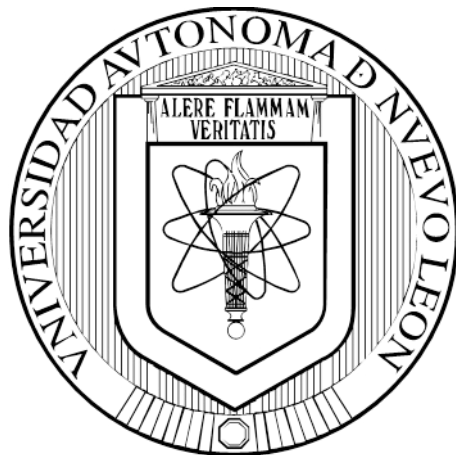


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE COMPUESTO(S) CON ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa***

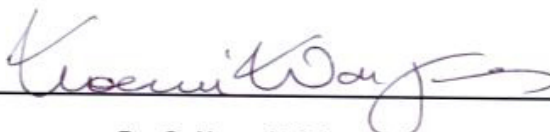
**POR
QCB. CECILIA DELGADO MONTEMAYOR**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
QUÍMICA BIOMÉDICA**

JULIO 2013

**AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE COMPUESTO(S) CON ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa***

Aprobación de la Tesis:



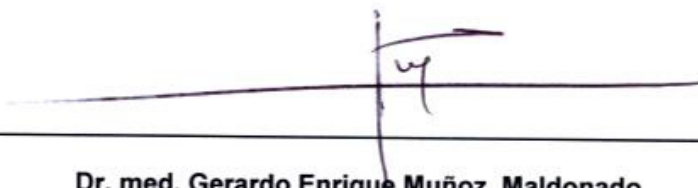
Dr. C. Noemí Waksman de Torres
Director de Tesis



Dr. C. Paula Cordero Pérez
Co-Director de Tesis



Dr. C. Jonathan Pérez Meseguer
Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

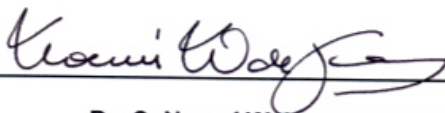
**AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE COMPUESTO(S) CON ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa***

Presentado por:

QCB. Cecilia Delgado Montemayor

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Noemí Waksman de Torres y la co-dirección de la Dr. C. Paula Cordero Pérez.

Director



Dr. C. Noemí Waksman de Torres

Co-Director



Dr. C. Paula Cordero Pérez

“Sólo una cosa convierte en imposible un sueño,
el miedo a fracasar”

Paulo Coelho

DEDICATORIA

A la persona que me dio la mejor enseñanza de la vida; me enseñaste a soñar y me demostraste que con trabajo y dedicación los sueños dejan de existir para convertirse en realidades

Te extraño mucho papi

AGRADECIMIENTOS

Tengo que agradecer primeramente a Dios por darme vida, salud y a mi familia; por permitirme vivir esta experiencia que anhelaba tanto.

Gracias a mi mama **Concepción Montemayor**, el ser con más amor y fuerza que conozco, muchas personas dicen que soy muy terca pero creo que es porque no te conocen; nunca te cansas de luchar y siempre lo haces pensando en princesas. Tu sabes todo lo que te amo y solo espero algún día poder regresarte tanto.

Gracias a mis hermanas **Liliana** y **Edith** por ser siempre mis cómplices en tantas aventuras y travesuras; son un gran ejemplo de esfuerzo y dedicación, las admiro tanto. A mi sobrino **Johnatan** que desde pequeño me ha enseñado que los límites no los ponemos nosotros mismos, me sorprendes tanto cada día mi príncipe.

A mis abuelas **Cuquita** y **Lupita**, mis tías **Lichis**, **Soco**, **Gely**, **Ary** y **Lety** y mis tías postizas **Mony** y **Paty** por tanto y tanto amor que me dan, son unas súper mujeres espero un día llegar a ser como ustedes.

A mi tía **Irma** y **Alejandra** que aunque circunstancias difíciles de la vida nos unieron hemos estado juntas para hacer nuestras vidas más felices. Las quiero tanto princess.

A todos mis primos, primas y tíos, a todos muchas gracias. A mis amigas **Denisse, Maira y Liz** por entender que muchas veces no tenía tiempo para estar con ellas, o que cuando nos veíamos a veces me quedaba dormida del cansancio.

A la Dra. **Noemí Waksman**, nos hay palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, aunque este fue un proyecto de dos años en realidad fueron más de cinco los que estuve ahí en su laboratorio y volvería a estar cinco y muchísimos años más. Es todo un honor para mí que se haya tomado el tiempo para dirigir mi tesis. Yo vine a aprender química pero le puedo asegurar que me enseñó muchas lecciones más, lecciones que no vienen en libros y que me llevaré siempre de recuerdo.

A la **Dra. Paula Cordero**, sin duda de las mujeres más trabajadoras que he conocido. Aunque siempre he dicho que la química es lo que más me gusta la verdad es que si me ponía algo triste el saber que me alejaría de el área clínica; gracias por permitirme unir estas dos áreas que me apasionan tanto. Me quedo con todos los consejos que me dio, parte de mi decisión de seguir adelante con esto es por todo lo que platicamos, me demostró que se puede seguir trabajando en la ciencia, formar una familia, ser mama y tener actividades extras, todo al mismo tiempo.

A el **Dr. Jonathan Meseguer**, el culpable de que este aquí haciendo esto. Recuerdo perfectamente cuando fuiste mi maestro en el laboratorio de química orgánica me platicabas con tanta emoción y pasión lo que hacías en el doctorado; fue ahí donde decidí que yo quería hacer lo mismo. Me mandaste a hablar con la Dra.

Waksman y me dio la oportunidad de entrar en su laboratorio, aunque decían que aún no estaba preparada para hacer investigación por el semestre en el que estaba se tomaron el tiempo de enseñarme; fue así como comenzó esta historia. Sé que eres parte de mi comisión, mucho tiempo fuiste mi jefe, pero tú sabes que yo te considero uno de mis mejores amigos. Te quiero mucho John.

A el **Dr. Ricardo Salazar**, aunque siempre me dijo que no tenía nada que ver en este proyecto, siempre fue una parte fundamental. Gracias por el tiempo para escuchar mis dudas, mis aciertos y tragedias en el laboratorio; por permitirme entrar a su laboratorio. Sin duda trabajar con células ha sido de las experiencias más enriquecedoras que he tenido, de no saber ni cómo eran tuvimos que aprender a trabajar con ellas y sacar el trabajo con lo que teníamos a la mano, muchas veces nos equivocamos pero sé que ese laboratorio irá creciendo cada día más.

A el Dr. **Alejandro Pérez**, doctor mil gracias por todo, eres de las personas que más alegría le dan a los laboratorios, es todo un placer trabajar contigo. Espero estar ahí para cuando te den tu premio Nobel, aún tenemos pendiente organizar las próximas elecciones de la reina del pirul.

A la **Dra. Verónica Rivas**, de las personas más locas y divertidas que he conocido, muchas gracias por todo. Espero un día poder elucidar como solo tú lo haces y entender porque los líquidos iónicos son sales y están en forma líquida.

A todos mis maestros la **Dra. Rosalba, Dra. Ma. de la Luz, Dra. Naccha, Dra. Norma, Dra. Rocío Álvarez, Dra. Rocío Castro** por compartirme sus conocimientos.

A la **TLC. Ivonne Carrera** siempre he dicho que tú eres más química que todos nosotros juntos, gracias por ser como mi mamá ahí en el laboratorio, por siempre cuidarme y escucharme cuando necesitaba platicar contigo.

A las **M.C. Graciela Granados** y **M.C. Magda Escobar** por su amistad, somos tan diferentes pero tenemos tanto en común. En ustedes encontré dos amigas excepcionales, con quien platicar, con quien compartir el diario vivir. Las quiero mucho. A el **Dr. David**, gracias por aguantarme y siempre estar dispuesto a enseñarme cuando no sabía que hacer en el laboratorio

A mis compañeros **Elda, Daniela, Cesar, Eduardo, Marcela, Lorena, Omar** y **Tania** por compartir este tiempo conmigo y ofrecerme su amistad. A la **MC. Liliana Torres** por su apoyo incondicional y todo el tiempo que dedicaste a estar ahí conmigo, siempre me tuviste mucha paciencia para enseñarme a trabajar con las células, contestabas todas mis dudas una y mil veces.

A todo el personal de Química Analítica, a **Karina** por su ayuda en el laboratorio y su amistad, a **Selene, Jovana** y **Gloria** por siempre ayudarme cuando las necesitaba.

A **Conacyt** por la beca de manutención con número 289170 y por el proyecto aprobado número 180997.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	
	1.1 El hígado	1
	1.2 Etiología de las enfermedades hepáticas	3
	1.3 Perspectiva actual de las enfermedades hepáticas	4
	1.4 Tratamiento actual de las hepatopatías	5
	1.5 Medicina herbal	6
	1.6 Productos naturales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas	9
	1.7 Plantas medicinales en México	12
	1.8 Actividad Antioxidante y Hepatoprotectora	15
	1.9 Modelos de evaluación biológica para remedios Herbolarios	16
	1.10 <i>Turnera diffusa</i>	20
	1.11 Antecedentes	23
	1.12 Justificación	24
	1.13 Objetivo general	25
	1.14 Objetivos específicos	25
2	MATERIAL Y MÉTODOS	
	2.1 Material, Equipos y Reactivos	26
	2.1.1 Material	26
	2.1.2 Equipo	28
	2.1.3 Reactivos	29
	2.1.4 Material Biológico	30
	2.1.5 Cromatografía en capa fina (CCF)	31
	2.1.5.1 Sistema de elución	31
	2.1.6 Condiciones de elución para los cromatógrafos	31

2.1.6.1	Sistema del Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	31
2.1.6.2	Sistema del Cromatografo Contracorriente	32
2.2	Colecta de material herbal	34
2.3	Obtención de extractos primarios	35
2.3.1	Selección de los extractos a analizar	35
2.4	Determinación de la actividad antioxidante por la técnica del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)	36
2.5	Cultivo celular	37
2.5.1	Mantenimiento de la línea celular HepG2	37
2.5.2	Conteo celular	38
2.5.3	Congelamiento de la línea celular HepG2	39
2.6	Determinación de la citotoxicidad del extracto y compuesto puro	39
2.7	Determinación de la actividad hepatoprotectora del extracto y compuesto puro	41
2.7.1	Modelo de daño con acetaminofén	41
2.7.2	Modelo de daño con CCl ₄	41
2.7.3	Modelo de hepatoprotección	42
2.7.4	Determinación AST	42
2.8	Aislamiento biodirigido	43
2.8.1	Eliminación de clorofilas	43
2.8.2	Cromatografía de líquidos a vacío (VLC)	44
2.8.3	Aislamiento y purificación de los compuestos activos	44
2.8.4	Análisis por HPLC-DAD del compuesto aislado	45
2.8.5	Análisis del compuesto puro por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	45
3	RESULTADOS	
3.1	Colecta del material herbal	46
3.2	Obtención de extractos primarios	46

3.2.1	Selección de los extractos a analizar	47
3.3	Determinación de la actividad antioxidante por la técnica del DPPH	48
3.4	Determinación de la citotoxicidad del extracto	49
3.5	Determinación de la actividad hepatoprotectora del Extracto	52
3.5.1	Modelo de daño con acetaminofén	52
3.5.2	Modelo de daño con CCl ₄	54
3.5.3	Modelo de hepatoprotección	55
3.6	Aislamiento biodirigido	57
3.6.1	Eliminación de clorofilas	57
3.6.2	Cromatografía de líquidos a vacío	61
3.6.3	Aislamiento y purificación del compuesto activo	66
3.6.4	Análisis del compuesto puro por RMN y espectroscopía UV-Vis	68
3.7	Determinación de la actividad hepatoprotectora, antioxidante y citotóxica del compuesto puro	71
3.7.1	Actividad hepatoprotectora del compuesto aislado y mezcla D1-D2	71
3.7.2	Actividad antioxidante del compuesto aislado y mezcla D1-D2	72
3.7.3	Actividad citotóxica del compuesto aislado y mezcla D1-D2	73
4	DISCUSIÓN	74
5	CONCLUSIONES	89
6	PERSPECTIVAS	90
	BILIOGRAFÍA	91

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Plantas del noreste de México utilizadas para las afecciones hepáticas	12
II	Sistema de elución del HPLC-DAD	32
III	Condiciones de llenado del Cromatografo Contracorriente	33
IV	Condiciones de equilibrio del Cromatografo Contracorriente	33
V	Condiciones de corrida del Cromatografo Contracorriente	34
VI	Porcentajes de recuperación de los extractos metanólicos de <i>Turnera diffusa</i> colectas 2012	47
VII	Colectas de <i>Turnera diffusa</i> almacenadas previamente que son candidatos a extracción masiva	47
VIII	Resultados de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH de las colectas seleccionadas y colectas 2012	48
IX	Determinación de la cantidad óptima de células HepG2 por pozo cuando se disuelve el MTT en PBS o medio de cultivo	50
X	Citotoxicidad contra células HepG2 (expresado como CC ₅₀) del extracto metanólico de <i>Turnera diffusa</i>	52
XI	Evaluación del daño generado por las tres concentraciones de acetaminofén sobre células HepG2	53
XII	Evaluación del daño generado por las seis concentraciones de CCl ₄ sobre células HepG2	54
XIII	Ensayo de hepatoprotección del extracto metanólico de <i>Turnera diffusa</i>	56
XIV	Ensayo de hepatoprotección de las fracciones obtenidas de la eliminación de clorofilas	59
XV	Citotoxicidad contra células HepG2 (expresado como CC ₅₀) de las fracciones 50% MeOH y 70% MeOH	60
XVI	Ensayo de hepatoprotección de las fracciones generadas de la VLC	64
XVII	Ensayo de hepatoprotección del compuesto D1 y mezcla D1-D2	71
XVIII	Actividad antioxidante del compuesto D1 y mezcla D1-D2	73
XIX	Citotoxicidad contra células HepG2 (expresado como CC ₅₀) del compuesto D1 y mezcla D1-D2	73

XX	Comparación de los desplazamiento químicos de ^1H	84
XXI	Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación de la ubicación anatómica del hígado	2
2	Historia natural de la obesidad y las diferentes hepatopatías	5
3	Distribución del origen de los nuevos fármacos aprobados en los últimos 30 años	8
4	<i>Silibum marianun</i>	10
5	Compuestos principales de la silimarina	11
6	Mecanismo de acción del CCl ₄	19
7	<i>Turnera diffusa</i>	20
8	Flavonoides aislados de <i>T. diffusa</i>	21
9	Cámara de Neubauer	38
10	Reacción de reducción del MTT a formazán	40
11	Reacción de cuantificación de la AST	43
12	Cromatograma del extracto metanólico de <i>T. diffusa</i> MarínNov'08	49
13	Determinación de la cantidad óptima de células HepG2 por pozo cuando se disuelve MTT en PBS	50
14	Determinación de la cantidad óptima de células HepG2 por pozo cuando se disuelve MTT en medio de cultivo	51
15	Evaluación del daño generado por las tres concentraciones de acetaminofén sobre células HepG2	53
16	Evaluación del daño generado por las seis concentraciones de CCl ₄ sobre células HepG2	55
17	Ensayo de hepatoprotección del extracto metanólico de <i>T. diffusa</i>	56
18	Cromatograma de la Fr. 50% MeOH	57
19	Cromatograma de la Fr. 70% MeOH	58
20	Cromatograma de la Fr. MeOH	58
21	Ensayo de hepatoprotección de las fracciones obtenidas de la eliminación de clorofilas	60
22	Cromatograma de la Fr. CH ₂ Cl ₂	61
23	Cromatograma de la Fr. AcOEt	62

24	Cromatograma de la Fr. AcOEt:MeOH	62
25	Cromatograma de la Fr. MeOH	63
26	Ensayo de hepatoprotección de las fracciones obtenidas de la VLC	65
27	CCF de las fracciones obtenidas de una columna de CCC	66
28	CCF de las fracciones concentradas de los compuestos mayoritarios	67
29	Cromatograma de una de las fracciones concentradas (Mezcla D1-D2)	67
30	Cromatograma del compuesto aislado D1	68
31	Espectro UV-Vis del compuesto D1	68
32	Espectro ¹ H RMN del compuesto D1	69
33	Espectro ¹³ C RMN del compuesto D1	69
34	Estructura del compuesto D1	70
35	Ensayo de hepatoprotección del compuesto D1 y mezcla D1-D2	72
36	Relación entre los diferentes agentes hepatotóxicos y los EROs	76
37	Estructura de las Flavonas: Apigenina y Luteolina	87

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

DPPH	2.2-difenil-1-picril-hidrazilo
AcOEt	Acetato de etilo
AFTA	Ácido trifluoroacético
ALT	Alanino aminotransferasa
α	Alfa
AST	Aspartato aminotransferasa
β	Beta
CO₂	Bióxido de carbono
MTT	Bromuro de metil-tiazol-terazolio
PBS	Buffer de fosfatos en solución salina
BuOH	Butanol
BHT	Butil hidroxitolueno
cm	Centímetro
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
VLC	Columna de líquidos a vacío
CC₅₀	Concentración citotóxica 50
CE₅₀	Concentración efectiva 50
CCC	Cromatografía Contracorriente
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos
CCF	Cromatografía en capa fina
DMSO	Dimetil sulfóxido
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EtOH	Etanol
rf	Factor de retardo
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio
FDA	Food and Drug Administration
°C	Grado centígrado

g	Gramo
hrs	Horas
kg	Kilogramo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MHz	Mega Hertz
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imina
nm	Nanómetro
NAD+	Nicotinamina adenina dinucleótido
NAPH	Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato
C-18	Octadecilsilano
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹³CRMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
¹HRMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
CCl₄	Tetracloruro de carbono
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

UI/L

Unidades Internacionales por litro

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo, pesa aproximadamente 1.3 kg, está situado en el hipocondrio derecho dentro de la cavidad abdominal (Figura 1). Se divide en 2 lóbulos, cada uno constituido por cuatro segmentos. La función principal de este órgano es sintetizar una gran variedad de proteínas del cuerpo y actuar como centro de desintoxicación para los múltiples subproductos metabólicos tóxicos endógenos al cuerpo y las toxinas ingeridas accidentalmente. Cuenta con un importante suministro de oxígeno a través de la arteria hepática, además la vena porta proporciona nutrientes, compuestos endógenos y otras sustancias que son absorbidas desde el intestino (Méndez-Sanchez et al., 2003).

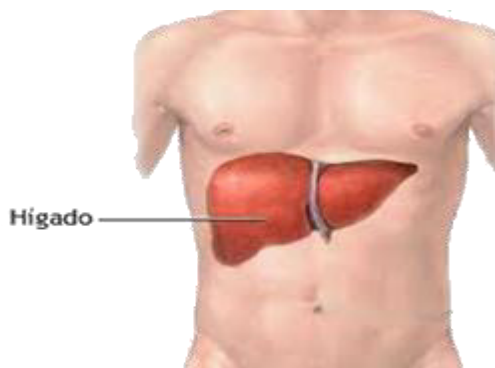


Figura 1. Representación de la ubicación anatómica del hígado

Éste órgano está constituido principalmente por cuatro tipos de células: los hepatocitos que son la máquina biosintética del hígado, las células endoteliales que sirven como barrera entre la sangre y los hepatocitos, las células de Kupffer las cuales funcionan como macrófagos y las células estelares que almacenan grasa y vitamina A. El hígado lleva a cabo múltiples funciones, como la formación y excreción de bilis, síntesis de proteínas, detoxificación de xenobióticos y compuestos endógenos, así como regulación de la glucosa sanguínea. A menudo el daño hepático se relaciona con la desregulación de alguna de las funciones del órgano. (Pineiro-Carrero et al. 2004, Hiraganahalli et al. 2012)

1.2 Etiología de las enfermedades hepáticas

Las enfermedades hepáticas son causadas principalmente por medicamentos o fármacos, ingesta de alcohol, infecciones virales (principalmente por los virus de hepatitis B y C), infecciones parásitas, acumulación excesiva de grasa y desórdenes de tipo autoinmune (Bustíos et al. 2007, Prakash et al. 2009). Estos agentes pueden inducir hepatitis que es un estado de inflamación aguda. Si este estado es persistente, se produce un proceso crónico reversible denominado fibrosis, que es una acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular (incluyendo colágeno tipo I y III); este proceso tiene el propósito de limitar el daño tisular producido por lesiones hepáticas crónicas independientemente de la etiología. La fibrosis ocurre en los sitios de mayor lesión y usualmente requiere que el estímulo dañino persista durante muchos meses o años. (Kershenobich et. al 2003). Si bien este proceso clásicamente se había considerado irreversible, la evidencia clínica y experimental sugiere todo lo contrario. (Prakash et al. 2009, Bataller et al. 2005). La cirrosis es el estado siguiente al que puede evolucionar el hígado si no es resuelta la fibrosis; sin embargo el estadio exacto en que la fibrosis/cirrosis se hace irreversible es desconocido.

Todos estos procesos pueden culminar en carcinoma hepatocelular, en el cual existe un crecimiento no controlado así como pérdida de la función normal de las células que constituyen el órgano. El cáncer hepático es la tercera causa más común de muerte por cáncer en el mundo; entre un 70-90% de los casos

de carcinoma hepatocelular está relacionado con cirrosis y es raramente detectado en etapas tempranas. Sólo el 6-11% de los pacientes con este diagnóstico sobreviven más de 5 años posteriores al diagnóstico. (Larsson et. al 2007). En algunos casos la única alternativa de tratamiento es el trasplante hepático. (Bataller et al. 2005, Kershenobich et al. 2003)

1.3 Perspectiva actual de las enfermedades hepáticas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 46% de las muertes en general es debida a enfermedades crónicas. Datos de la Secretaría de Salud muestran en el informe histórico de estadísticas vitales, nacimientos y defunciones que en 2010 las enfermedades hepáticas fueron la quinta causa de mortalidad con 32,452 defunciones por año, siendo que en 1990 este tipo de enfermedades estaban ubicadas en el noveno lugar. (Secretaría de Salud 2012)

La principal hepatopatía que se presenta en México es la relacionada con el daño hepático producido por el alcohol. En 2010 hubo 12,003 defunciones por enfermedad alcohólica del hígado, solo 1,208 de ellas fue de pacientes femeninas.

Estudios recientes han correlacionado la obesidad y el aumento en el índice de masa corporal con esteatosis, esteatohepatitis no alcohólica y con

hepatocarcinoma, la secuencia y frecuencia de estas se muestran en la figura 2. (Larsson et al. 2007, Hart et al. 2010) La obesidad central, la diabetes mellitus, la resistencia a insulina son factores que predisponen a desarrollar un daño hepático.

En el mundo hay más de 1400 millones de personas con sobrepeso y México ocupa el primer lugar tanto en sobrepeso adulto como infantil (FAO 2013). Debido a estos datos, se cree que en México la cirrosis y el cáncer hepático serán un importante problema de salud y se prevé que las enfermedades hepáticas serán importantes causas de morbi-mortalidad en un futuro cercano. (Torres-González et al. 2011, Méndez-Sánchez et. al 2005)

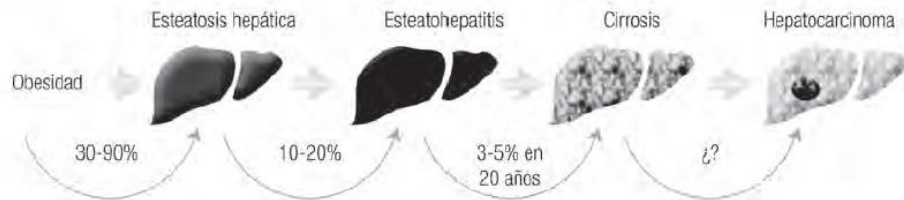


Figura 2. Historia natural de la obesidad y las diferentes hepatopatías

1.4 Tratamiento actual de las hepatopatías

Los esfuerzos hasta ahora empleados para controlar las principales etiologías que afectan al hígado han sido enfocados hacia la concientización del uso de

bebidas alcohólicas para prevenir la cirrosis alcohólica, la aplicación de vacunas para prevenir las hepatitis virales para aquellos casos en que ya se cuenta con vacuna, así como la investigación y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. El aumento en la expectativa de vida con los tratamientos hasta ahora evaluados no ha arrojado resultados satisfactorios, por lo que el descubrimiento de nuevos fármacos efectivos en el tratamiento de las enfermedades hepáticas contribuirá considerablemente en la resolución de este problema en nuestro país en especial y a nivel mundial en general.

1.5 Medicina herbal

Una alternativa que ha demostrado ser una excelente fuente de nuevos fármacos es la medicina herbal, la cual es una práctica que utiliza uno o varios productos derivados de una planta, con fines curativos y/o terapéuticos; este recurso ha sido empleado desde tiempos ancestrales y ha permanecido hasta nuestros tiempos.(Covarrubias-Gómez et al. 2009).

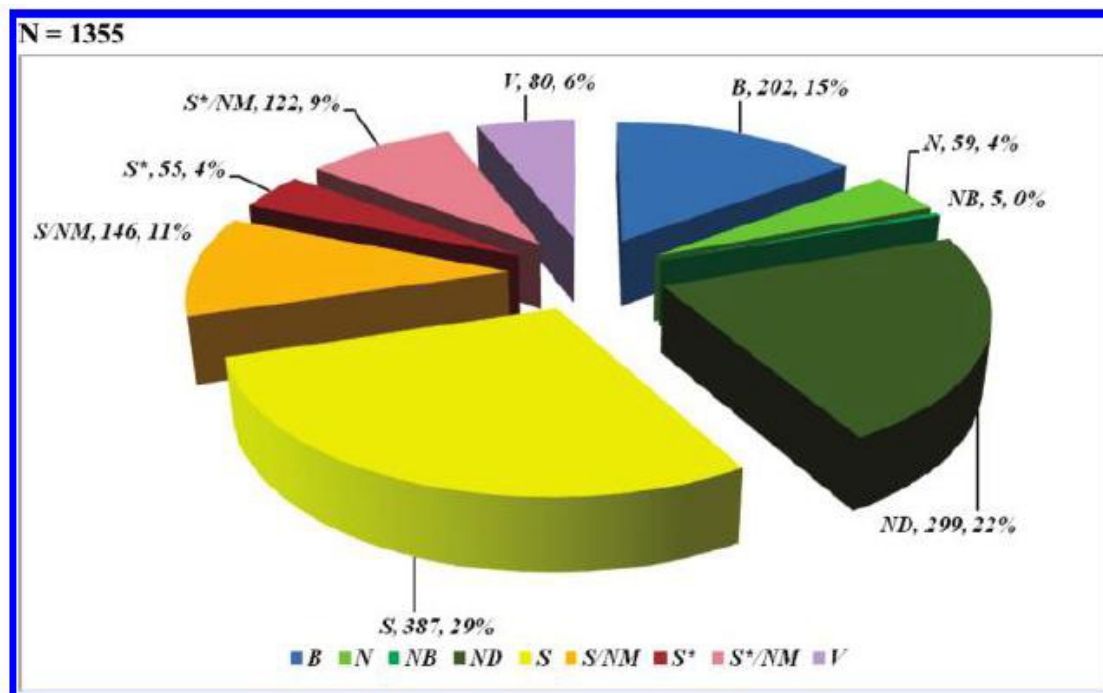
Todos los pueblos primitivos adquirieron información sobre las propiedades medicinales de gran número de plantas propias de su ambiente; estos conocimientos se han acumulado y transmitido de generación en generación y han trascendido a través de las mismas, mediante la descripción de dichas

plantas y su utilidad. Un rico acervo literario es prueba de la importancia que han tenido las plantas en la salud del hombre.

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta. (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx).

Según la OMS del 70 al 80% de la población en países desarrollados ha recurrido alguna vez a una u otra forma de medicina alternativa o complementaria, en donde se incluye la herbolaria. (OMS 2002)

La necesidad de poder tener evidencia científica de la acción de los remedios naturales para curar enfermedades ha llevado a la búsqueda de la o las moléculas responsables de esta acción. Obtener compuestos con actividad biológica a partir de fuentes naturales se ha realizado desde hace mucho tiempo y ha tomado una gran importancia; ejemplo de esto es que el 71% de los 1355 nuevos fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en los últimos 30 años (1981-2010), tienen una relación directa o indirecta con un producto natural (Figura 3). (Newman et al. 2012)



- B Biológica, por lo general un gran péptido o proteína (> 45 residuos), ya sea aislado de un organismo / línea celular o producidos por medios biotecnológicos en una serie sustituta
- N Producto Natural
- NB Producto Natural Botánico
- ND Derivado de un producto natural y es en general una modificación semisintética
- S*/NM Combinación de S* y Producto Natural Mimic (producto sintético que imita un producto natural)
- S/NM Combinación de S y Producto Natural Mimic (producto sintético que imita un producto natural)
- S Totalmente sintético, a menudo se encuentran por selección aleatoria / modificación de un agente existente.
- S* Hecho por síntesis total, pero el farmacóforo es de un producto natural
- V Vacuna

Figura 3. Distribución del origen de los nuevos fármacos aprobados en los últimos 30 años

En las últimas décadas se ha racionalizado la forma de aislar estos compuestos mediante fraccionamiento biodirigido, para lo cual se consultan previamente

criterios quimiotaxonómicos, etnofarmacológicos, entre otros. Para la selección etnofarmacológica se consultan los usos tradicionales que la población hace de las plantas, y en la selección quimiotaxonómica se hace una relación filogenética de las plantas y de las diferentes rutas biosintéticas mediante las cuales éstas forman metabolitos secundarios (Abreu et al. 2008). Todo esto se realiza para aumentar la probabilidad de encontrar las moléculas bioactivas. En los estudios biodirigidos, el proceso de aislamiento se basa en determinar una actividad específica y seguir el proceso de purificación de las fracciones que presentan mejor actividad.

1.6 Productos naturales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas

Un ejemplo de un producto natural mundialmente utilizado para el tratamiento de diferentes afecciones hepáticas es *Silybum marianum* (Cardo mariano), planta que pertenece a la familia Asteraceae (Figura 4), nativa del área del Mediterráneo y crece en el sureste de Europa. A partir de las semillas se extrae la silimarina que es un extracto estandarizado al que se le han demostrado diversas actividades farmacológicas como: hepatoprotectora, anti-inflamatoria, anti-cancerígena y cardioprotectiva (Shamama 2011). El extracto de cardo mariano en 2001 ocupó el lugar número 12 de los 20 productos más utilizados en el mercado de los Estados Unidos y en la actualidad en México se utiliza como suplemento en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.



Figura 4. *Silybum marianum*

El extracto de silimarina está conformado por aproximadamente un 70-80% de “flavonoliganos de silimarina” (mezcla de silibinina A y B, isosilibinina A y B, silidianina y silicristina) y flavonoides (Taxifolina y quercetina), y el resto de un 20-30% consiste en compuestos indefinidos que son polifenoles polimerizados u oxidados (Figura 5). (Shamama et al. 2011)

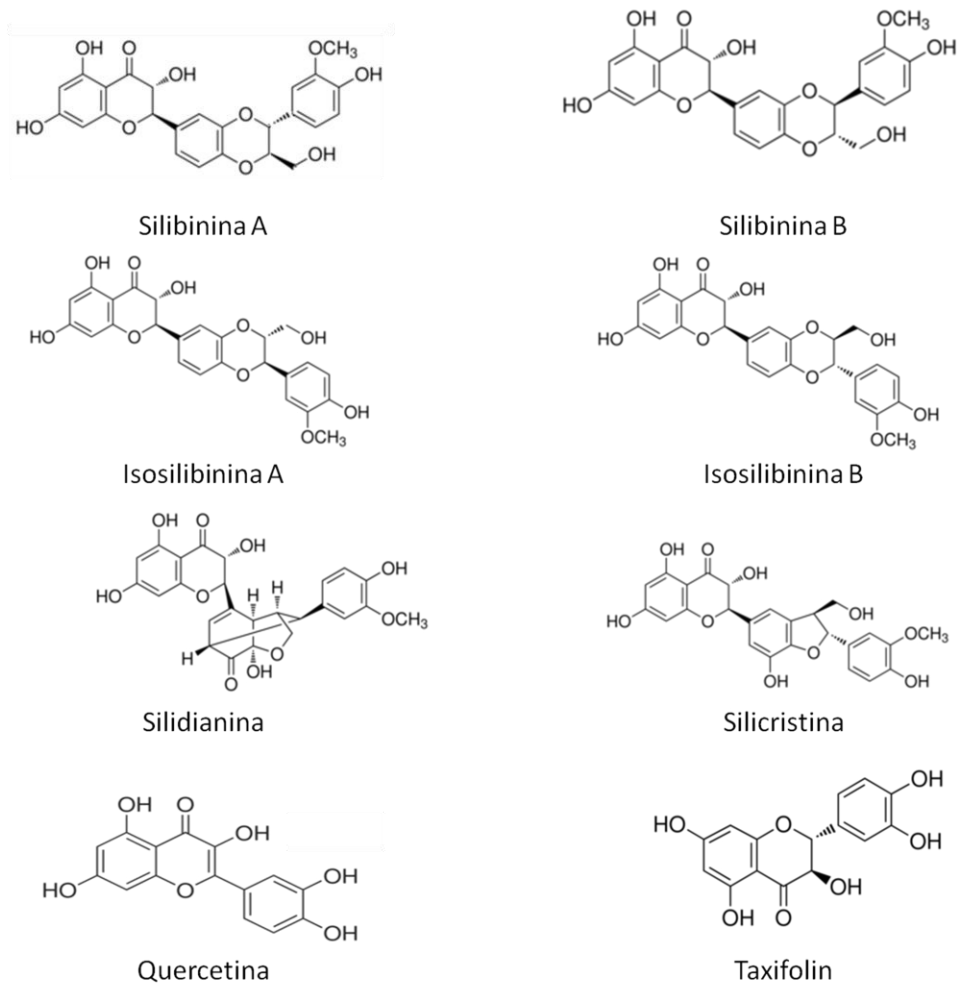


Figura 5. Compuestos principales de la silimarina

La silimarina tiene varias propiedades benéficas con atractivo potencial terapéutico para las enfermedades hepáticas producidas por alcohol, así como efectos en la regeneración hepática y en la fibrogénesis hepática, también actúa previniendo la peroxidación lipídica e inflamación. (Shamama 2011)

1.7 Plantas medicinales en México

En México se han inventariado cerca de 4500 plantas medicinales, se conoce que cerca del 80% de la población mexicana utiliza estas plantas para el alivio de sus enfermedades. De la gran mayoría de las plantas medicinales mexicanas no existen estudios científicos que sustenten su acción, se estima que solo el 10% de éstas se han estudiado.

Existen diferentes reportes de plantas del norte de México que se utilizan tradicionalmente para el tratamiento de afecciones hepáticas ejemplo de estas se muestran en la tabla I. (Covarrubias-Gómez et al. 2009, Adame 2000, Torres-González et al. 2011)

Tabla I. Plantas del noreste de México utilizadas para las afecciones hepáticas

Planta	Familia	Nombre común	Parte usada
<i>Arachis hypogea</i>	Papilionáceas	Cacahuate Maní	Aceite de cacahuate
<i>Brickellia cavanillesii</i>	Compuestas	Hámula Monterrey Ámula Prodigiosa	Hojas
<i>Cacalia decomposita</i>	Compuestas	Matarique Maturín	Rizomas y raíz
<i>Capriola dactylon</i>	Gramináceas	Grama Pata de gallo	Toda la planta

<i>Cecropia obtusifolia</i>	Moráceas	Chancarro Guarumo	Hojas
<i>Centaurea americana</i>	Asteráceas	Chancero alegre Flor de canasta Cardo	Semillas y hojas
<i>Chicorium intybus</i>	Asteráceas	Achicoria Ahuirón	Hojas y raíz
<i>Cirsium benedictus</i>	Papavaráceas	Cardo Santo	Toda la planta
<i>Coleosanthus squarrosus</i>	Asteráceas	Prodigiosa Gobernadora de Puebla	Hojas
<i>Condalia obtusifolia</i>	Ramnáceas	Abrojo Chaparro prieto	Hojas
<i>Conyza filaginoides</i>	Compuestas	Simonillo Hierba amarga	Parte aérea
<i>Cynara scolymus</i>	Compuestas	Alcachofa	Hojas y corazón
<i>Equisetum spp.</i>	Equisatáceas	Cola de caballo Bejuquillo	Tallo
<i>Eupatorium collinum</i>	Compuestas	Hierba del ángel	Hojas
<i>Foeniculum vulgare</i>	Umbelíferas	Hinojo	Raíz, ramas, hojas y semillas
<i>Juglans mollis</i>	Jyglandaceas	Nogal Nogal encarcelado Nogal blanco	Hojas y corteza

<i>Krameria ramosissima</i>	Krameriaceas	Zarzaparilla	Raíz
<i>Leucophyllum frutescens</i>	Scrophulariaceae	Cenizo Hierba ceniza Palo cenizo	Hojas
<i>Marrubium vulgare</i>	Labiadas	Marrubio	Ramas
<i>Medicago sativa</i>	Pailonáceas	Alfalfa	El jugo
<i>Nespilus germanica</i>	Rosáceas	Níspero	Hojas
<i>Opuntia imbricata</i>	Cactaceas	Coyonoistle	Frutos
<i>Parthenium incanun</i>	Compuestas	Mariola	Hojas
<i>Quassia amara</i>	Simarubáceas	Cuasia	Madera
<i>Rhamus purshiana</i>	Ramnáceas	Cáscara Sagrada	Corteza
<i>Sacchramun officinarum</i>	Poáceas	Caña de azúcar	El jugo
<i>Salvia officinalis</i>	Labiadas	Salvia	Hojas y ramas
<i>Smilax medica</i>	Liláceas	Zarzaparrilla Cerveza de raíz	Raíz
<i>Taraxacum officinalis</i>	Compuesta	Diente de león Amargón	Hojas y raíz
<i>Thymus vulgaris</i>	Labiadas	Tomillo	Toda la planta

<i>Turnera diffusa</i>	Turneráceas	Damiana Hierba del venado Hierba de la loma	Parte aérea
------------------------	-------------	---	-------------

1.8 Actividad Antioxidante y Hepatoprotección

Los antioxidantes son compuestos que poseen la capacidad de evitar el daño oxidativo que puede causar 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. Una gran cantidad de estos compuestos se presentan en el reino vegetal en forma de compuestos polifenólicos. (Torres et al. 2006, Cos et al. 2000)

Actualmente se ha relacionado la actividad antioxidante y hepatoprotectora de diversas plantas y compuestos; hay diversos reportes en los cuales se ha demostrado que extractos y compuestos aislados que muestran actividad antioxidante, presentan también actividad hepatoprotectora. (Hiraganahalli DB et al. 2012, Rupeshkumar et al. 2011, Krithika et al. 2009, Naira et al. 2012)

Esto se puede deber a que el estrés oxidativo producido en la esteatohepatitis no alcohólica, en enfermedad hepática por virus C y en la enfermedad hepática por alcohol genera especies reactivas de oxígeno (EROs). Es bien conocido que las EROs inician la peroxidación lipídica, modulan vías de señalización

actuando sobre enzimas sensibles al estado óxido-reducción, afectan organelos factores de transcripción, proteínas y ácidos nucleicos; causando la destrucción celular.

1.9 Modelos de evaluación biológica para remedios herbolarios

Para la evaluación de la actividad biológica de los productos naturales ya sean extractos o compuestos puros existen modelos *in vitro* e *in vivo*. La gran mayoría de los reportes de ensayos de hepatoprotección utilizan modelos *in vivo*, en especial en modelos murinos; pero cuando se propone realizar un aislamiento biodirigido es necesario un modelo fácil de realizar, económico y rápido, entre otras cosas.

Referente a los sistemas *in vitro*, las líneas celulares de tumores humanos han sido extensamente utilizadas como modelos de varias enfermedades. Debido a que el hígado es el órgano central en el metabolismo de drogas y es el primer blanco de patogénesis relacionado con las mismas, el uso de las líneas celulares derivadas de hepatoma humano tales como HepG2, Huh-7, Hep3B, FOCUS y SK-Hep1 pueden ser utilizadas para evaluar el efecto hepatoprotector de productos naturales. (Kikkawa et al. 2005)

Las líneas celulares presentan las ventajas de que permiten realizar múltiples experimentos en los cuales las variables pueden ser controladas, las dosis de

estudio puede ser modificadas, se pueden hacer varias réplicas de un experimento para demostrar la reproducibilidad y también ayudan a eliminar un gran número de extractos, fracciones o compuestos puros que no son activos reduciendo significativamente el número de animales para una investigación. A su vez, las células permiten investigar las vías de señalización y los mecanismos moleculares de acción del compuesto de interés.

En los modelos *in vitro*, para la inducción del daño hepático celular se puede utilizar acetaminofén, tetracloruro de carbono (CCl₄), alcohol ter-butílico, D-galactosamina, entre otras sustancias. (Vaishali et al. 2011, Hiraganahall et al. 2011, Rupeshkumar et al. 2012, Abhay et al. 2012)

El acetaminofén es un analgésico antipirético seguro y eficaz a dosis terapéuticas, sin embargo una sobredosis de acetaminofén puede causar lesiones hepáticas graves. El mecanismo de daño hepático se inicia por el N-acetil-p-benzoquinonemina (NAPQI) generado por el Citocromo P450, el NAPQI es altamente reactivo y genera estrés oxidativo, disminuye el glutatión y promueve la formación de enlaces disulfuro inter-cadena, enlaces cruzados inter-proteína, impide la respiración mitocondrial, e interfiere con la homeostasis del calcio; así como la formación de EROs tales como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, especies reactivas de nitrógeno y productos de reacción de peroxidación. (Zhao et al. 2012, James et al. 2003)

El CCl₄ se acumula en las células hepáticas y es metabolizado por el sistema Citocromo P450 dependiente de monooxigenasas, generando metabolitos

tóxicos y reactivos que causan lesiones en este órgano. Después de la biotransformación se generan los radicales libres $\text{CCl}_3\cdot$ y/o $\text{CClOO}\cdot$, éstos pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo, tales como glutatión (GSH) y tioles de proteínas. La unión covalente de los radicales libres triclorometilo a las proteínas celulares se considera que es la etapa inicial en una cadena de acontecimientos que finalmente conducen a la peroxidación de los lípidos de membrana y, finalmente, a la necrosis celular (Figura 6). (Yong et al. 2007, Pei et. al 2012)

El CCl_4 causa elevación de las transaminasas (aspartato aminotransferasa AST y alanino aminotransferasa ALT), así como de malondialdehído por la inducción de la peroxidación lipídica y consumo de los antioxidantes intracelulares en la célula para contrarrestar el efecto, como por ejemplo: la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión, glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

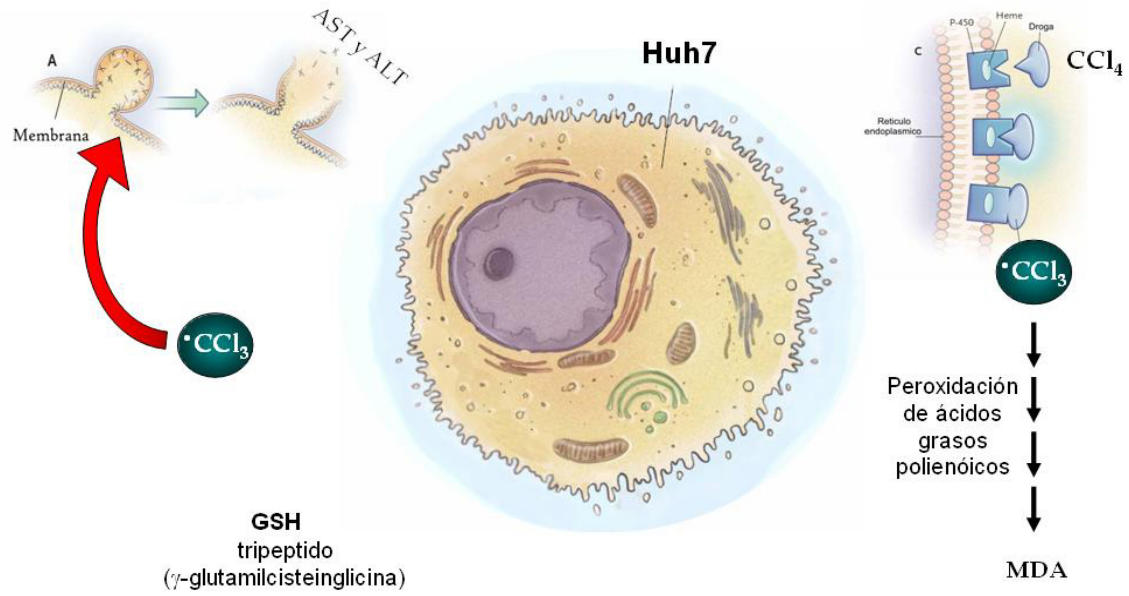


Figura 6. Mecanismo de acción del CCl_4

Un incremento significativo de los niveles de estas enzimas es indicativo de daño celular. Las transaminasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino de los aminoácidos a los cetoácidos. La AST se encuentra en concentraciones altas en el músculo cardiaco, las células hepáticas y células de musculo esquelético e igualmente, en menor grado, en otros tejidos. Aunque un nivel elevado de AST en el suero no es específico de enfermedad hepática, se usa principalmente para diagnosticar y controlar el curso de esta enfermedad, en combinación con otras enzimas como la ALT, fosfatasa alcalina y bilirrubina, por lo que puede ser un buen marcador bioquímico para monitorear el daño hepático.

1.10 *Turnera diffusa*

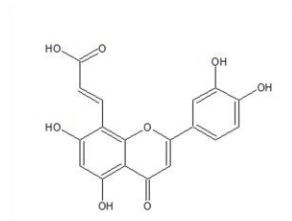
Daminana (*Turnera diffusa*) es una planta herbácea de la familia de las Turneráceas que mide 30-70 cm de altura. Su tallo es ramoso con hojas alternas, ovaladas y aromáticas. Las flores son pequeñas de color amarillo o blanco. Crece desde en regiones subtropicales de América y África (Figura 7). (Adame 2000)

Es usada a nivel popular 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 tónico cerebral. (Adame 2000, Alcaráz L, et al. 2004, Godoi et al.2004, Taha et al.2012, Zhao et al. 2008).

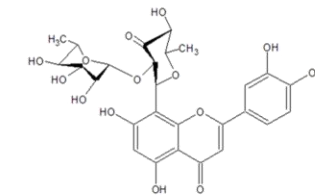


Figura 7. *Turnera diffusa*

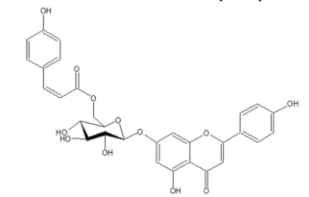
De esta planta se han aislado e identificado algunos compuestos como: cineol, α y β -pinenos, *p*-cimeno, timol, sesquiterpenos (alfa-copaeno, delta-cadieno, calameneno), taninos, eterósidos hidroquinónicos, robutósido, esterósidos cianogénicos, alcaloides, beta-sitosterol, damianina (principio amargo), entre otros. (Adame 2000)(Alcaráz et al. 2004)(Domínguez 1978). Además es una planta rica en flavonoides; Zhao et. al en 2007 reportó el aislamiento de un grupo importante de flavonoides glicosilados derivados de luteolina, apigenina, siringetina y laricitina (Figura 8).



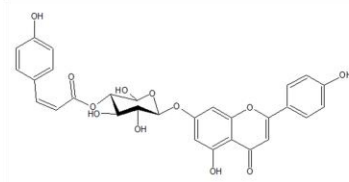
Ácido luteolin 8-C-E-propenoico



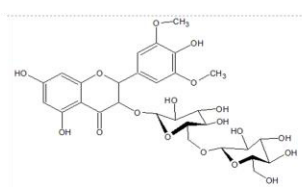
Luteolin 8-C- β -[6-deoxy-2-O-(α -L-ramnopiranosil)-xylo-hexopiranos-3-ulosido]



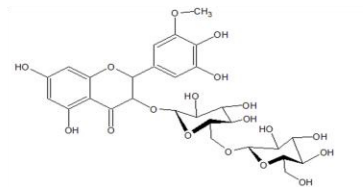
Apigenin 7-O-(6''-O-p-Z-coumaroil- β -D-glucopiranosido)



Apigenin 7-O-(4''-O-p-Z-coumaroil- β -D-glucosido)



Siringenin 3-O-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido]



Laricitin 3-O-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido]

Figura 8. Flavonoides aislados de *T. diffusa*

Uno de estos flavonoides, el derivado de luteolina, presentó mejor actividad antioxidante que la del butil hidroxitolueno (BHT) y similar a la de la quercetina.
(Pérez-Meseguer et al. 2010)

1.11 Antecedentes

Un antecedente directo de esta tesis es un estudio realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y la Unidad de Hígado del Hospital “Dr. José Eleuterio González” ambos de la UANL, en el cual se determinó la actividad hepatoprotectora de cuatro plantas de la región noreste de México; las plantas evaluadas fueron *T. diffusa*, *Krameira ramosissima*, *Juglans mollis* y *Centaurea americana*. En este trabajo se demostró que los extractos de *Centaurea americana* (flor y hoja-tallo), *T. diffusa* (parte aérea) y *Juglans mollis* (corteza y hoja) reducían significativamente ($P < 0.001$) los niveles de daño en las células hepáticas en un modelo *in vitro*, por lo que se consideraron excelentes candidatos para aislar posibles compuestos hepatoprotectores. (Torres-González 2011).

1.12 Justificación

Debido a la prevalencia que tienen las enfermedades hepáticas en México y en el mundo y que las proyecciones a futuro indican que estas enfermedades aumentarán; es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de este grupo de enfermedades.

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades hepáticas tiene una larga tradición, pero hay una carencia de estudios básicos que corroboren dicho uso en México, y son escasas las moléculas responsables de esta acción que han sido aisladas.

Por lo que creemos que es importante el estudio de la actividad hepatoprotectora de las plantas de la región de las cuales se tenga indicios que se utilizan para afecciones hepáticas, así como aislar y purificar compuestos de éstas como posibles alternativas de tratamiento. Para lograr esto es importante el desarrollo y puesta a punto de modelos *in vitro* de hepatoprotección, que consideren la evaluación de parámetros bioquímicos

1.13 Objetivo general

Aislar, purificar e identificar, por medio de aislamiento biodirigido, la o las moléculas responsables de la acción hepatoprotectora a partir del extracto metanólico de *T. diffusa*

1.14 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico obtenido a partir de *T. diffusa*
2. Aislar el o los compuestos con mejor actividad
3. Caracterizar el compuesto asilado por métodos espectroscópicos
4. Evaluar la actividad biológica del compuesto aislado

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, Equipos y Reactivos

2.1.1 Material

- Acrodiscos de poro de 0.2 μm membrana de nylon marca Pall Life Sciences
- Cajas de cultivo celular T-25 y T-75 marca Corning con filtro en la tapa
- Cajas para criotubos con capacidad de 25 marca VWR
- Cámara de Neubauer
- Capilares de 10 μL marca Drummon Wiretrol
- Cartucho de SPE C₁₈ 1000 mg/8 mL marca Alltech
- Celda de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico marca Sigma
- Columna HPLC fase inversa de octadecilsilano C-18 AccQTag 3.9x150 mm, tamaño de partícula de 4 μm marca Watters
- Criotubos de 2 mL de capacidad marca Nalgene
- Cromatoplasmas de sílica gel 60F₂₅₄ 20x20 marca Merck
- Cubas cromatográficas de 121x108x80 mm
- Embudo hirsch Pyrex tamaño de poro M (10-15) de 160 mL

- Espátulas para polvos
- Frascos de vidrio ámbar de boca ancha con tapa
- Gradillas
- Jeringas estériles desechables de 1 mL y 5 mL de capacidad
- Licuadora de 7 velocidades, vaso de vidrio marca Licuaturbo man
- Matraces bola de 50 mL, 100 mL y 500 mL con boca esmerilada 24/40 marca Pyrex
- Matraces Erlenmeyer de 125 mL, 250 mL y 500 mL marca Pyrex
- Matraces Kitazato de 250 mL
- Papel filtro Whatman # 40
- Pipetas automáticas de 100-100 mL, 20-200 mL y 1-20 mL marca Eppendorf y Accumax Pro
- Pipetas pasteur
- Pipetas serológicas de 5 mL, 10 mL y 25 mL estériles marca VWR
- Pipetor automático marca VWR
- Placas de 6 pozos de fondo plano, estériles y con tapa marca Corning
- Placas de 96 pozos de fondo plano, estériles y con tapa marca Corning
- Placas de porcelana de 12 pozos
- Probetas de 25 mL, 50 mL y 250 mL marca Pyrex
- Puntillas de 100-1000 mL, 20-200 mL y de 1- 20 mL marca Eppendorf
- Tubos cónicos de 15 mL y 50 mL estériles con tapa marca Corning
- Tubos de ensayo 13 x 100 marca Pyrex y Kimax
- Tubos de poliestireno de 5 mL estériles y con tapa marca VWR
- Tubos eppendorf ambar de 1.5 mL de capacidad marca Eppendorf
- Tubos eppendorf claros de 1.5 mL de capacidad marca Eppendorf

- Vasos de precipitado de 10 mL, 50 mL, 250 mL, 600 mL y 1000mL marca Pyrex

2.1.2 Equipo

- Autoclave marca Market Forge Sterilmatic
- Balanza analítica marca AND modelo GR-120
- Bomba de vacío Gast de 1 caballo de fuerza
- Campana de extracción Lumistell CEE-120
- Campana de flujo laminar marca Prendo modelos CSB 120
- Centrífuga ECMicro-MB
- Centrífuga refrigerada marca Thermo modelo Centra CI3R
- Colector de fracciones BioRad Modelo 2128
- Cromatógrafo contracorriente Dynamic extractions
- Detector Agilent Technologies 1260 infinity
- Enfriador y Recirculador Hdake k20
- Espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 7500
- Horno de calentamiento a 37°C Bluem
- HPLC Waters 600 con automuesteador Waters 717 plus y detector de arreglo de diodos Waters 2996
- Incubadora marca Thermo modelo MIDI 40
- Invertoscopio Southern Precisión Instrument
- Lámpara ultravioleta
- Lector de placas marca KontroLab

- Microscopio con objetivos 4X, 10X, 40X y 100X marca Eagle modelo CM 240
- Placa de calentamiento Cimarec 2
- Refrigerador Daewoo
- RMN marca Bruker modelo Avance DPX400 de 400MHz
- Rotavapor Heidolph Laborota 4000-efficient
- Sheaker marca Heidolph modelo Unimax 1010
- Sonicador Branson 2510
- Vortex VWR Scientific Products

2.1.3 Reactivos

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) marca Sigma
- Acetato de etilo (grado analítico) Marca Fermont
- Ácido acético Marca Fermont
- Ácido fórmico Marca Fermont
- Ácido trifluoroacético Marca Fermont
- Agua bidestilada
- Agua destilada
- Antibiotico Penicilina – Estreotomicina (10 000 unidades/mL – 10 000 µg/mL) 10 X marca Gibco
- Aspartato AminoTransferasa marca Instrumentation laboratory
- Azul tripano 0.4% probado para cultivo celular marca Sigma
- Bromuro de tiazol azul tetrazolium (MTT) marca Sigma
- Buffer de fosfatos en solución salina (PBS) marca Sigma

- Butanol (Grado analítico) Marca Fermont
- Cloruro de metileno (Grado analítico) Marca Fermont
- Dimetil sulfóxido probado para cultivo celular marca Sigma
- Doxorubicina hidrociorada marca Sigma
- Etanol (Grado analítico) Marca Fermont
- Hexano (Grado analítico) Marca Fermont
- L-Glutamina 200mM 100X marca Gibco
- Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Advanced) Marca Gibbco
- Metanol (grado analítico) Marca Fermont
- Metanol (HPLC) Marca Tedia
- Metanol- *d*4 100% D marca Aldrich
- Nitrógeno gas de alta pureza grado 5.0 marca AGA
- Nitrógeno líquido
- Quercetina marca TCI America
- Silibinina Marca Sigma
- Sílica gel 60G para cromatográfica en capa fina Marca Merck
- Suero feral bovino marca Gibco
- Tetracloruro de carbono (Grado reactivo) Marca Sigma
- Tripsina 0.25% 1x marca Gibco

2.1.4 Material Biológico

Se utilizó la línea celular HepG2 (ATCC), la cual es un hepatocarcinoma humano.

2.1.5 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizaron cromatoplasmas base aluminio de sílica gel 60F₂₅₄ las que se cortaron del ancho necesario por 7 cm de altura. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta a 254 nm.

2.1.5.1 Sistema de elución

El sistema de elución estaba formado por una mezcla de acetato de etilo (AcoEt): ácido fórmico: ácido acético: agua en una proporción de (25:1:1:3)

2.1.6 Condiciones de elución para los cromatógrafos

2.1.6.1 Sistema del Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

Se trabajó en un HPLC-DAD con una columna AccQTag 3.9x150 mm de fase inversa octadecilsilado (C-18) y tamaño de partícula de 4 µm, ambos marca Waters bajo las condiciones reportadas por Garza-Juárez et. al en 2011 . Se inyectaron 10 µL de la muestra disuelta en metanol (MeOH). El sistema de elución se muestra en la tabla II. La fase móvil se formó por mezcla de ácido trifluoroacético (AFTA) al 0.1% y MeOH, se desgasificó y filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm, el caudal de la fase fue de 0.4 mL/min. Antes de la primera inyección, la columna se acondicionó por una hora con la fase móvil en las condiciones iniciales, los últimos diez minutos del sistema de elución fueron para volver a equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.

Tabla II. Sistema de elución del HPLC-DAD

Tiempo	%A 0.1% AFTA	%B MeOH
0	70	30
25	30	70
30	30	70
35	70	30
45	70	30

2.1.6.2 Sistema del Cromatógrafo Contracorriente.

Se trabajo con una columna de teflón de 19 mL, la columna se mantuvo refrigerada a 30°C y centrifugada a 2100 revoluciones por minuto (rpm). La mezcla de solventes se formó en la forma conocida como “en demanda”. Para generar los sistemas de solventes utilizados se contó con ayuda del personal de Dynamic Extractions

Las condiciones de llenado se muestran en la tabla III.

Tabla III. Condiciones de llenado del Cromatografo Contracorriente

Tiempo	Flujo mL/min	% A Hexano	%B Metanol	%C Butanol	%D Agua
0	3	1	0	9	90
10	3	1	0	9	90
10.1	0	1	0	9	90

Una vez llenado se encendió la centrifuga y ésta se mantuvo hasta terminar el sistema de corrida. Las condiciones de equilibrio se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Condiciones de equilibrio del Cromatografo contracorriente

Tiempo	Flujo mL/min	% A Hexano	%B Metanol	%C Butanol	%D Agua
0	1	88	0	12	0
15	1	88	0	12	0
15.1	0	88	0	12	0

Ya equilibrada la columna e inyectada la muestra se comenzó el programa de corrida, las condiciones de corrida se muestran en la tabla V.

Tabla V. Condiciones de corrida del Cromatografo contracorriente

Tiempo	Flujo mL/min	% A Hexano	%B Metanol	%C Butanol	%D Agua
0	1	88	0	12	0
60	1	15	0	75	10
75	1	15	0	75	10
75.1	3	1	0	9	90
85	3	1	0	9	90
85.1	0	1	0	9	90

2.2 Colecta de material herbal

Las colectas de *T. diffusa* se llevaron a cabo en los meses de Septiembre y Noviembre de 2012 en el municipio de Zuazua, Nuevo León. Se obtuvo únicamente la parte aérea de la planta.

Los especímenes colectados se pusieron a secar a temperatura ambiente hasta que mantuvieron peso constante; posteriormente se mandaron autenticar en el Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde quedaron registradas con el número 23569.

2.3 Obtención de extractos primarios

Se realizaron extractos metanólicos de la parte aérea de *T. diffusa* a baja escala y de la colecta seleccionada se realizó la extracción masiva. Para la extracción a baja escala se pesaron 5 g de material seco y molido de la planta y se extrajo con 15 mL de MeOH, agitando durante 5 min a temperatura ambiente; este proceso se realizó por triplicado. Los extractos obtenidos se juntaron, filtraron y evaporaron a presión reducida a una temperatura controlada de 37°C.

Para la extracción masiva se pesaron 500 g de material seco y molido de la planta y se extrajo con 800 mL de MeOH, agitando durante una 1 hora a 200 rpm y temperatura ambiente, este proceso se realizó por triplicado. Los extractos obtenidos se juntaron, filtraron y evaporaron a presión reducida a una temperatura controlada de 37°C.

Los extractos obtenidos se almacenaron en refrigeración (4 °C) en frascos color ámbar en atmosfera de nitrógeno gaseoso hasta su posterior uso.

2.3.1 Selección de los extractos a analizar

De la colección de extractos y colectas de *T. diffusa* que se tiene en el Departamento de Química Analítica, se seleccionaron aquellos de los cuales se tuviera más de 300 g de planta seca o más de 50 g de extracto y que hubieran presentado buena actividad antioxidante cuando se colectó. A las muestras que cumplían con estos requisitos se les determinó la actividad antioxidante.

2.4 Determinación de la actividad antioxidante por la técnica del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

Se realizó según lo reportado por Salazar et al. en 2009, mediante la cual se determina la concentración efectiva 50 (CE₅₀) de compuestos o extractos para reducir el radical DPPH por medio de espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis) a 517 nm.

Se prepararon soluciones de los extractos y del compuesto puro a una concentración de 1 mg/mL en etanol (EtOH). De esta solución se tomó 0.5 mL y se adicionaron 0.5 mL EtOH; a partir de esta solución se realizó una serie de diluciones seriadas (factor 1:2) por once tubos más. A cada uno de los tubos se les agregaron 0.5 mL de DPPH 125 µM y se dejó reposar por 30 min en oscuridad. Se utilizó una serie de once diluciones seriadas (factor 1:2) a partir de una solución de quercetina 1 mg/mL como control positivo y EtOH como blanco.

Cada una de las soluciones se midió espectrofotométricamente a 517nm en una celda de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico y 1mL de capacidad.

Para calcular la CE₅₀ fue necesario calcular el porcentaje de reducción mediante la siguiente ecuación:

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

Los porcentajes de reducción se graficaron versus la concentración de la muestra en cada tubo; del gráfico generado se calculó la ecuación de la recta y se determinó la concentración del extracto necesaria para obtener un 50% de reducción. Cada ensayo se realizó por triplicado y de cada uno se calculó la CE_{50} , posteriormente se obtuvo el promedio de las CE_{50} de los triplicado y la desviación estándar.

El extracto que presentó mejor actividad se seleccionó para realizar el proceso de extracción masiva descrito en el punto 2.3 y realizar a partir del mismo el aislamiento biodirigido.

2.5 Cultivo celular

2.5.1 Mantenimiento de la línea celular HepG2

Se recibió la alícuota de la línea celular HepG2, el vial se descongeló y se propagó en varios frascos de cultivo utilizando medio de cultivo DMEM Advanced con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y 1% de L-Glutamina; una vez que el cultivo llegó a una confluencia del 70-80% se retiró el medio utilizando una bomba de aspiración. Posteriormente las células se lavaron dos veces con buffer de fosfatos en solución salina (PBS); ya lavadas las células se agregó 1 mL de tripsina y se incubó por 5 min a 37°C con 5% de CO_2 .

Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 6 mL de medio de cultivo DMEM con SFB al 10% para neutralizar la tripsina; esta solución se colectó en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm y 25 °C de temperatura.

Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo.

2.5.2 Conteo celular

Para contar la células viables se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular; en un tubo eppendorf se agregaron 20 μL de la suspensión celular a una mezcla de 170 μL de medio y 10 μL de azul tripano.

Se tomó un volumen indefinido de la dilución y se colocó en la cámara de Neubauer por capilaridad. En el conteo solo se tomaron en cuenta las células vivas que se encontraban en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara y que no estuvieran teñidas con el colorante. (Figura 9)

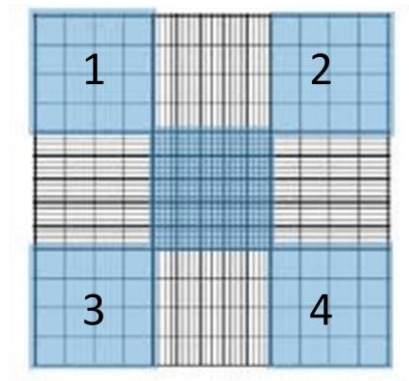


Figura 9. Cámara de Neubauer

EL cálculo del número de células por mililitro se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\# \text{ Células}/_{mL} = \left(\text{Total de células}/_4 \right) (\text{Factor de dilución})(10^4)$$

2.5.3 Congelamiento de la línea celular HepG2

Una vez que se determinó la cantidad de células por mililitro que había en la suspensión celular, se tomó el volumen necesario para tener 1 millón de células.

En un criovial se agregaron 75 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) (con el fin de preservar la membrana celular al almacenar en el nitrógeno líquido) y el volumen necesario de SFB para que al agregar las células se obtuviera 1 mL de solución. Al adicionar se tomó la precaución de homogenizar correctamente la solución.

Inmediatamente se pasó el vial a un baño con hielo y una vez terminado el procedimiento las células se almacenaron en nitrógeno líquido.

2.6 Determinación de la citotoxicidad del extracto y del compuesto puro

La evaluación de la citotoxicidad se realizó por medio de la prueba de reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolium (MTT) según lo descrito por Mossman en 1983. En este ensayo se mide espectrofotométricamente la conversión del MTT a cristales de formazán (un producto violeta) a 540 nm; la reacción de reducción celular implica los cofactores de nucleótidos de piridina $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ y la

enzima mitocondrial deshidrogenasa, que solo ocurre en la células vivas (Figura 10). El producto de formazán es impermeable a la membrana celular, acumulándose dentro de la célula. Los cristales salen de la célula cuando se agrega un agente lisante permitiendo la cuantificación del producto formado. La absorbancia del producto es proporcional a la cantidad de células vivas.

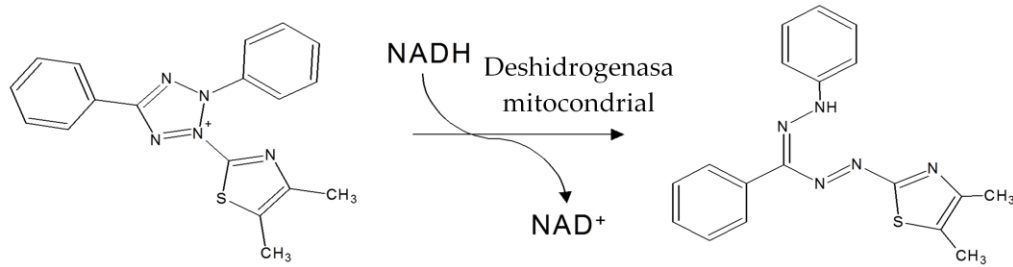


Figura 10. Reacción de reducción del MTT a formazán

El ensayo se realizó con 3000 células/pozo que fue la concentración que resultó la mejor para este experimento, las cuales se adicionaron en placas de 96 pozos; transcurridas 24 hrs se agregaron 100 μL del extracto o compuesto disuelto en medio de cultivo a concentraciones de 500 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

Las células se incubaron por 48 hrs para posteriormente lavar la placa en dos ocasiones con PBS. Después del lavado se agregaron 150 μL de MTT 0.5 mg/mL disuelto en medio de cultivo y se incubó por 3 hrs a 37°C y 5% de CO_2 .

Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 μL de DMSO; se agitó y se leyó espectrofotométricamente a 540 nm en un lector de placas. Como control positivo se utilizó doxorrubicina a diferentes concentraciones (25 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 $\mu\text{g/mL}$ y 0.025 $\mu\text{g/mL}$) y como control negativo células a las que solamente se les agregó medio de cultivo.

2.7 Determinación de la actividad hepatoprotectora del extracto y compuesto puro

2.7.1 Modelo de daño con acetaminofén

Se estableció la dosis necesaria de acetaminofén para inducir el daño en un tiempo determinado de 18 hrs; se evaluaron diferentes concentraciones según lo reportado en la literatura. En placas de 6 pozos se agregaron 1 millón de células/pozo, a las 24 horas de haber agregado las células se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. Las soluciones de acetaminofén se realizaron en PBS y las concentraciones evaluadas fueron 5 mM, 20 mM y 50mM. (Zhao et al. 2012) Transcurridas las 18 hrs de exposición de las células con el acetaminofén se retiró el sobrenadante y fue llevado inmediatamente para cuantificar la enzima aspartato aminotransferasa (AST). Los sobrenadantes se transportaron en baño de hielo para la determinación enzimática.

2.7.2. Modelo de daño con CCl₄

Se estableció la dosis necesaria de CCl₄ para inducir el daño en un tiempo determinado de 2 horas; se evaluaron diferentes concentraciones según lo reportado en la literatura. En placas de 6 pozos se agregaron 1 millón de células/pozo, a las 12 hrs de haber agregado las células se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. Las soluciones de CCl₄ se realizaron en PBS con DMSO al 0.05%; las concentraciones evaluadas fueron 0.1%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.75% y 1% de CCl₄. (Torres-Gonzalez et al. 2011, Hosmann et al. 2013, Rajesh et al. 2009) Transcurridas las 2 hrs de exposición de las células con el CCl₄ se retiró el sobrenadante y fue llevado

inmediatamente para cuantificar la enzima AST. Los sobrenadantes se transportaron en baño de hielo para la determinación enzimática

2.7.3 Modelo de hepatoprotección

La evaluación de la actividad hepatoprotectora se realizó según lo reportado por Torres-González et al. en 2011 con pequeñas modificaciones: En placas de 6 pozos se sembraron 1 millón de células, a las 12 hrs se retiró el medio y se lavaron con PBS. Posterior a esto, se agregaron las soluciones de los extractos o compuestos a evaluar disueltos en PBS a concentraciones de 100 µg/mL, 50 µg/mL y 10 µg/mL y se mantuvieron en condiciones de incubación durante una hora (37 °C y 5% de CO₂). Transcurrido este tiempo se retiraron las soluciones para adicionar el CCl₄; se dejó actuar por 2 hrs en condiciones de incubación, se retiró el sobrenadante y fue llevado inmediatamente para cuantificar la enzima AST. Los sobrenadantes se transportaron en baño de hielo para la determinación enzimática.

2.7.4 Determinación de la AST

Se cuantificó la AST en el equipo Ilab 300 plus con el kit de marca Instrumentation laboratory; la cuantificación se realizó conforme las recomendaciones del proveedor y de la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC) siguiendo la reacción mostrada en la figura 11.

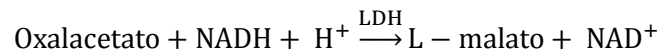
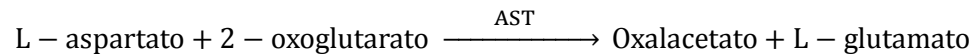


Figura 11. Reacción de cuantificación de la AST

La disminución de la absorbancia debido a la oxidación de NADH a NAD⁺ es directamente proporcional a la actividad de la AST en la muestra. La absorbancia se midió a 340nm.

2.8 Aislamiento biodirigido

2.8.1 Eliminación de clorofilas

La eliminación de clorofilas se realizó por medio de extracción en fase sólida; 1 mL del extracto metanólico se hizo pasar por un cartucho de octadecilsilano (C-18) y éste se eluyó con 8 mL de solución acuosa de metanol al 50%, posteriormente una solución acuosa de metanol al 70% y finalmente metanol 100%. Todas las fracciones se evaporaron a presión reducida a 37°C hasta sequedad.

A las tres fracciones generadas se le determinó la actividad hepatoprotectora (según lo descrito en el punto 2.7.2).

2.8.2 Cromatografía de líquidos a vacío (VLC)

La fracción seleccionada en el apartado anterior para continuar con el aislamiento, se hizo pasar por una columna de líquidos a vacío; 40 g de sílica se empacaron en un embudo Hirsh tamaño de poro M. La muestra (3 g) se mezcló con 5 g de sílica, ya adsorbida la muestra se colocó sobre la columna previamente formada y esta se eluyó con solventes de menor a mayor polaridad cloruro de metileno (CH_2Cl_2), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH. Se pasaron 200 mL de cada una de las soluciones. Todas las fracciones generadas se evaporaron a presión reducida a 37°C

De las cuatro fracciones generadas se determinó la actividad hepatoprotectora (según lo descrito en el punto 2.7.2).

2.8.3 Aislamiento y purificación de los compuestos activos

La fracción de la VLC que resultó con mejor actividad fue sometida a CCC bajo el sistema descrito en el punto 2.7.2; entre 50-100 mg de la fracción se disolvieron con 1 mL de Butanol:Agua (1:1) y se inyectó en el cromatógrafo. Se colectaron fracciones de 1 mL y se analizaron por CCF.

Se seleccionaron las fracciones que contenían los compuestos mayoritarios para enriquecerlas con más fracciones que tenían estos mismos compuestos de otras columnas; las fracciones fueron analizadas por HPLC-DAD para comprobar su pureza.

La fracción enriquecida fue sometida nuevamente a CCC y de ahí se aisló un compuesto.

2.8.4 Análisis por HPLC-DAD del compuesto aislado

El compuesto aislado fue analizado por HPLC-DAD, con el sistema mencionado en el punto 2.1.6.1.

2.8.5 Análisis del compuesto puro por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Al compuesto aislado se le realizaron espectros de UV-Vis, ^1H RMN y ^{13}C RMN. Todos los experimentos de RMN se realizaron utilizando metanol deuterado (MeOD) como solvente.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Colecta de material herbal

Se realizaron dos colectas en los meses de Septiembre y Noviembre de 2012 en los terrenos que rodean la Ex Hacienda San Pedro de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en el municipio de Zuazua, Nuevo León. Las colectas se identificaron como ZuazuaSep´12 y Zuazua Nov´12

Se colectó solamente la parte aérea de la planta. Los especímenes colectados se autentificaron y se pusieron a secar a temperatura ambiente hasta que mantuvieran peso constante para posteriormente ser molidos y almacenados en frascos de plástico a temperatura ambiente hasta su uso.

3.2 Obtención de extractos primarios

Los porcentajes de recuperación de los extractos a baja escala de las colectas de Zuazua Sep´12 y Zuazua Nov´12 se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Porcentajes de recuperación de los extractos metanólicos de *T. diffusa* colectas 2012

Nombre	% de Recuperación
Zuazua Sep'12	10.73 %
Zuazua Nov'12	3.48 %

3.2.1 Selección de los extractos a analizar

De las 42 colectas de *T. diffusa* inventariadas en el Departamento de Química Analítica de la UANL se seleccionaron los siguientes para la determinación de actividad antioxidante. Tabla VII

Tabla VII. Colectas de *T. diffusa* almacenadas previamente que son candidatos a extracción masiva

Nombre de colecta	Cantidad	Actividad antioxidante cuando se colectó CE ₅₀ µg/mL	Planta seca / extracto
Zuazua Oct'08	310 g	16.6 µg/mL	Planta seca
Zuazua Nov'08	78 g	17.7 µg/mL	Extracto
Marín Oct'08	326 g	18.4 µg/mL	Planta seca
Marín Nov'08	312 g	18.3 µg/mL	Planta seca
Dr. González Oct'08	324 g	17 µg/mL	Planta seca

3.3 Determinación de la actividad antioxidante por la técnica de DPPH

Se determinó la CE_{50} para reducir el radical DPPH por medio de espectrofotometría UV-Vis a 517 nm. Como control positivo se utilizó quercetina y como blanco EtOH. En la tabla VIII se muestran los resultados de la CE_{50} para los extractos analizados.

Tabla VIII. Resultados de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH de las colectas seleccionadas y colectas 2012

Nombre de la colecta	CE_{50}
Zuazua Sep'12	$48.92 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$
Zuazua Nov'12	$83.96 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$
Zuazua Oct'08	$11.01 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$
Zuazua Nov'08	$11.69 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$
Marín Oct'08	$11.83 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$
Marín Nov'12	$10.17 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$
Dr. González Oct'08	$10.79 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$
Quercetina	$3.01 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$

El extracto que mostró mejor actividad fue el de Zuazua Nov'08 por lo que se seleccionó para realizar el aislamiento biodirigido. Como esta colecta ya se contaba con suficiente cantidad del extracto no se realizó la extracción masiva.

Se analizó el extracto seleccionado por HPLC bajo las condiciones descritas en el punto 2.1.6.1, el cromatograma se muestra en la figura 12.

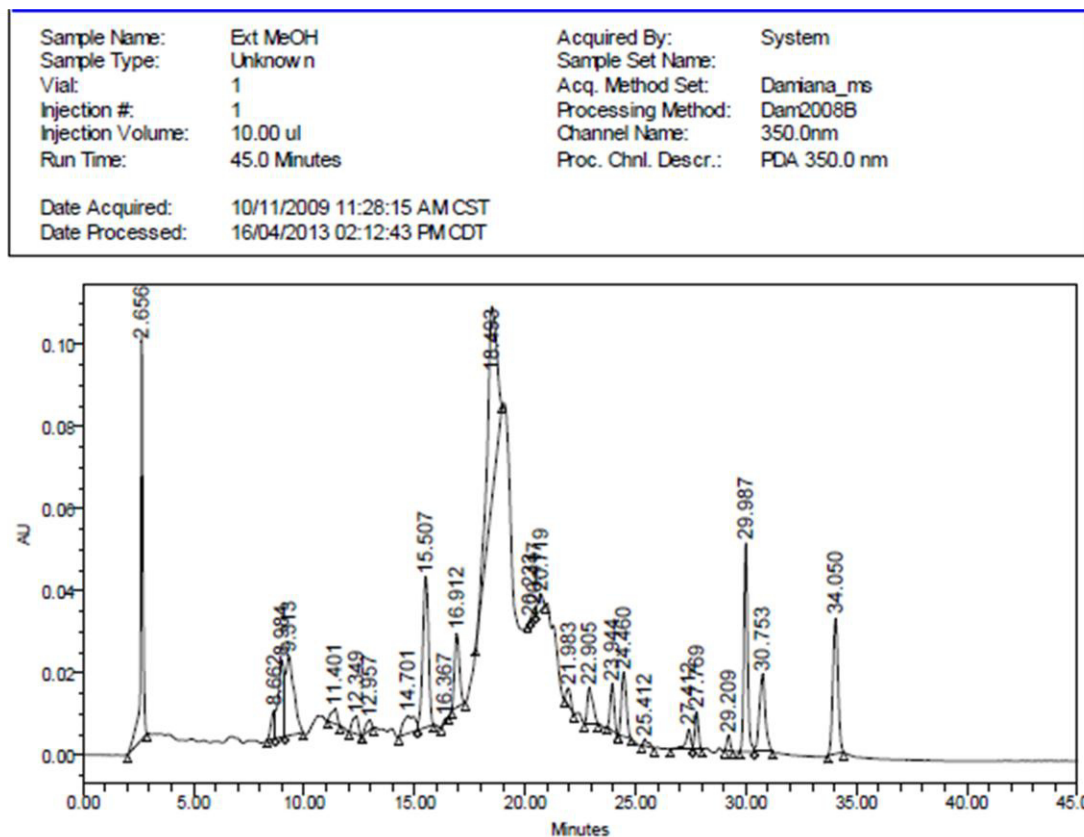


Figura 12. Cromatograma del extracto metanólico de *T. diffusa* Marín Nov'08

3.4 Determinación de la citotoxicidad del extracto

Para determinar la menor interferencia del solvente para el MTT y la mejor concentración de células por pozo, se evaluó el uso de medio de cultivo y PBS, así como concentraciones de 1000 a 6000 células/pozo. Los resultados se muestran en la tabla IX y figuras 13 y 14.

Tabla IX. Determinación de la cantidad óptima de células HepG2 por pozo cuando se disuelve el MTT en PBS o en medio de cultivo

Cantidad de células / pozo	Absorbancia en PBS	Absorbancia en medio de cultivo
6000 células / pozo	0.771 ±0.11	1.286 ±0.22
5000 células / pozo	0.625 ±0.15	1.196 ±0.20
4000 células / pozo	0.720 ±0.10	1.276 ±0.14
3000 células / pozo	0.576 ±0.14	1.114 ±0.08
2000 células / pozo	0.584 ±0.09	1.055 ±0.11
1000 células / pozo	0.706 ±0.18	0.706 ±0.09

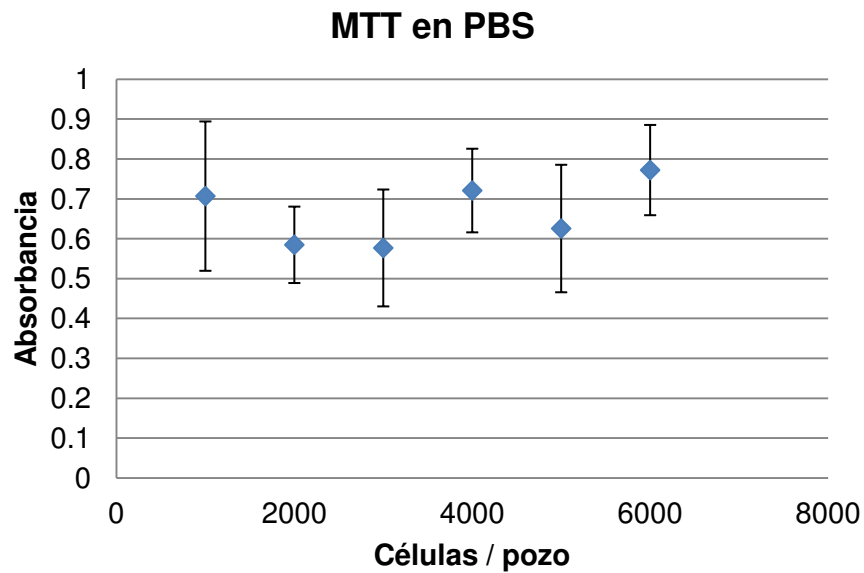


Figura 13. Determinación de la cantidad óptima de células HepG2 por pozo cuando se disuelve el MTT en PBS

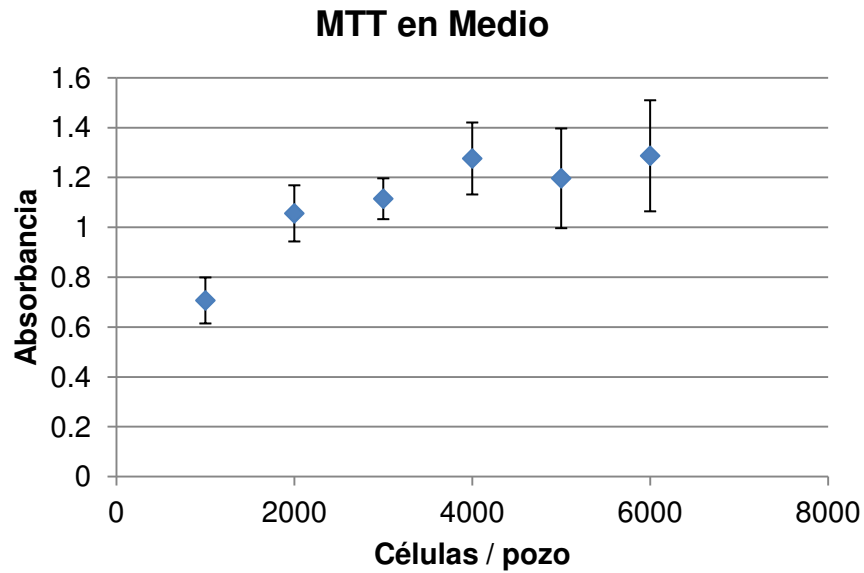


Figura 14. Determinación de la cantidad óptima de células HepG2 por pozo cuando se disuelve el MTT en medio de cultivo

Una vez obtenidos estos datos se determinó la citotoxicidad del extracto expresada como CC_{50} ; el ensayo se realizó por triplicado y en cada una de las placas se hicieron seis replicas de cada una de las concentraciones. El ensayo se basó de la prueba de reducción MTT según lo descrito por Mossman en 1983, se utilizaron 3000 células por pozo y el MTT se disolvió en medio de cultivo.

Los resultados de citotoxicidad expresados como CC_{50} se muestran en la tabla X.

Tabla X. Citotoxicidad contra células HepG2 (expresado como CC₅₀) del extracto metanólico de *T. diffusa*

Nombre de extracto	CC ₅₀
ZuazuaNov'08	49.73 ± 5.03 µg/mL

3.5 Determinación de la actividad hepatoprotectora del extracto

3.5.1. Modelo de daño con acetaminofén

Se evaluaron las tres concentraciones propuestas de acetaminofén para inducir el daño en un tiempo de 72 horas. Los resultados de cuantificación de AST liberadas en el medio se muestran en la tabla XI y figura 15. Se realizó dos veces el ensayo por cuadruplicado.

Tabla XI. Evaluación del daño generado por las tres concentraciones de acetaminofén sobre células HepG2.

Concentración de acetaminofén	AST (UI/L)
5 mM	0.25 ± 0.5
25 mM	1.5 ± 0.57
50 mM	32.5 ± 9.19
Control positivo (Doxorrubicina)	59.75 ± 0.95
Control negativo	85 ± 5.29

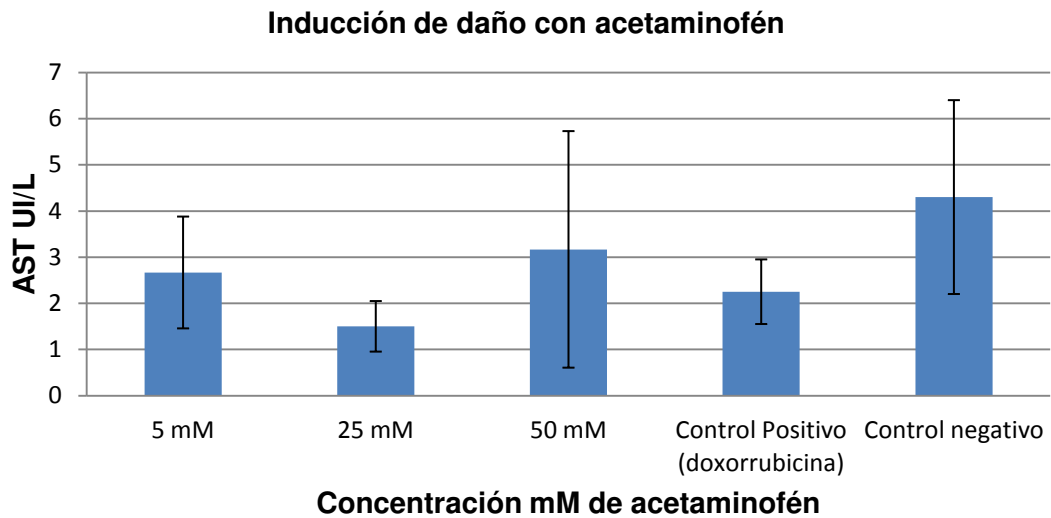


Figura 15. Evaluación del daño generado por las tres concentraciones de acetaminofén sobre células HepG2.

3.5.2. Modelo de daño con CCl₄

Se evaluaron las seis concentraciones propuestas de CCl₄ para inducir daño en células HepG2 en un tiempo de dos horas. Los resultados de la cuantificación de AST liberada al medio se muestran en la tabla XII y figura 16. El ensayo se realizó por cuadruplicado, todas las soluciones contenían DMSO al 0.05%.

Tabla XII. Evaluación del daño generado en células HepG2 por las seis concentraciones de CCl₄

Concentración de CCl ₄	AST (UI/L)
Control negativo	0.25 ± 0.5
0.1%	1.5 ± 0.57
0.3%	32.5 ± 9.19
0.4%	59.75 ± 0.95
0.5%	85 ± 5.29
0.75%	87.25 ± 4.03
1%	87.75 ± 8.53

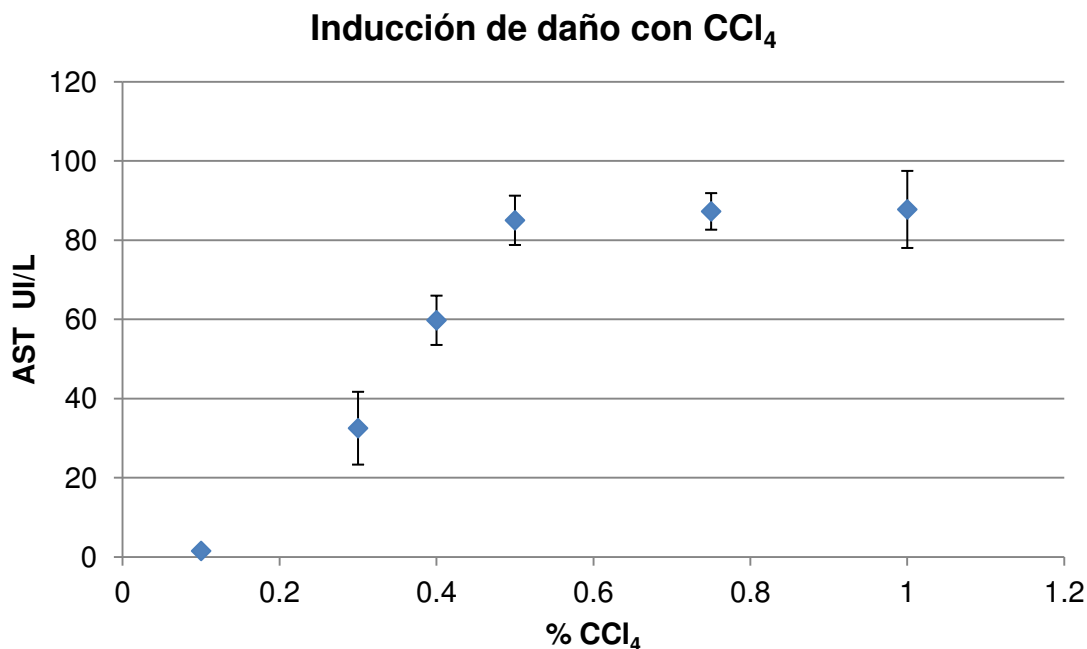


Figura16. Evaluación del daño en células HepG2 de las seis concentraciones de CCl₄

Con estos resultados se estableció que la concentración de CCl₄ utilizada sería de 0.4% y se comprobó que el DMSO a la concentración de 0.05% no genera daño (expresado como liberación de AST) en las células.

3.5.3 Modelo de hepatoprotección

Se determinó la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico una vez ya establecida la dosis del agente inductor de daño. Como control positivo de hepatoprotección se utilizó silibinina. Los resultados del ensayo de hepatoprotección se muestran en la tabla XIII y figura 17.

Tabla XIII. Ensayo de hepatoprotección del extracto metanólico de *T. diffusa*

Concentración del extracto metanólico de <i>T. diffusa</i>	AST (UI/L)
50 µg/mL	43.25 ± 3.86
10 µg/mL	42.75 ± 1.70
Silibinina	44.25 ± 2.62
Control positivo (+)	60.25 ± 0.95
Control negativo (-)	1.25 ± 0.95

Control positivo (+) = CCl₄ 0.4% Control negativo (-) = PBS

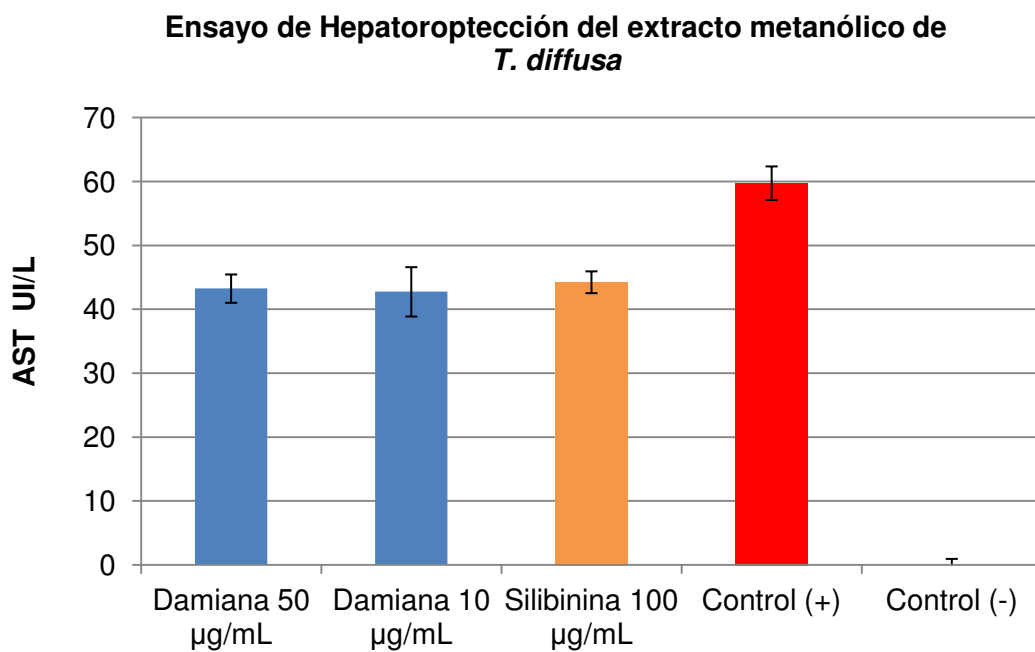


Figura17. Ensayo de hepatoprotección del extracto metanólico de *T. diffusa*

3.6 Aislamiento biodirigido

3.6.1 Eliminación de clorofilas

El extracto seleccionado Zuazua Nov'08 fue sometido a la eliminación de clorofilas, una vez procesado se obtuvieron las fracciones 50% MeOH, 70% MeOH y MeOH. Los porcentajes de recuperación fueron de 63.15%, 22.45% y 14.4% respectivamente; los cromatogramas de las fracciones obtenidos bajo las condiciones referidas en el punto 2.1.6.1 se muestran en la figuras 18, 19 y 20.

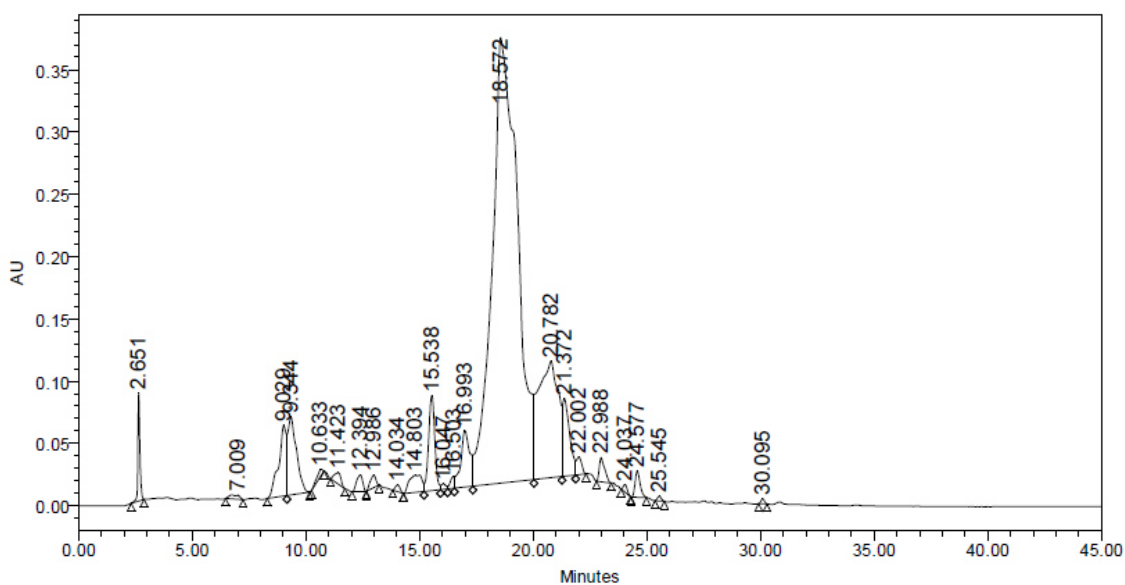


Figura 18. Cromatograma de la Fr. 50% MeOH

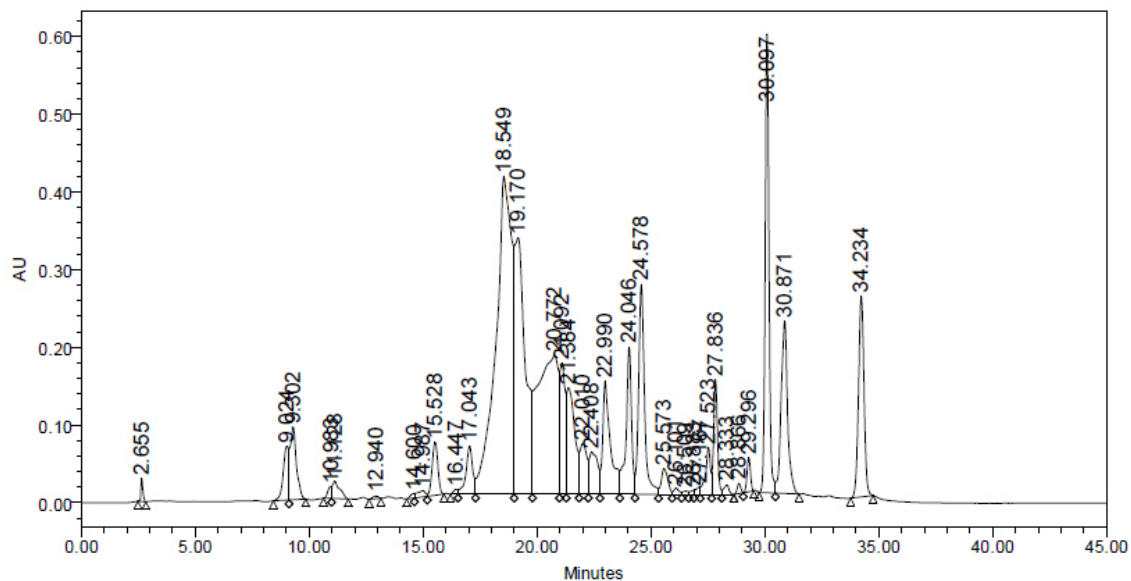


Figura 19. Cromatograma de la Fr. 70% MeOH

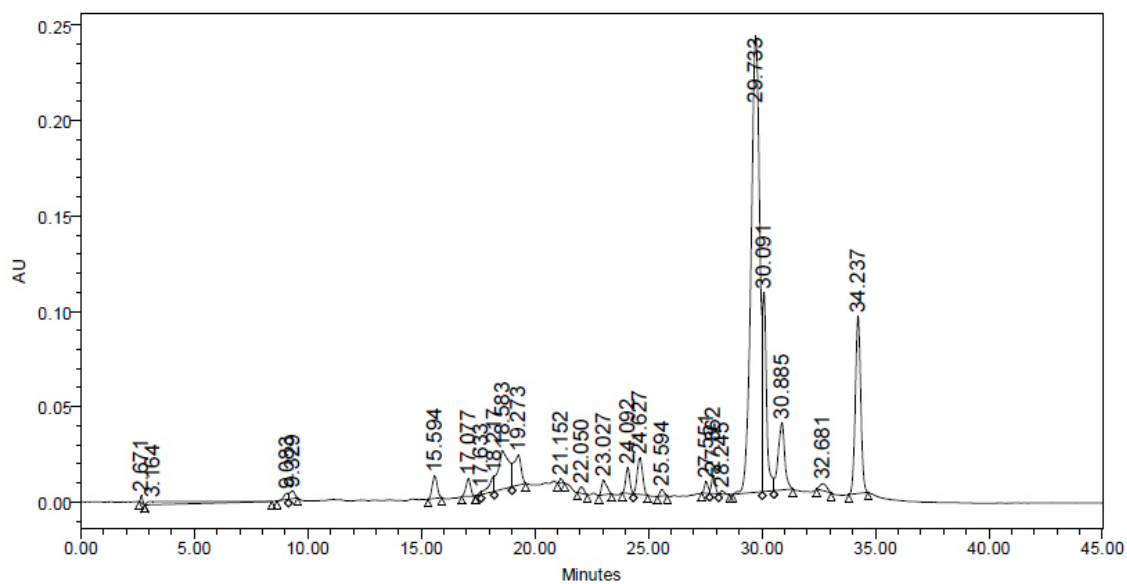


Figura 20. Cromatograma de la Fr. MeOH

Cada una de las fracciones fue evaluada en el ensayo de hepatoprotección. Los resultados se muestran en la tabla XIV y figura 21.

Tabla XIV. Ensayo de hepatoprotección de las fracciones obtenidas de la eliminación de clorofilas

Fracción	Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	AST UI/L
Fr. 50% MeOH	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	44.75 \pm 2.98
	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	32.75 \pm 2.5
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	32.5 \pm 2.64
Fr. 70% MeOH	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	43 \pm 5.59
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	27.75 \pm 4.5
	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30.5 \pm 6.24
Fr. MeOH	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50.25 \pm 1.70
	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	42 \pm 2.16
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	42.75 \pm 2.87
Silibinina	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	44.25 \pm 2.62
Control positivo (+)	-----	60.25 \pm 0.95
Control negativo (-)	-----	1.25 \pm 0.95

Control positivo (+) = CCl_4 0.4%

Control negativo (-) = PBS

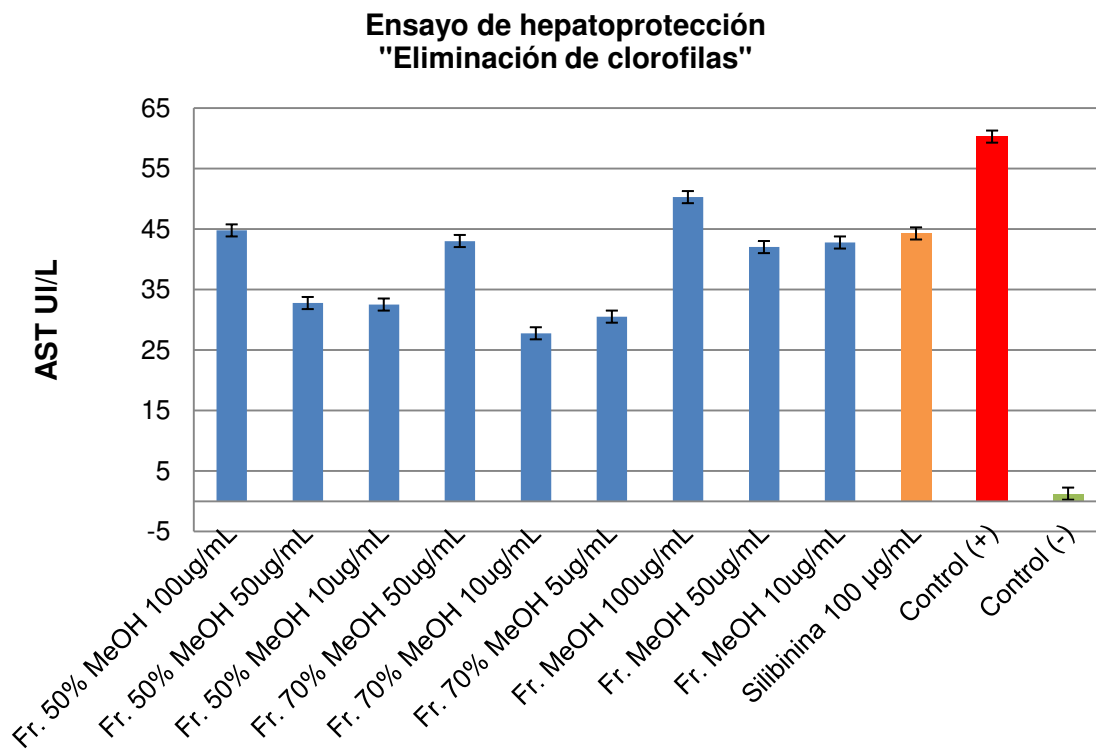


Figura 21. Ensayo de hepatoprotección de las fracciones obtenidas de la eliminación de clorofilas

Los resultados de citotoxicidad de las fracciones 50% MeOH y 70% MeOH se muestran en la tabla XV.

Tabla XV. Citotoxicidad contra células HepG2 (expresado como CC₅₀) de las fracciones 50% MeOH y 70% MeOH.

Nombre de extracto	CC ₅₀
Fr. 50% MeOH	> 500 µg/mL
Fr. 70% MeOH	41.99 ± 2.16 µg/mL

3.6.2 Cromatografía de líquidos a vacío

La fracción seleccionada, 50% MeOH, se pasó por una VLC con solventes de diferente polaridad (de menor a mayor polaridad), CH₂Cl₂, AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH. Los porcentajes de recuperación fueron 7.14%, 25.67%, 37.98% y 29.21% respectivamente; los cromatogramas de las fracciones obtenidos bajo las condiciones descritas en el punto 2.1.6.1 se muestran en la figuras 22, 23, 24 y 25.

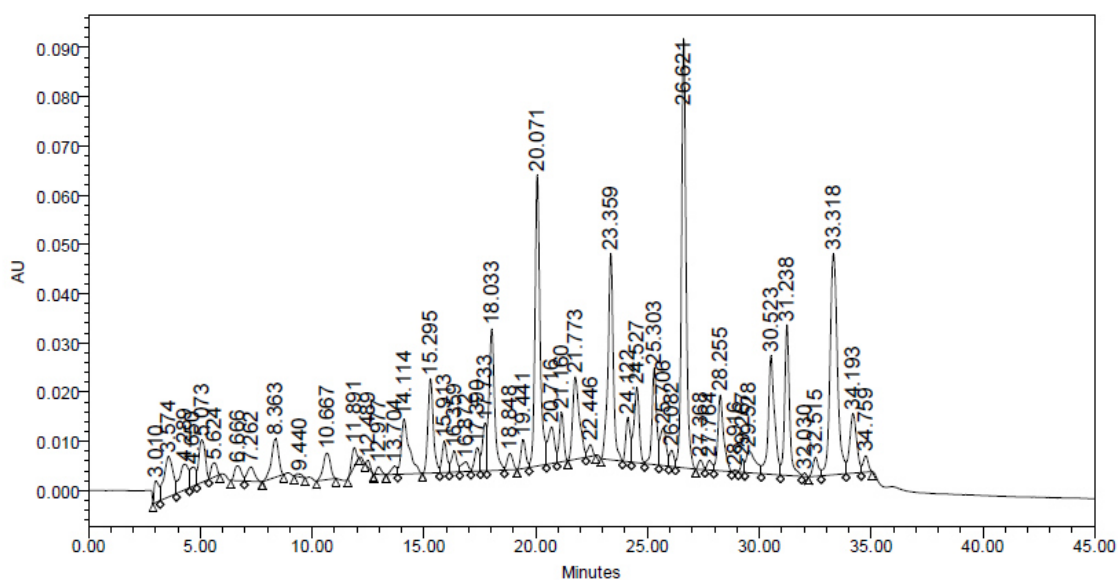


Figura 22. Cromatograma de la Fr. CH₂Cl₂

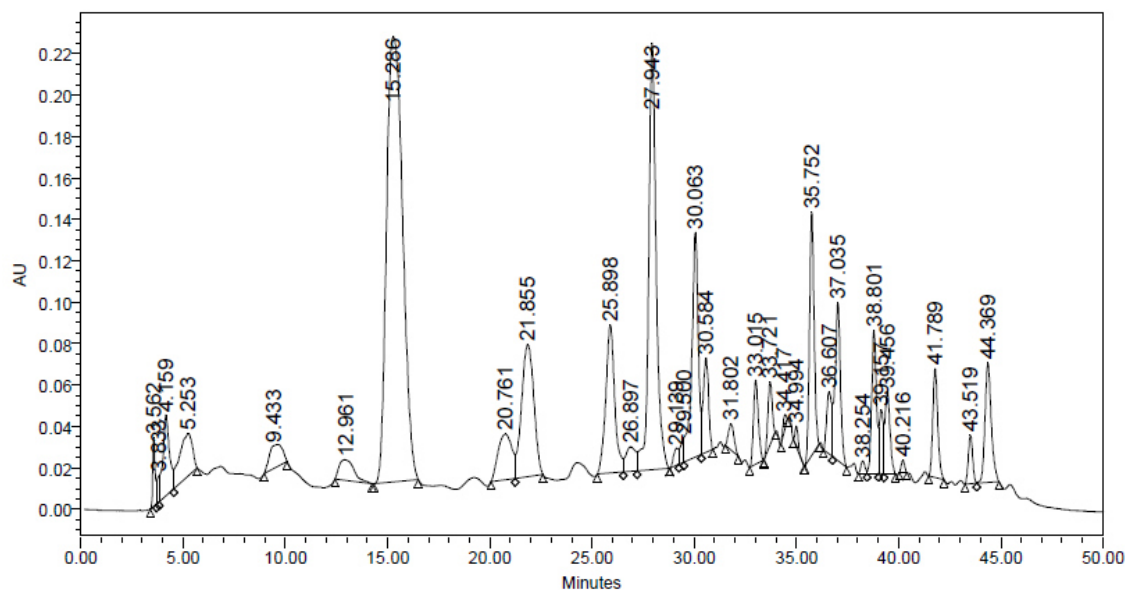


Figura 23. Cromatograma de la Fr. AcOEt

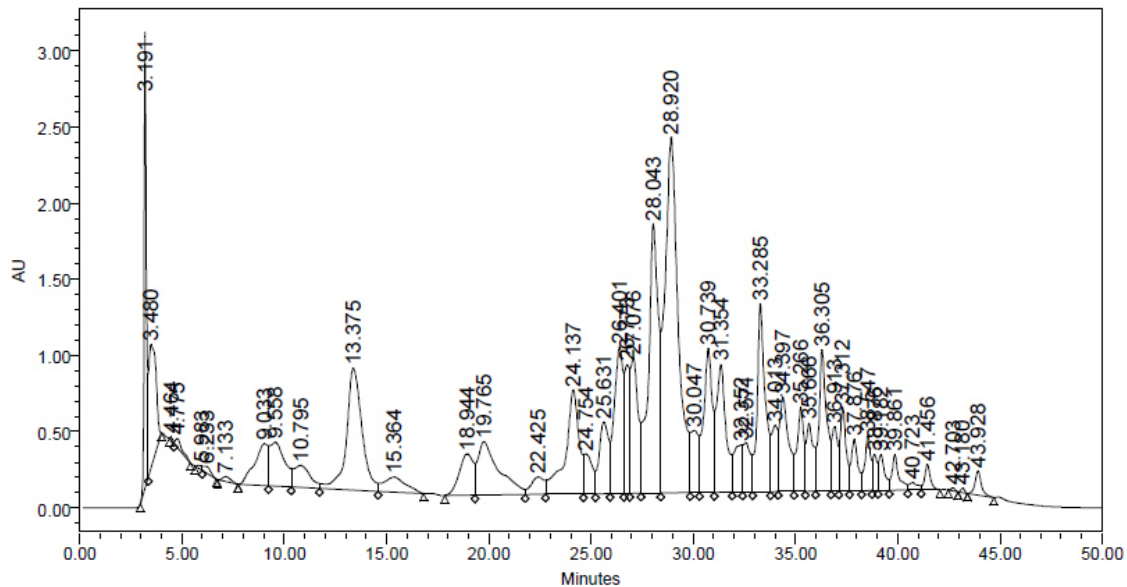


Figura 24. Cromatograma de la Fr. AcOEt:MeOH

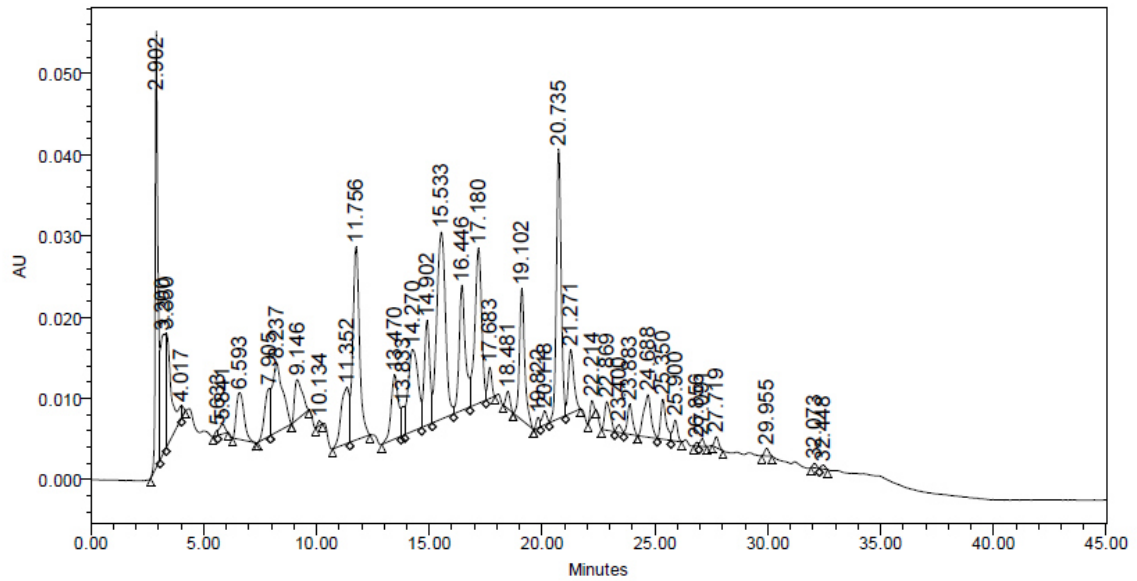


Figura 25. Cromatograma de la Fr. MeOH

A las cuatro fracciones se les determinó la actividad hepatoprotectora. Los resultados se muestran en la tabla XVI y figura 26.

Tabla XVI. Ensayo de hepatoprotección de las fracciones generadas de la VLC

Fracción	Concentración $\mu\text{g/mL}$	AST UI/L
CH_2Cl_2	100 $\mu\text{g/mL}$	50.66 ± 4.04
	50 $\mu\text{g/mL}$	45 ± 4.35
	10 $\mu\text{g/mL}$	40.66 ± 1.15
AcOEt	100 $\mu\text{g/mL}$	25 ± 1
	50 $\mu\text{g/mL}$	22.66 ± 1.52
	10 $\mu\text{g/mL}$	21.66 ± 2.08
AcOEt : MeOH	100 $\mu\text{g/mL}$	18.33 ± 2.51
	50 $\mu\text{g/mL}$	17.33 ± 2.51
	10 $\mu\text{g/mL}$	13 ± 3.60
MeOH	100 $\mu\text{g/mL}$	21.33 ± 1.52
	50 $\mu\text{g/mL}$	26.33 ± 1.15
	10 $\mu\text{g/mL}$	42.75 ± 2.51
Silibinina	100 $\mu\text{g/mL}$	44.25 ± 2.62
Control positivo (+)	-----	60.25 ± 0.95
Control negativo (-)	-----	1.25 ± 0.95

Control positivo (+) = CCl_4 0.4%

Control negativo (-) = PBS

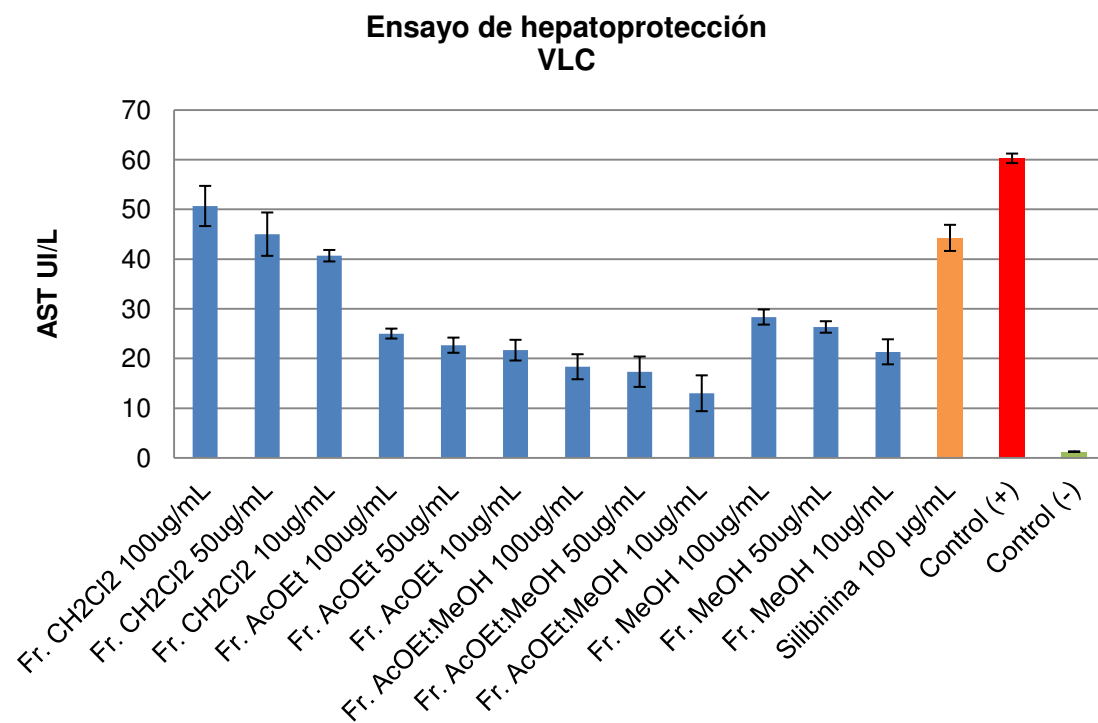


Figura 26. Ensayo de hepatoprotección de las fracciones obtenidas de la VLC

Para seleccionar con que fracción se continuaría para el aislamiento se comparó el resultado obtenido de las fracciones AcOEt y AcOEt:MeOH a 100 µg/mL mediante la prueba estadística T de student en el programa Excel 2007 para observar si había diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las fracciones.

El resultado mostró que si había diferencia significativa entre los dos resultados y se seleccionó la fracción de AcOEt:MeOH para seguir con el aislamiento.

3.6.3 Aislamiento y purificación de los compuestos activos

La fracción de AcOEt:MeOH fue sometida a CCC. De cada una de las columnas realizadas se obtuvieron 85 fracciones, las cuales se analizaron por CCF (Figura 27); para poder interpretar mejor la CCF se concentraron las fracciones que contenían los compuestos mayoritarios y se realizó otra CCF (Figura 28); una de estas fracciones se analizó por HPLC, se observó que eran los compuestos mayoritarios de minuto 28 aproximadamente (Figura 29). Las fracciones que contenían los compuestos mayoritarios se seleccionaron para enriquecerlas con más fracciones de otras columnas que presentaban los mismos compuestos. Ya que se contaba con suficiente cantidad de la fracción enriquecida se sometió a CCC. De esta fracción enriquecida se aisló uno de los compuestos, que se llamó D1 (Figura 30), a la fracción de donde se obtuvo compuesto se le llamo mezcla D1-D2.

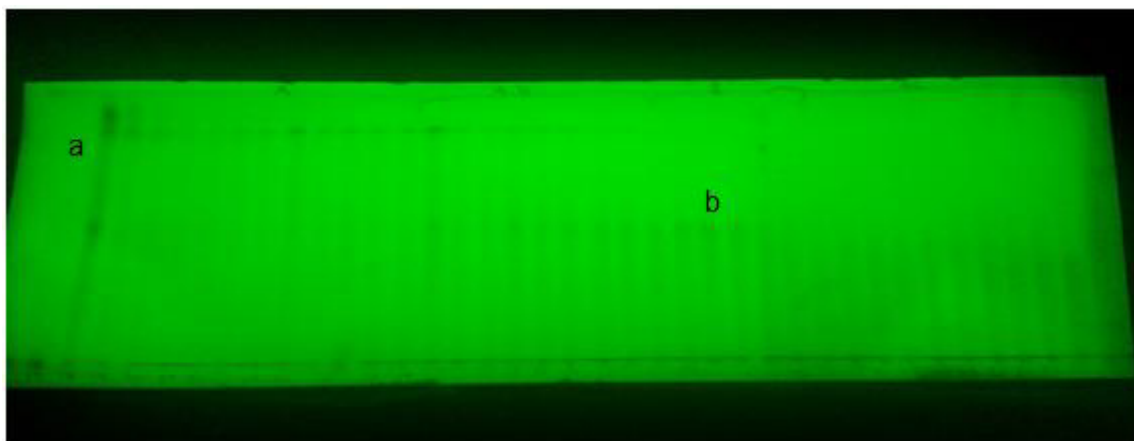


Figura 27. CCF de las fracciones obtenidas de una columna de CCC, (a) Fr. AcOEt:MeOH (b) compuestos mayoritarios

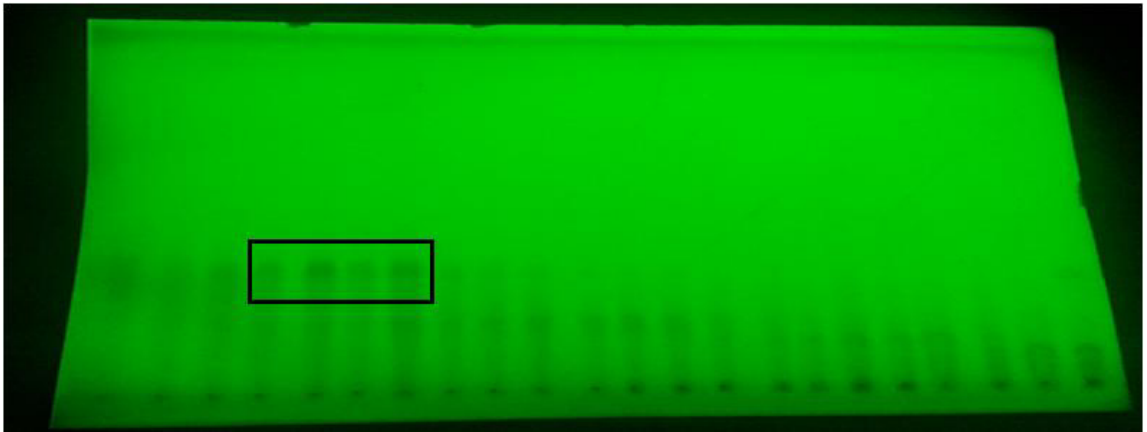


Figura 28. CCF de las fracciones concentradas de los compuestos mayoritarios obtenidas de una columna de CCC.

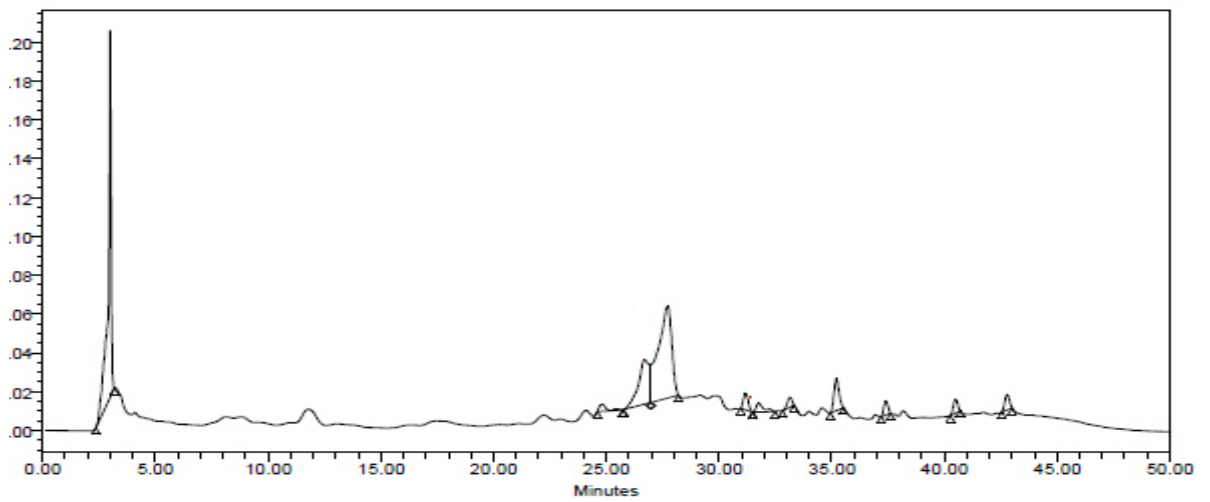


Figura 29. Cromatograma de una de las fracciones concentradas (Mezcla D1-D2)

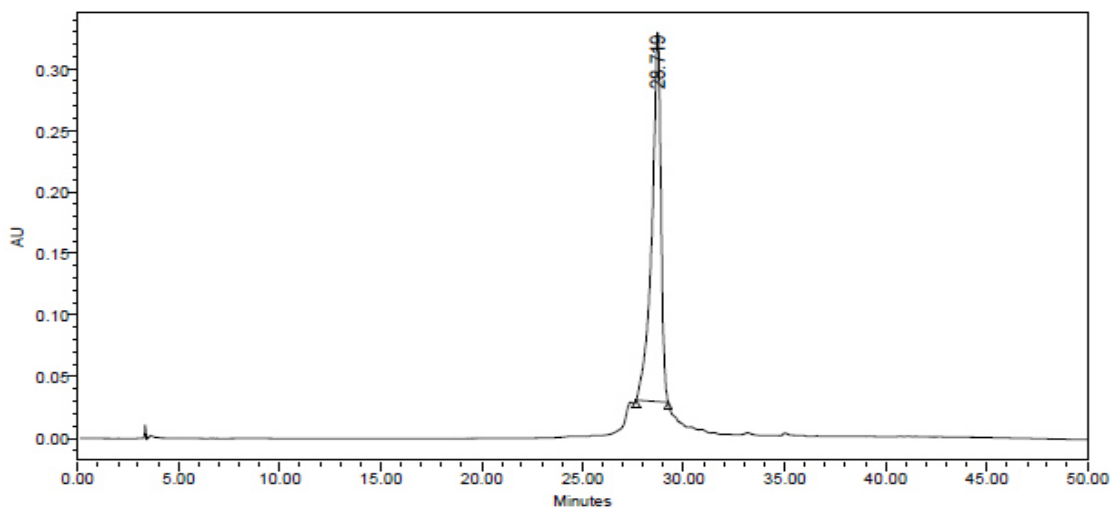


Figura 30. Cromatograma del compuesto aislado D1

3.6.4 Análisis del compuesto puro por RMN y espectroscopía UV-Vis.

Al compuesto D1 se le realizó espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN y UV-Vis. Todos los experimentos de RMN se realizaron en metanol deuterado (MeOD). Los espectros de UV-Vis, ^1H RMN y ^{13}C RMN se muestran en las figuras 31, 32 y 33 respectivamente.

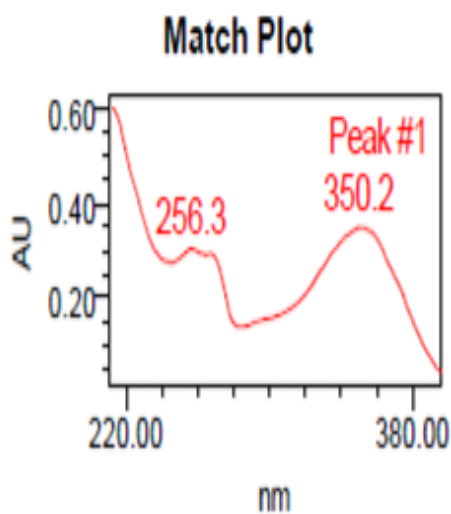


Figura 31. Espectro UV-Vis del compuesto D1

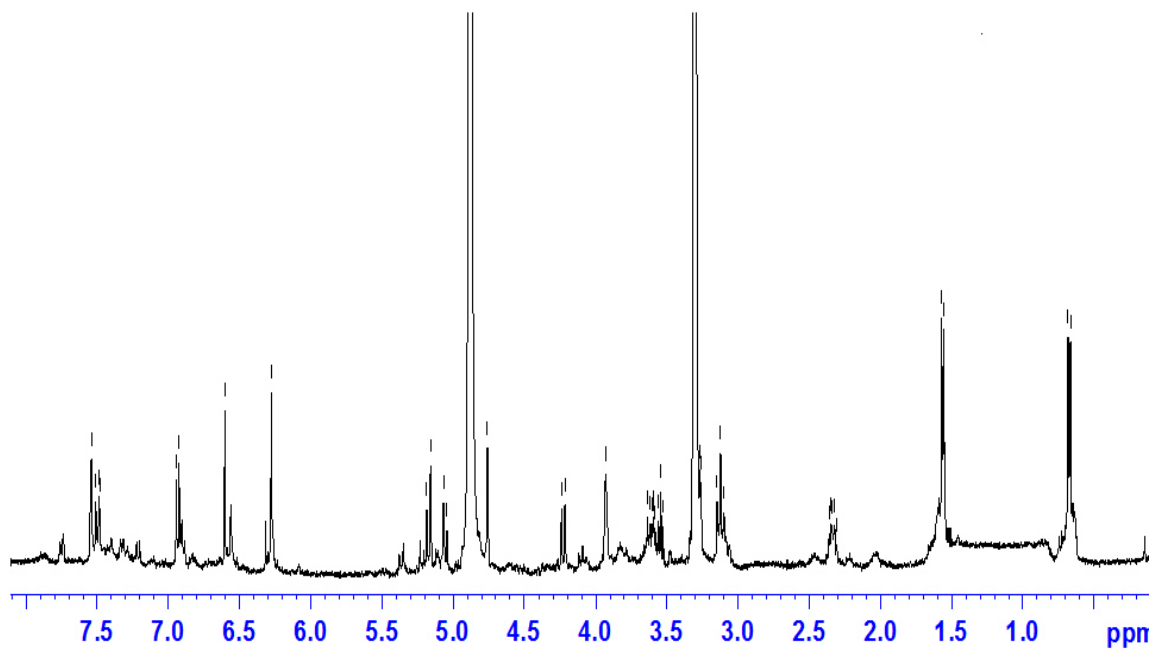


Figura 32. Espectro de ^1H RMN del compuesto D1

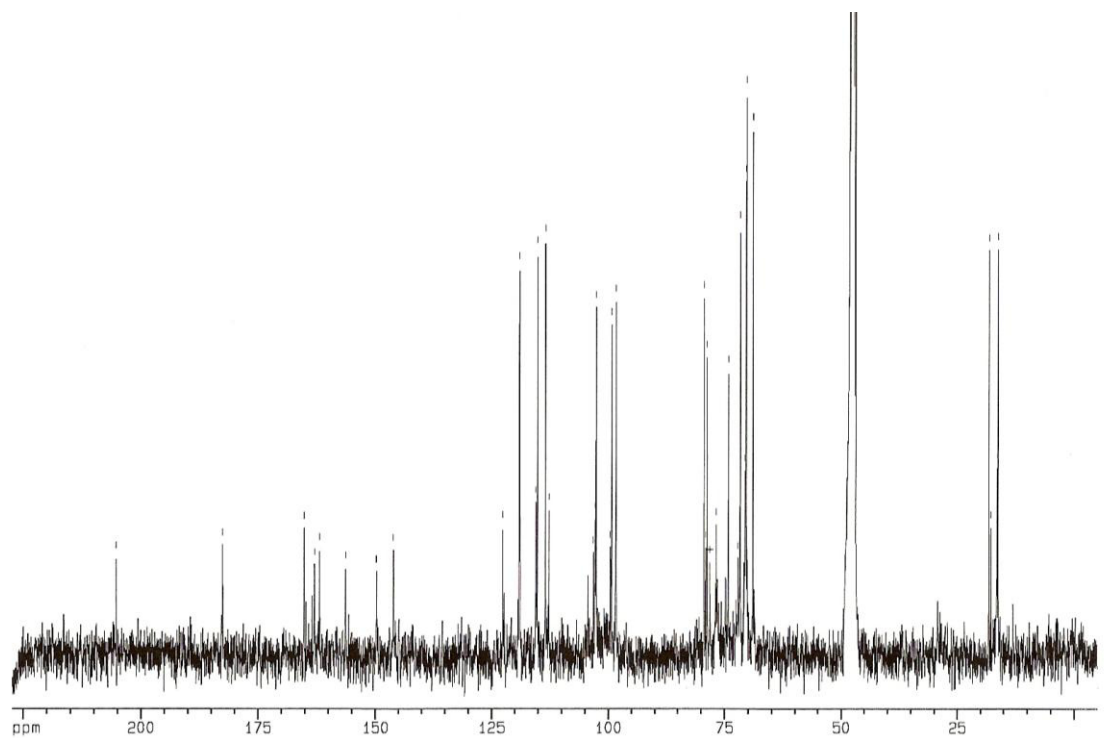


Figura 33. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto D1

Los datos espectroscópicos coinciden con los del compuesto de nombre Luteolina 8-C- β -[6-deoxy-2-O-(α -l-rhamnopyranosyl)-xylo-hexopyranos-3-uloside], la estructura es la que se muestra en la figura 34.

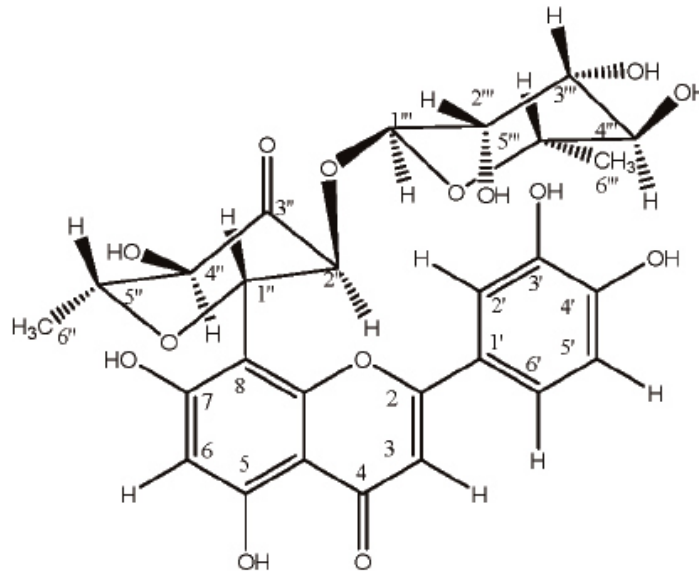


Figura 34. Estructura del compuesto D1

3.7 Determinación de la actividad hepatoprotectora, antioxidante y citotóxica del compuesto puro

3.7.1 Actividad Hepatoprotectora

Se determinó la actividad hepatoprotectora del compuesto aislado D1 y de la mezcla D1-D2, como control positivo de hepatoprotección se utilizó silibinina. Los resultados se muestran en la tabla XVII y figura 35.

Tabla XVII. Ensayo de hepatoprotección del compuesto D1 y mezcla D1-D2

Compuesto	Concentración	AST UI/L
Mezcla D1-D2	100 µg/mL	17.33 ± 1.52
	50 µg/mL	23.66 ± 2.08
	10 µg/mL	24.33 ± 1.52
D1	100 µg/mL	11 ± 2
	50 µg/mL	13.66 ± 2.51
	10 µg/mL	12.66 ± 1.52
Silibinina	100 µg/mL	44.25 ± 2.62
Control positivo (+)	----	60.25 ± 0.95
Control negativo (-)	----	1.25 ± 0.95

Control positivo (+) = CCl₄ 0.4%

Control negativo (-) = PBS

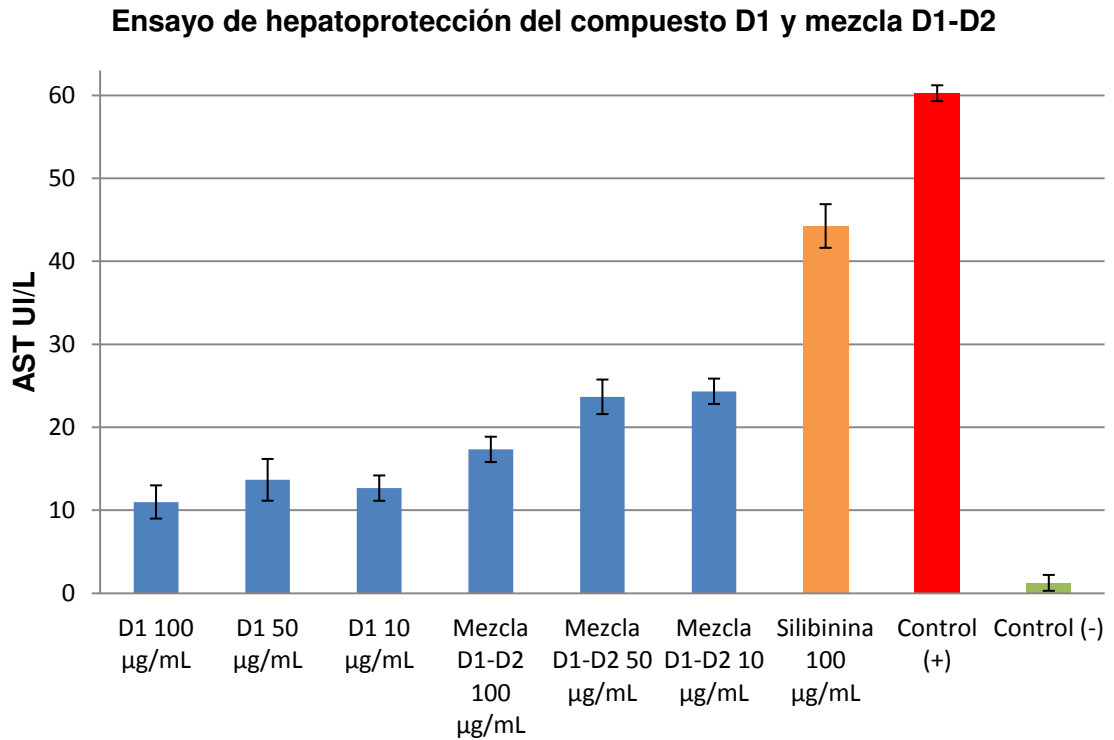


Figura 35. Ensayo de hepatoprotección del compuesto D1 y mezcla D1-D2

3.7.2 Actividad Antioxidante del compuesto asilado D1 y mezcla D1-D2

Se determinó la actividad antioxidante de D1 y de la mezcla D1- D2, como control positivo se utilizó quercetina. Los resultados se muestran en la tabla XVIII.

Tabla XVIII. Actividad antioxidante del compuesto D1 y mezcla D1-D2

Nombre del compuesto	CE ₅₀
Mezcla D1-D2	26.15 ± 0.12 µg/mL
D1	4.76 ± 0.02 µg/mL
Quercetina	3.01 ± 0.05 µg/mL

3.7.3 Actividad citotóxica del compuesto aislado y mezcla D1-D2

Se determinó la actividad citotóxica del compuesto aislado D1 y de la mezcla D1-D2, como control positivo se utilizó doxorubicina. Los resultados se muestran en la tabla XIX.

Tabla XIX. Citotoxicidad contra células HepG2 (expresado como CC₅₀) del compuesto D1 y mezcla D1-D2

Nombre de compuesto	CC ₅₀
Mezcla D1-D2	434.57 ± 56.3 µg/mL
D1	>500 µg/mL
Doxorrubicina	0.14 ± 0.05 µg/mL

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Debido a la prevalencia que tienen las enfermedades hepáticas en México y el aumento que se pronostica tendrán en corto tiempo, representan un serio problema de salud pública en nuestro país. La necesidad de tener nuevos esquemas de tratamientos es un factor importante para detener el avance de este tipo de afecciones.

Los productos naturales han demostrado ser una excelente fuente de moléculas novedosas, algunas de las cuales han funcionado como fármacos o han sido inspiración para la síntesis de algunos otros. México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, por lo que resulta interesante la búsqueda de nuevas moléculas activas aisladas de plantas medicinales que crecen en el país para el tratamiento de las principales afecciones hepáticas.

Se seleccionó trabajar con *T. diffusa* para el presente trabajo debido a varias características, es una planta que crece en la región noreste de México; aunque se cuenta con un reporte oral de su uso tradicional para el tratamiento de afecciones hepáticas, *T. diffusa* es más conocida por otros tipos de usos, sin embargo existe un reporte previo de Torres-González et al. en 2011, en el que se indica que la planta tiene efecto hepatoprotector con una diferencia significativa entre el control de daño y el extracto metanólico de la parte aérea de la planta con una $p < 0.001$.

Además Brito et al. en 2012 demostraron que *Turnera ulmifolia*, planta que pertenece al género de las Turneráceas, presenta actividad antioxidante y actividad hepatoprotectora en un modelo murino de daño por CCl₄, ellos demostraron que existe diferencia significativa entre los niveles enzimáticos (AST y ALT) en los ratones que recibieron como tratamiento el extracto metanólico de *T. ulmifolia* en comparación con los ratones no tratados.

Por otro lado, se ha reportado que existe una relación entre la actividad antioxidante y hepatoprotectora de extractos o compuestos obtenidos a partir de productos naturales (Hiraganahalli DB et al. 2012, Rupeshkumar et al. 2011, Krithika et al. 2009, Brito et al. 2012). Esto podría explicarse considerando que varias de las vías por las que los agentes hepatotóxicos puede causar daño en el hígado se relacionan con las EROs (Figura 36), por lo que se piensa que extractos o compuestos que presentan actividad antioxidante pueden presentar también actividad hepatoprotectora. Salazar-Aranda et al. 2009, reportaron la actividad antioxidante del extracto metanólico de *T. diffusa* y posteriormente Pérez-Meseguer et al. en 2011 demostraron la actividad antioxidante tanto del extracto metanólico como de un flavonoide C-glicosilado aislado de la misma; considerando lo anterior se pensó que *T. diffusa* podría ser un buen candidato para realizar el aislamiento biodirigido en la búsqueda de nuevas moléculas hepatoprotectoras.

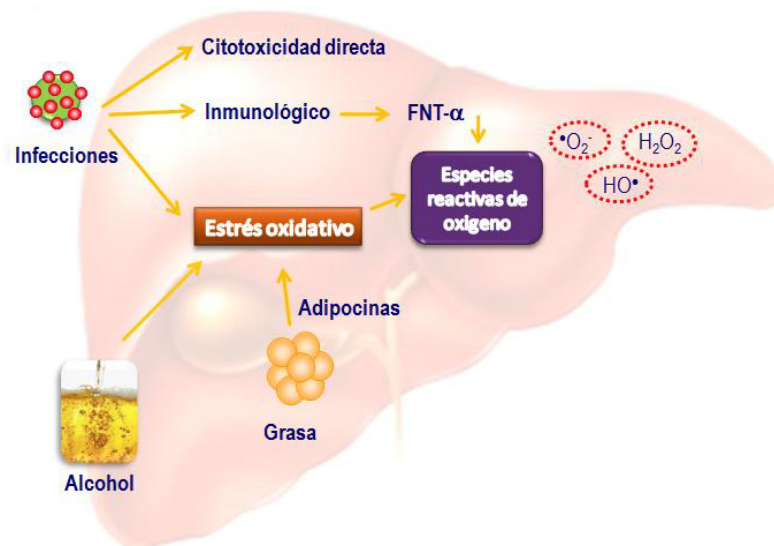


Figura 36. Relación entre los diferentes agentes hepatotóxicos y las EROs

Las colectas de la planta se realizaron en los meses de Septiembre y Noviembre del 2012 debido a que por experiencias de trabajos previos en el departamento de Química Analítica de la UANL se conoce que la actividad antioxidante de esta planta es mejor en los meses de otoño-invierno, coincidiendo con su etapa de floración. Sin embargo, las plantas recolectadas en el año 2012 mostraron poca actividad antioxidante como se muestra en la tabla VIII, lo cual se pudo deber a la sequía que se presentó en ese año; la planta estaba muy seca, casi no creció y posiblemente no generó suficientes metabolitos secundarios.

Debido a estos resultados, se planteó reevaluar la actividad antioxidante de las plantas y extractos almacenados en el departamento de años anteriores. Se seleccionaron las muestras que habían presentado una buena actividad antioxidante en el momento de la colecta y que se tuviera almacenado más de 300 g de planta o 50 g de extracto, esto último debido a que se necesita una cantidad suficiente de material para el aislamiento

biodirigido (tabla VII). El resultado mostró que la colecta de MarínNov'08 fue la que mejor actividad antioxidante presentó (tabla VIII). Para este ensayo se utilizó quercetina como control positivo, se obtuvo el valor de CE_{50} 2.95 $\mu\text{g/mL}$ el cual es similar a lo reportado por Salazar et al. en 2009 con un valor de CE_{50} 3.0 $\mu\text{g/mL}$ en donde se utilizó la misma metodología y concentraciones de reactivos.

Cuando se desea proponer un extracto o compuesto como nueva posible alternativa de tratamiento, es necesario demostrar que no es tóxico. Es por esto que se determinó la citotoxicidad del extracto metanólico en la línea celular HepG2, para ello fue necesario estandarizar el ensayo bajo las condiciones de nuestro laboratorio. Se evaluaron dos parámetros diferentes, uno de ellos fue la cantidad de células inoculadas por pozo, y el otro fue el efecto de disolver el MTT en medio de cultivo (solución coloreada) o PBS (solución incolora); esto debido a que la prueba que se utiliza es espectrofotométrica y las lecturas se realizan en la región visible del espectro. De los resultados que se obtuvieron para el número de células por pozo se seleccionó la máxima concentración de células en donde aún se observara una proporcionalidad entre la absorbancia y la cantidad de células en el pozo (tabla IX).

En los resultados se observó que al disolver el MTT en PBS no se evidencia una proporcionalidad entre las absorbancias y la cantidad de células (Figura 13); pero cuando se disuelve el MTT en medio de cultivo (como se refiere en la literatura) se generan dos zonas como se observa en la figura 14, una zona en donde se mantiene la proporcionalidad (de 1000 a 3000 células/pozo) y otra en donde se pierde la proporcionalidad (4000 a 6000 células/pozo); por esta razón se decidió trabajar con 3000 células/pozo y el MTT se disolvió en medio de cultivo.

Una vez estandarizado el ensayo, se evaluó la citotoxicidad del extracto metanólico y se obtuvo una CC_{50} de $49.73 \pm 5.03 \mu\text{g/mL}$, lo cual es similar a lo reportado por Avelino

et al 2013 con una CC_{50} de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el extracto metanólico de *T. diffusa* en una línea celular de cáncer de mama; aunque no coincide con lo reportado por Pérez-Meseguer en su Tesis Doctoral en donde indica que la CC_{50} es $>500 \mu\text{g}/\text{mL}$ en células mononucleares de ratón balb/c (Pérez-Meseguer Tesis Doctoral 2008).

Para la generación de daño hepático celular existen diferentes agentes reportados en la literatura, como son: el acetaminofén, CCl_4 , alcohol ter-butílico, D-galactosamina, entre otros (Vaishali et al. 2011, Hiraganahall et al 2011, Rupeshkumar et al. 2012, Abhay et al. 2012); se seleccionó como primera opción el acetaminofén por sus características fisicoquímicas (solubilidad en agua, presión de vapor), costo y baja toxicidad para el analista.

Los resultados obtenidos en este modelo no fueron los esperados, no había diferencia significativa en la cantidad de AST liberada al medio entre las diferentes concentraciones de acetaminofén ni en los controles; esto se pudo deber a varios factores, primero se pensó que era debido a las concentraciones de acetaminofén utilizadas ya que sólo se habían probado 5mM y 25 mM según lo reportado por Zhao et al. en 2012; por este motivo se evaluó la concentración de 50 mM, pero tampoco se observaron cambios en la cantidad de enzima cuantificada. (Tabla XI)

Otro factor importante es el tiempo de exposición del acetaminofén con las células; sin embargo, considerando la necesidad de concluir los objetivos en los plazos fijados, se decidió cambiar de agente hepatotóxico y dejar como perspectiva del trabajo el poner a punto el modelo con acetaminofén.

La segunda opción fue el CCl_4 ; una de las ventajas de este modelo es que existen reportes en la literatura en los cuales se utiliza este agente en modelos *in vivo* y se monitorea el daño usando un marcador bioquímico de la célula y no la viabilidad como

es lo usual. Una de las ventajas de utilizar un marcador bioquímico es que proporciona información más precisa, ya que mide el grado de daño generado y no si la célula está viva o muerta (Torres-González et al. 2011, Hossam et al. 2013, Krithika et al. 2009).

Para montar el ensayo de hepatoprotección usando este agente hepatotóxico primero se determinó la concentración de CCl_4 necesaria para causar daño en un millón de células y con un tiempo de incubación de 2 horas; se probaron seis concentraciones basadas en reportes previos (Torres-Gonzalez et al. 2011, Hosmann et al. 2013, Rajesh et al. 2009). De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó la máxima concentración en donde se encontró aún una proporcionalidad entre la concentración de CCl_4 y la cantidad de AST liberada; se puede observar en la figura 16 que existen dos zonas, una donde hay proporcionalidad (0.1 - 0.4%) y otra zona donde se pierde la misma (0.5 – 1%) por lo que se seleccionó la concentración de 0.4%, que es una concentración similar a la reportada por Torres-González en 2011.

Debido a que el CCl_4 es una molécula no polar, insoluble en el medio, se evaluó el efecto de agregar DMSO a una concentración de 0.05% para favorecer la solubilidad en el PBS. Se observó que PBS con DMSO al 0.05% no genera daño en las células.

Una vez determinada la concentración de CCl_4 a utilizar se procedió a evaluar el efecto hepatoprotector del extracto metanólico de *T. diffusa* seleccionado. En un principio se había propuesto trabajar con concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$, pero considerando el resultado de citotoxicidad (CC_{50} 49.73 \pm 5.03 $\mu\text{g/mL}$), solo se probaron las concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$; evaluar concentraciones más elevadas a la CC_{50} carecería de sentido. Como control positivo de protección se utilizó silibinina la cual es una molécula ampliamente utilizada como hepatoprotector. En la figura 17 se muestra el resultado obtenido de la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico medido como la liberación de enzima AST al medio, el cual resultó similar al

control positivo; esto es muy interesante debido a que el extracto aún en concentraciones menores que la silibinina, resultó igualmente protector frente al daño hepático; esto sugería la posibilidad de aislar un compuesto con mejor actividad hepatoprotectora que la silibinina misma.

Después de comprobar que el extracto metanólico de *T. diffusa* tenía actividad hepatoprotectora, se siguió con el aislamiento biodirigido. El primer paso fue la eliminación de clorofilas; este paso fue necesario, debido a que las clorofilas son moléculas interfieren durante el proceso de purificación. En los cromatogramas presentados en las figuras 18, 19 y 20 se muestra la forma en que los compuestos se agruparon según la polaridad de cada una de los eluentes en cada una de las fracciones obtenidas.

La actividad hepatoprotectora se mantuvo en las fracciones 50% MeOH y 70% MeOH como se observa en la figura 21 y no existe diferencia significativa entre los resultados de las mismas; por ello, para decidir cuál de las fracciones se seleccionaría para continuar el aislamiento, se decidió evaluar la citotoxicidad de ambas fracciones; el resultado que se observa en la tabla XV, muestra que la fracción 50% MeOH no es citotóxica ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) mientras que la fracción 70% MeOH es tan citotóxica como el extracto metanólico.

Por esta razón, se seleccionó la fracción 50% MeOH para el aislamiento; el siguiente paso consistió en realizar una cromatografía de líquidos a vacío, utilizando una columna de sílica y eluyendo con solventes de menor a mayor polaridad. De este proceso se obtuvieron cuatro fracciones denominadas CH_2Cl_2 , AcOEt, AcOEt:MeOH y MeOH, de todas ellas se evaluó la actividad hepatoprotectora. El resultado que se observa en la figura 26, muestra que la fracción AcOEt:MeOH fue la que presentó

mejor protección con una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto de las otras, por lo que se seleccionó para seguir con el aislamiento.

La fracción AcoEt:MeOH se purificó mediante el uso de un Cromatógrafo en Contracorriente. La CCC es una técnica cromatográfica en donde la separación se realiza por particiones líquido-líquido, la fase estacionara (que es un líquido) se encuentra libre de soporte; tanto la fase móvil como la estacionaria son dos sistema de solventes que se seleccionan dependiendo de las características de la muestra a analizar, por lo que se puede trabajar tanto en fase normal como inversa; una de las principales ventajas de esta técnica es que se logra la recuperación total de la muestra y el riesgo de que se desnaturalice la muestra es muy bajo (Kunbo et al. 2008). Se han publicado múltiples reportes en años recientes en donde se hace uso de la CCC para el aislamiento y purificación de compuestos a partir de productos naturales, se han logrado aislar terpenos, alcaloides, compuestos polifenólicos (flavonoides, catecoles), entre otros (Inui et al. 2010, Shikanga et al. 2011, Degenhardt et al. 2000,). Se seleccionó esta técnica debido a las ventajas que presenta y a que por experiencias anteriores se sabía que mediante el uso de las técnicas convencionales como la cromatografía en fase normal para el aislamiento de compuestos polares se obtienen uniones irreversibles y por lo tanto pérdida de muestra; por otro lado, por medio de fase inversa era necesario un gran número de columnas para la separación de los compuestos, generando elevados volúmenes de solvente de desecho.

Para seleccionar el método cromatográfico se contó con ayuda del personal de Dynamic Extractions que fue el proveedor del equipo contracorriente. Como paso inicial se evaluó el coeficiente de distribución de la fracción AcOEt:MeOH; debido a la polaridad que presenta la fracción se propuso que para la separación de los compuestos el sistema de solventes debía de contener agua, n-butanol y un tercer o

cuarto solvente para ajustar la polaridad del sistema; después de probar varios sistemas se seleccionó el sistema que contenía agua, n-butanol y hexano, se trabajó en fase normal y para la elusión se utilizó un sistema en gradiente debido a que se obtenía la separación de los compuestos que más asemejaba a la separación lograda al analizar la fracción por HPLC.

De cada columna que se realizó se obtuvieron 85 fracciones de 1 mL, la separación de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina con el sistema descrito en el punto 2.1.5.1.

En la capa fina de la fracción AcOEt:MeOH se observaron varias manchas unas con un factor de retardo (rf) intermedio y otras a un rf mayor (Figura 27); cuando se analizó por HPLC la fracción AcOEt:MeOH (Figura 24) se observó que los dos compuestos mayoritarios mostraban un tiempo de retención alrededor de 28 minutos que correspondía con la mancha de rf intermedio.

El aislamiento se continuó hasta obtener el compuesto de mayor tiempo de retención de esta mezcla en forma pura y al que se denominó D1 (Figura 30); a la mezcla se la denominó D1-D2

Los resultados de hepatoprotección (Figura 35) indican que la actividad hepatoprotectora se encontraba principalmente en el compuesto D1, la mezcla, aunque activa, tiene menor actividad.

Se determinó la estructura del compuesto D1 por medio de RMN de ^1H , ^{13}C y espectroscopía UV-Vis. En el espectro UV-Vis presentado en la figura 31 se observó que presentaba el patrón característico de los flavonoides.

En el espectro $^1\text{HRMN}$ se observó el patrón característico de un flavonoide glicosilado; las señales a campos menores de 6 ppm corresponden a los protones del flavonoide y las señales a campos mayores corresponden a los protones del azúcar, y por el número de señales se concluyó que era más de un azúcar las que estaban presentes. (Figura 32)

En el espectro de $^{13}\text{CRMN}$ se observó también el patrón de señales característico de un flavonoide glicosilado; del espectro primeramente obtuvimos la información que la molécula tenía 27 carbonos, los carbonos del flavonoide se encuentran en campos menores a 100 ppm, el análisis de las señales correspondía con la luteolina; las señales de los azúcares se encontraban entre 20 y 80 ppm. Se observó también que hay dos señales alrededor de 200 ppm que indican la presencia de dos carbonos carbonílicos uno de los cuales pertenece a la luteolina por lo que el otro carbonilo es de uno de los azucares. (Figura 33)

Los datos espectroscópicos coinciden con los reportados por Zhao et al. en 2007 para el compuesto Luteolina 8-*C*- β -[6-deoxy-2-*O*-(α -l-rhamnopyranosyl)-xylo-hexopyranos-3-ulosido] (tabla XXI y XXII) concluyendo que se trata de la misma molécula. (tabla XX y XI) Es importante mencionar que este compuesto es considerado un biomarcador de la planta debido a que únicamente se ha aislado hasta ahora a partir de *T. diffusa*

Tabla XX. Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H

	Desplazamiento en ppm	
	Zhao et al. 2007	D1
H-3	6.63 ppm (s)	6.6 ppm (s)
H-6	6.31 ppm (s)	6.3 ppm (s)
H-2'	7.56 ppm (d)	7.55 ppm (d)
H-5'	6.96 ppm (d)	6.92 ppm (d)
H-6'	7.51 ppm (dd)	7.5 ppm (dd)
H-1''	5.20 ppm (d)	5.18 ppm (d)
H-2''	5.08 ppm (d)	5.06 (d)
H-4''	4.25 ppm (d)	4.25 ppm (d)
H-5''	3.62 ppm (m)	3.62 ppm (m)
H-6''	1.59 ppm (d)	1.54 ppm (d)
H-1'''	4.79 ppm (br)	4.77 ppm (d)
H-2'''	3.96 ppm (m)	3.92 ppm (m)
H-3'''	3.30 ppm (dd)	3.27 ppm (bs)
H-4'''	3.15 ppm (dd)	3.12 ppm (dd)
H-5'''	2.37 ppm (m)	2.37 ppm (m)
H-6'''	0.70 ppm (d)	0.68 ppm (d)

Tabla XXI. Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C

	Desplazamientos en ppm	
	Zaho et al. 2007	D1
C-2	165 ppm	165 ppm
C-3	104.2 ppm	103 ppm
C-4	182.2 ppm	183 ppm
C-5	162.8 ppm	163 ppm
C-6	98.6 ppm	98.5 ppm
C-7	161.9 ppm	162 ppm
C-8	103.2 ppm	103 ppm
C-9	156.3 ppm	156 ppm
C-10	104.5 ppm	104 ppm
C-1'	122.7 ppm	122 ppm
C-2'	113.6 ppm	114 ppm
C-3'	146.0 ppm	146 ppm
C-4'	149.7 ppm	149 ppm
C-5'	115.3 ppm	115 ppm
C-6'	119.1 ppm	119 ppm
C-1''	74.3 ppm	74 ppm
C-2''	77.0 ppm	77 ppm

C-3''	205.3 ppm	205 ppm
C-4''	78.7 ppm	78 ppm
C-5''	79.4 ppm	79 ppm
C-6''	18.2 ppm	18 ppm
C-1'''	99.3 ppm	98 ppm
C-2'''	70.6 ppm	71 ppm
C-3'''	70.3 ppm	70 ppm
C.4'''	71.7 ppm	72 ppm
C-5'''	69.0 ppm	69 ppm
C-6'''	16.3 ppm	16 ppm

Se determinó que el D1 es un compuesto hepatoprotector y que su actividad es 4.02 veces mejor que la actividad de la silibinina en el modelo desarrollado. Se determinó además que no es citotóxico debido a que su CC_{50} es $>500 \mu\text{g/mL}$, y que tiene una alta actividad antioxidante que se refleja en su CE_{50} de $4.76 \mu\text{g/mL}$, la cual es similar a lo previamente reportado por Pérez-Meseguer et al. en 2010 de $5.56 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados refuerzan la idea de que compuestos con gran actividad antioxidante puedan ser hepatoprotectores.

Es interesante considerar que tanto la silibinina como el compuesto D1 son flavonoides; sin embargo D1 que es un flavonoide C-glicosilado y la silibinina que es un flavolignano. En una búsqueda bibliográfica, se encontró un reporte de Lima et al. en 2006 en donde se determinó la actividad hepatoprotectora de varios compuestos

polifenólicos en la línea celular HepG2 utilizando alcohol terbutílico como agente inductor de daño y lactato deshidrogenasa como parámetro indicador de daño. Entre los compuestos analizados estaba la luteolina y luteolina O-glicosilada; la luteolina presentó actividad hepatoprotectora con una CE_{50} de $5.09 \mu\text{M}$ y la luteolina O-glicosilada perdía el poder hepatoprotector, ya que resultó con CE_{50} de $78 \mu\text{M}$, en base a esto será importante poder determinar en un futuro la causa de la diferencia en el efecto hepatoprotector entre la luteolina C- y O- glicosilada.

Por otro lado Hyuncheol et al en 2012, determinaron la actividad hepatoprotectora en células HepG2 de flavonoides aislados de *Equisetum arvense* utilizando tacrina como agente hepatotóxico y la viabilidad (mediante la técnica del MTT) como parámetro indicador de daño; entre los compuestos analizados estaba la apigenina y la luteolina, las cuales son dos flavonas que difieren en el número de grupos OH presentes (la apigenina solo tiene un grupo OH en la posición 4' mientras que la luteolina tiene dos grupos OH en posición *orto* en la posición 3' - 4') (Figura 37).



Figura 37. Estructura de las flavonas Apigenina y Luteolina

La actividad hepatoprotectora de la apigenina, reportada como CE_{50} fue $>100 \mu\text{M}$ mientras que para la luteolina fue de $20.2 \mu\text{M}$. Estos datos experimentales reafirman la conclusión de Musialik et al. en 2009, quienes reportaron que cuando un flavonoide reacciona con un grupo radical, el grupo catecol en la posición 3'- 4' del anillo B es importante para la estabilidad del radical generado, esta estabilidad se genera por el puente de hidrógeno formado por el hidroxilo que no reaccionó y el oxígeno que contiene el electrón no apareado; la estabilidad del electrón no apareado aumenta si se encuentra conjugado. En cuanto a los hidroxilos de las posiciones 5 y 7 del anillo A son importantes pero no tanto como el grupo catecol del anillo B.

Considerando estos resultados experimentales, y los resultados obtenidos en el presente trabajo, será importante realizar más estudios en otros modelos de hepatoprotección y con otras moléculas de estructura similar, para poder identificar el efecto que tienen las sustituciones en los anillos del flavonoide sobre la hepatoprotección.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se estandarizó el ensayo de citotoxicidad por el método de MTT en la línea celular HepG2
- Se estandarizó el ensayo de hepatoprotección con CCl₄ con la línea celular HepG2 y se logró cuantificar el daño con un marcador bioquímico de la célula.
- Se aisló un flavonoide C-glicosilado derivado de luteolina (D1) del extracto metanólico de *T. diffusa* por CCC.
- Se determinó que la actividad hepatoprotectora del compuesto D1 resultó ser 4.02 veces mejor que la silibinina en el sistema desarrollado y que la molécula no es citotóxica.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

- Probar la actividad hepatoprotectora del compuesto D1 en diferentes modelos como las rebanadas de hígado o en modelo murino.
- Probar la actividad hepatoprotectora de la aglicona del compuesto aislado.
- Seguir con el aislamiento de la Fr. 70% MeOH para la búsqueda de un posible citotóxico.
- Aislar e identificar el compuesto D2 y probar la actividad hepatoprotectora.
- Obtener derivados tanto de la luteolina como del compuesto D1 para comparar los resultados de actividad biológica y establecer una posible relación estructura-actividad

Bibliografía

- Abhay P Deshpande, Vikram V Nimbalkar, Kailash N. Tarkase. Hepatoprotective activity of polyherbal mixture in carbon tetrachloride and D-galactosamine induced hepatotoxicity in experimental animals. Pelagia Research Library, 2012. (4):437-442.
- Abreu Guiraldo Orlando A., Cuéllar Cuéllar Armando. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2008. Vol. 13 n.3.
- Adame J, Adame H. Plantas curativas del Noreste Mexicano (primera edición). Editorial Castillo. México (2000).
- Alcaráz L, Delgado J, Real S. Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of Damiana (*Turnera diffusa*). Fitoterapia, 2004. 75: 696-701.
- Anhay P Deshpande, Vikram V Nimbalkar, Kailash N. Tarkase, Hepatoprotective activity of a polyherbal mixture in carbon tetrachloride and D-galactosamine induced hepatotoxicity in experimental animals. Der Pharmacia Sinica, 2012. 4:437-442
- Arletti R, Benelli A, Cavazzuti E, Scarpetta G, Bertolini A. Stimulating property for *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. Psychopharmacology, 1999. 143: 15-19.
- Avelino Flores María del Carmen Guadalupe, Cruz López María del Carmen, Jiménez Montejo Fabiola, Hernández López Jesús, López Robles Guadalupe, Reyes Leyva Julio R. Inducción de apoptosis en cultivos de células de cáncer de mama por extracto metanólico de *Turnera diffusa*. Revista Latinoamericana de Química, 2013. Suplemento especial (66)

Bataller R and Brenner D.A., Liver Fibrosis. Journal of Clin Invest, 2005; 209-218

Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana
www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx

Brito Naira J.N., Jorge A. López, Maria Aparecida do Nascimento, José B.M. Macedo, Gabriel Araujo Silva, Claudia N. Oliveira, Adriana Augusto de Rezende, José Brandao-Neto, Aline Shzwarz, Maria das Gracias Almeida. Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. Food and Chemical Toxicology, 2012.

Bustíos C, Dávalos M, Román R, Zumaeta E. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. Rev Gastroenterol Perú, 2007. Vol.27: 238-245

Covarrubias-Gómez Alfredo, Guevara-López Uriah. Evaluación del consumo de medicina herbal en el enfermo con dolor: Un estudio piloto. Revista Mexicana de Anestesiología, 2009. Vol.32 No1: 156-162

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, 2000. 22: 307-339.

Degenhardt Andreas, Ulrich H. Engelhardt, Christiane Lakenbrink, Peter Winterhalter. Preparative Separation of Polyphenols from Tea by High-Speed Countercurrent Chromatography. Journal Agrig. Food Chem, 2000. 48:3425-3430.

Domínguez XA. Métodos de Investigación Fitoquímica (Primera Edición) Editorial Limusa, México 1978 Capítulo 1 pag. 13

Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005 www.who.int

FAO Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y Nutrición informe “Sistemas alimentarios para una mejor nutrición” 2013.

Garza-Juárez Aurora, Salazar-Cavazos Ma. de la Luz, Salazar-Aranda Ricardo, Pérez-Meseguer Jonathan, Waksman de Torres Noemí. Correlation between Chromatographic Fingerprint and Antioxidant Activity of *Turnera diffusa* (Damiana). *Planta Medica*, 2011; 77: 958-963.

Godoi Ana F.L., Vilegas Wagner, Godoi Ricardo H.M., Van Vaeck Luc, Van Grieken René. Application of low pressure gas chromatography-ion-trap mass spectrometry to the analysis of the essential oil of *Turnera diffusa* (Ward.) Urb. *Journal of Chromatography A*, 2004. 1027: 127-130.

Hart CL, Batty GB, Morrison DS, Mitchell RJ and Davey Smith G. Obesity, overweight and liver disease in the Midspan prospective cohort studies. *International Journal of Obesity*, 2010 34: 1051-1059

Heike Bantel, Klaus Schulze-Osthoff, Mechanisms of cell death in acute liver failure. *Frontiers in Physiology* 2012. Vol.3

Hiraganahalli DB, Chandrasekaran CV, Deth S, Mundkinajeddu D, Pandre MK, Balachandran J, Agarwal A. Hepatoprotective and antioxidant activity of standardized herbal extracts. *Phcog Mag* 2012. 8: 116-123

Hyuncheol Oh, Do-Hoon Kim, Jung-Hee Cho, Youn-Chul Kim. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004. 95: 421-424.

Hossam Abdallah, Shahira Ezzat, Riham Salah El Dine, Essam Abdel-Sattar, Ashraf B. Abdel-Naim. Protective effect of *Echinops galalensis* against CCl₄-induced injury on the human hepatoma cell line (Huh7). *Phytochemistry Letters*, 2013. 6: 73-78.

- Inui Taichi, Yuchong Wang, Dejan Nikolic, David C. Smith, Scott G. Franzblau, Guido F. Pauli. Sesquiterpenes from *Oplopanax horridus*. *Journal of Natural Products*, 2010. 73: 563-567.
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drugs Metab Dispos*, 2003. 31:1499-1506.
- Kershenovich Stalnikowitz D, Bander WEissbrod A, Liver Fibrosis and Inflammation. A Review. *Annals of hepatology*, 2003. 159-163
- Kikkawa Rie, Yamamoto Toshinori, Fukushima Hiroshi, Hori Ikuo, Investigation of a hepatotoxicity screening system in primary cell cultures. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2005. Vol.30 No.1
- Krithika Rajesh, Mohankumar Ramasamy, Verma Ramtej J., Shrivastav Pranav S., Mohamad Illiyas L., Gunasekaran Palani, Narasimhan Sirinivasan. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl₄-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chemico.Biological Interactions*, 2009. 181: 351-358.
- Kunbo Wang, Zhonghua Liu, Jian-an Huang, Xinrong Dong, Lubing Song, Yu Pan, Fang liu. Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2008. 867: 282-286.
- Larsson SC and Wolk A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *British Journal of Cancer*, 2007. 97: 1005-1008
- Lima Cristo vao, Manuel Fernandes-Ferreira, Cristina Pereira-Wilson. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 2006. 79:2056-2068.
- Méndez-Sánchez N y Uribe M, Conceptos actuales en hepatología, Capítulo 1, 3-9. Masson Doyma 2003

Méndez-Sánchez Nahum, Villa Antonio R., Chávez-Tapia Norberto C., Ponciano-Rodríguez Guadalupe, Almeda-Valdés Paloma, González Daniela, Uribe Misael. Trends in liver disease prevalence in México from 2005 to 2050 through mortality data. *Annals of Hepatology*, 2005. 4(1): 52-55

Mendoza-Patiño N, De León-Rodríguez J, Figueroa-Hernández JL. *Herbolaria. Rev Fac Med UNAM*, 2005. Vol.48 No.6

Mitchell R. McGill, Matthew R. Sharpe, C. David Williams, Mohammad Taha, Steven C. Curry, Harmut Jaeschke, The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in human and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation, *The Journal of Clinical Investigation*, 2012. Vol.122 No.4

Mosmann Tim. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983. 65: 55-63

Musialik Malgorzata, Rafal Kuzmiez, Tomasz S. Pawlowski, Grzegorz Litwinienko. Acidity of Hidroxyl Groups: An Overlooked Influence on Antiradical Properties of Flavonoids. *Journal Org. Chem.*, 2009. 74: 2699-2709.

Muñoz EL, Cordero PP y Escobedo VM. Development of a Liver Unit in Latin America. *Annals Hepatol*, 2002. 1(2): 80-84

Newman David and Cragg Gordon. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 2012. 75: 311-335.

OMS Medicina tradicional 2008 www.who.int

Pei Hoon Kon, Ruzaidi Azli Mohd Mokhtar, Mohammad Iqbal. Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: Alleviation of carbón Tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity. *Human Experimental Toxicology*, 2012. 31(1): 81-91

Pérez-Meseguer. Aislamiento, purificación y caracterización de compuestos con actividad antioxidante e inmunomoduladora de *Juglans mollis* y *Turnera diffusa*. Tesis doctoral, 2008.

Pérez-Meseguer Jonathan, Garza-Juarez Aurora, Salazar-Aranda Ricardo, Salazar-Cavazos Ma Luz, De la Torre-Rodriguez Yael C., Rivas-Galindo Verónica, Waksman de Torres Noemí. Development and Validation of an HPLC-DAD Analytical Procedure for Quality Control of Damiana (*Turnera diffusa*), Using an Antioxidant Marker Isolated from the Plant. Journal of AOAC International 2010. Vol.93 No.4 (1161-1168)

Piacente Sonia, Camargo Ely E. S., Zampelli Aurelia, Gracioso Juliano S., Souza Brito Alba R., Pizza Cosimo, Vilegas Wagner. Flavonoids and Arbutin from *Turnera diffusa*. Z. Naturforsch, 2002. 57c: 983-985.

Piñeiro-Carrero Victor M., Piñeiro Eric O. Liver. Pediatrics, 2004. 113: 1097-1106.

Prakash Ramachandran, John P. Iredale. Reversibility of liver fibrosis. Annals of Hepatology, 2009. Vol.8 No.4 283:292

Rajesh K, Ramasamy M, Ramtej V, Pranav S, Illiyas M, Palani G, Srinivasan N. Isolation, characterization and protective effect of phyllanthin against CCl₄-induced toxicity in HepG2 cell line. Chemico-Biological Interactions, 2009. 181: 351-358.

Rupeshkumar M., Kavitha K., Basu S, Antioxidant and Hepatoprotective Effect of flavanone from *Cardiospermum halicacabum* N. Against Acetaminophen induced Hepatotoxicity in Rats. Journal of pharmacy Research 2012. 5(1): 544-547

Salazar-Aranda Ricardo, Pérez-López Luis Alejandro, López Arroyo Joel, Alanís-Garza Blanca Alicia, Waksman de Torres Noemí. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2009. Volume 2011 Article ID 536139

Secretaría de Salud. Información Histórica de Estadísticas Vitales Nacimientos y Defunciones 1893-2010, 2012. www.epidemiologia.salud.gob.mx.

Shamama Javed, Kanchan Kohli, Mushir Ali. Reassessing bioavailability of silymarin. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 2011. Vol.16 No.3, 239-249.

Shikanga Emmanuel Amukohe, Alvaro Vijojoen, Sandra Combrinck, Andrew Marston. Isolation of *Sceletium* alkaloids by high-speed countercurrent chromatography. *Phytochemistry Letters*, 2011. 4: 190-193.

Taha Manal Mohaned Elhassan, Salga Muhammad Saleh, Ali Hapipah Mohd, Abdulla Mahmood Ameen, Abdelwahab Siddig Ibrahim, Hadi A. Hamid A. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012. 141: 237-281.

Torres-González Liliana, Muñoz-Espinoza Linda Elsa, Rivas-Estilla Ana María, Trujillo-Murillo Karina, Salazar-Aranda Ricardo, Waksman de Torres Noemi, Cordero-Pérez Paula. Protective effect of four Mexican plants against CCl₄-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Annals of hepatology*, 2011. Vol 10 No.1: 73-79

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

Vaishali N Shah, MAmta B Shah, Parloop A Bhatt, Hepatoprotective activity of *Punarnavashtak kwath*, an Ayurvedic formulation, against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats and on the HepG2 cell line, *Pharmaceutical Biology*, 2011; 49(4): 408-415

- Yong Pil Hwang, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Seong Sik Jeon, Hye Gwag Jeog. Protective Effects of Puerarin on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Archives of Pharmacal Research, 2007. Vol.30 No.10 1309-1317.
- Zaho Jianping, Dasmahapatra Asok K., Khan Shabana I., Khan Ikhlas A. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). Journal of Ethnopharmacology, 2008. 120: 387-393.
- Zhao Jianping, Pawar Rahul S., Ali Zulfiqar, Khan Ikhlas A. Phytochemical Investigation of *Turnera diffusa*. Journal of Natural Products, 2007. 70: 289-292.
- Zhao Xiaoming, Cong Xiaonan, Zheng Ligli, Xu Lina, Yin Lianhong, Peng Jinyong. Dioscin, a natural steroid saponin, shows remarkable protective effect against acetaminophen-induced liver damage in vitro and in vivo. Toxicology letters, 2012. 214: 69-8.