lee C. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chemistry*. 51(2003) 6516-6520.
- Li L, Tsao R, Yang R, Kramer J, Hernández M. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of hearnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *J Agric. Food Chemistry*. 55(2007) 1164-1169.
- Lin J, Chen P, Ho C, Lin-Shiau S. Inhibition of xantine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J. Agric. Food Chemistry*. 48(2005) 2736-2743.
- Luk J, Wang X, Liu P, Wong K, Chan K, Tong Y, Hui C, Lau G, Fan S. Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation. *Liver international*. (2007) 879-890.
- Mahoney N, Molyneux R, Cambell B. Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). *J Agric. Food Chemistry*. 48(2000) 4418-4421.

Mahoney N, Moyneux R. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *J. Agric. Food Chemistry*. 52(2004) 1882-1889.

Martínez J, Silván AM, Abad MJ, Bermejo P, Villar M. Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA-Induced ear edema inhibitor. *J. Nat. Prod.* 60(1997) 142-144.

Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas (primera edición). Fondo de cultura económica. México(1994).

Mayer K, Myers R, Lee S. Silymarin treatment of viral hepatitis: a systematic review. *J. Viral Hepat.* 12(2005) 559-67.

Min B, Nakamura N, Miyashiro H, Kim Y, Hattori M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of *Juglans mandshurica*. *Chem. Pharm. Bull.* 48(2000) 194-200.

Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31(2001) 1287-312.

OXItek TBARS Assay Kit. ZMC Cat 0801192. 2000.

Piacente S, Camargo E, Zampelli A, Gracioso J, Souza B, Pizza C, Vilegas W.

Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*. *Z Naturforsch.* 57(2002) 983-5.

Picerno P, Mencerini T, Lauro M, Barbato F, Aquino R. Phenolic constituents and

antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves. *J. Agric. Food*

Chemistry. 51(2005) 6423-6428.

Pietta, PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63(2000) 1035-1042.

Pozos ME. Evaluación de actividad antioxidante en plantas del noreste de México.

Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina UANL (2005).

Prior R, Wu X, Schainch K. Standardized methods for the determination of antioxidant

capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*

53(2005) 4290-4302.

Rao K, Damo A, Jayaprakasam B, Gunasekar D. Flavonol glycosides from *Cassia*

hirsuta. *J. Nat. Prod.* 62(1999) 305-306.

Salinas-Carmona M, Torres-Lopez E, Ramos A, Licon-Trillo A, Gonzalez-Spencer D.

Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of

actinomycetona in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 65(1999) 2428-2432.

Seeram N. Berry fruits for cancer prevention: current status and prospects. *J Agric. Food Chemistry*. 56(2008).

Seeram N. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric. Food Chemistry*. 56(2008).

Shukitt-Hale B, Lau F, Joseph J. Berry fruit supplementation and the aging brain. *J. Agric. Food Chemistry*. 56(2008).

Spencer K, Seigler D. Tetraphyllin B from *Turnera diffusa*. *Planta Med*. 43(1981) 175-178.

Torres R, Faini F, Modak B, Urbina F, Labbé C, Guerrero J. Antioxidant activity of coumarins and flavonoids from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*. 67(2006) 894-987.

Tsao L, Yang R, Liu C, Zhu H, Young C, Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *J Agric. Food Chemistry*. 54(2006) 8033-8040.

Velásquez, M; Gómez, B; Contreras, R; El envejecimiento y los radicales libres. Ciencias, 75(2004) 36-43.

Wang H, Nair M, Strasburg G, Chang Y, Booren A, Gray J, DeWitt D. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin from tart cherries. J. Natural Products. 62(1999) 294-296.

Wei BL, Weng JR, Chiu PH, Hung CF, Wang JP, Lin CN. Antiinflammatory flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus communis*. J Agric. Food Chemistry. 53(2005) 3867-3871.

www.imss.gob.mx (2005).

Zaporozhets O, Krushynska O, Lipkovska N, Barvichenko V. A new test method for evaluation of total antioxidant activity of herbal products. J. Agric. Food Chemistry. 52(2004) 21-25.

Zhang Y, Seeram N, Lee R, Feng L, Heber D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. J Agric. Food Chemistry. 56(2008).

Zhao J, Pawar R, Ali Z, Khan I. Phytochemical investigation or *Turnera diffusa*. J. Nat. Prod. 70(2007) 289-292.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jonathan Pérez Meseguer

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica

Título de Tesis

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
ANTIOXIDANTES E INMUNOMODULADORES DE
Juglans mollis Y *Turnera diffusa***

Campo de estudio: Química Analítica

Biografía:

Datos personales:

Nacido en Poza Rica de Hgo., Veracruz, México el 3 de Diciembre de 1980.
Hijo de Zita Beatriz Elizabeth Meseguer Rossi y Paulina Rossi Flores.

Escolaridad:

Egresado de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad del Noreste.
Grado obtenido: Químico Farmacéutico Biólogo.

Experiencia profesional:

Técnico analista en el laboratorio de control en Gas y Petroquímica Básica,
Complejo Poza Rica. Poza Rica, Ver. 2000-2001.
Químico responsable en Banco de Sangre y Hemoterapia de Tampico. Tampico,
Tams. 2002.
Responsable del área de cromatografía de gases en Laboratorio Quantum.
Tampico, Tams. 2003.
Personal profesional no docente en la Facultad de Medicina, U.A.N.L Monterrey,
N.L. 2007-2008.