

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

**SEP**

**TRABAJO PROFESIONAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO BIOQUÍMICO**

**QUE PRESENTA:**

**PABLO ALBERTO FRANCO URQUIJO**

**CON EL TEMA:**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA E  
IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Elytraria imbricata*”**

**MEDIANTE:**

**OPCION X  
(MEMORIA DE RESIDENCIA PROFESIONAL)**

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

SEPTIEMBRE DE 2014

"2014, Año de Octavio Paz"

DIRECCIÓN  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 13 de mayo del 2014

OFICIO NUM. DEP-CT-110-2014

**C. PABLO ALBERTO FRANCO URQUIJO**  
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.  
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. ING. JAQUELINE LEYRA HERNÁNDEZ,, Q.B.P. AURA FLORES PÉREZ ,ING. JAVIER RAMIREZ DÍAZ Y DR. REINER RINCON ROSALES En el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

**" EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Elytraria imbricata*."**

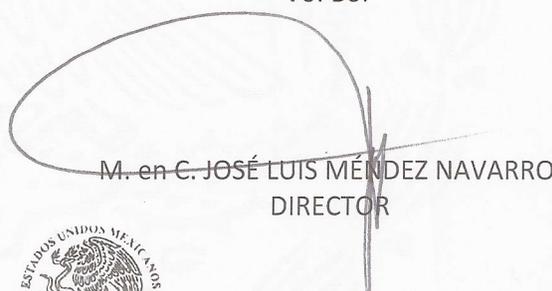
Registrado mediante la opción:  
**X (MEMORIA DE RESIDENCIA PROFESIONAL)**

**ATENTAMENTE**  
**"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"**

  
ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE  
ESTUDIOS PROFESIONALES

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares  
C.c.p.- Expediente  
I'JLMN/I'JJAO/I'eeam

Vo. Bo.

  
M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO  
DIRECTOR



Secretaría de Educ. Pública  
Instituto Tecnológico  
de Tuxtla Gutiérrez,  
Div. de Est. Profesionales



## CONTENIDO

	Página
<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
3.1 Objetivos específicos	4
<b>4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO</b>	<b>5</b>
4.1 Historia	5
4.2 Misión	5
4.3 Visión	5
4.4 Valores	5
4.5 Política de calidad	6
4.6 Ubicación	6
<b>5. PROBLEMAS A RESOLVER</b>	<b>7</b>
<b>6. ALCANCES Y LIMITACIONES</b>	<b>7</b>
<b>7. FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
7.1 Clasificación y biosíntesis del metabolismo secundario	8
7.1.1 Terpenos	9
7.1.2 Compuestos fenólicos	11
7.1.3 Alcaloides	13
7.2 Extracción de metabolitos	16
7.3 Cromatografía en capa fina	16
7.4 Microorganismos Infecciosos	18
7.4.1 Bacterias	18
7.4.2 Virus	19
7.4.2.1 Influenza	20
7.4.2.2 Características del virus de influenza A	20
7.4.2.3 Ciclo de replicación viral	21
7.4.2.4 Variabilidad y evolución antigénica	22

7.4.2.5 Antivirales empleados contra el virus de la influenza	23
7.6 <i>Elytraria imbricata</i>	24
7.6.1 Usos reportados	25
<b>8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES</b>	<b>26</b>
8.1 Recolección y secado del material biológico	26
8.2. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios	26
8.2.1 Preparación de extractos	26
8.2.2 Identificación de metabolitos secundarios por CCF	27
8.3 Elaboración de extractos para las pruebas antibacteriales y antivirales	29
8.4 Evaluación de la actividad antibacterial	29
8.4.1 Ensayo antibacterial	30
8.5 Evaluación de la actividad antiviral	30
8.5.1 Mantenimiento y crecimiento celular	31
8.5.2 Ensayo de hemoaglutinación	31
8.5.3 Cuantificación de virus por ensayo en placa	31
8.5.4 Evaluación de la citotoxicidad	32
8.5.6 Ensayo de reducción del efecto citopático	32
8.6 Análisis estadístico	33
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>34</b>
9.1 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios	34
9.1.1 Detección de flavonoides	34
9.1.2 Detección de antraglucósidos	36
9.1.3 Detección de Alcaloides	40
9.1.4 Detección de coumarinas	41
9.1.5 Detección de terpenos	42
9.1.6 Detección de saponinas	43
9.2 Evaluación de la actividad antibacterial	45
9.3 Evaluación de la actividad antiviral	47
9.3.1 Ensayo de hemoaglutinación	47
9.3.2 Cuantificación de virus por ensayo en placa	48
9.3.3 Evaluación de la citotoxicidad	48
9.4 Ensayo de reducción del efecto citopático	49
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>53</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Ubicación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.	6
Fig. 2. Rutas metabólicas de metabolitos secundarios.	9
Fig. 3. Biosíntesis de terpenos.	10
Fig. 4. Compuestos fenólicos derivados de la vía del shikimato.	13
Fig. 5. Clases de alcaloides.	15
Fig. 6. Estructura del virus de la influenza.	21
Fig. 7. Ciclo de replicación del virus de influenza.	22
Fig. 8. <i>Elytraria imbricata</i> .	24
Fig. 9. a) Placa cromatográfica de flavonoides revelada con NP, bajo luz UV 364 nm. PA: partes aéreas, R: raíz, N: naringenina. b) Representación esquemática de la ubicación de los compuestos	34
Fig. 10. Formación de complejo.	36
Fig. 11. a) Placa cromatográfica de antraglucósidos b) Representación esquemática de los compuestos c) Placa cromatográfica de antraglucósidos con posibles compuestos oxidados. PA: Partes aéreas, R: Raíz, AB: <i>Aloe barbadensis</i> .	37
Fig. 12. Estructura química de antraquinonas, antronas, y antranoles.	38
Fig. 13. a) Placa cromatográfica de alcaloides. b) Representación esquemática de los compuestos, R: Raíz PA: Partes aéreas, ET: Extracto de <i>Nicotiana tabacum</i> .	39
Fig. 14. a) Placa cromatográfica de alcaloides al momento de aplicación de Dragendorff, b) Representación esquemática de la aparición de nicotina en la	40

placa, R: Raíz, PA: Partes aéreas, ET: Extracto de *Nicotiana tabacum*, N: Nicotina.

- Fig. 15. Partes aéreas, ET: Extracto de *Nicotiana tabacum*., C<sub>1</sub>: Compuesto 1, N: Nicotina. 40
- Fig. 16. a) Placa cromatográfica de coumarinas bajo luz UV de 364 nm.  
b) Representación esquemática de los compuestos. R: Raíz, PA: partes aéreas. 41
- Fig. 17. a) Placa cromatográfica de terpenos revelada con el reactivo de vainillina- ácido sulfúrico.  
b) Representación esquemática de los compuestos. R: Raíz, PA: partes aéreas. 43
- Fig. 18. a) Placa cromatográfica de saponinas revelada con el reactivo de vainillina-ácido sulfúrico.  
b) Representación esquemática de los compuestos. R: Raíz, PA: partes aéreas. 44
- Fig. 19. Ensayo de hemoaglutinación. 47
- Fig. 20. Células MDCK observadas al microscopio después del ensayo de citotoxicidad, para el extracto metanólico y etanólico respectivamente evaluadas a una concentración de 100 µg·mL<sup>-1</sup>. 49

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ficha técnica taxonómica de <i>Elytraria imbricata</i> .	25
Cuadro 2. Sistemas de solventes empleados para CCF	29
Cuadro 3. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de flavonoides	35
Cuadro 4. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de antraglucósidos	37
Cuadro 5. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de coumarinas.	42
Cuadro 6. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de terpenos	43
Cuadro 7. Halos de inhibición de las bacterias evaluadas contra Gentamicina (10µg·mL <sup>-1</sup> )	46

## 1. INTRODUCCIÓN

En la materia viva el metabolismo puede ser descrito como un gran grupo de reacciones químicas reguladas y controladas por enzimas que producen energía en forma de ATP, sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de tejidos que ayudan a la supervivencia del organismo en diferentes circunstancias. Dependiendo del origen de la ruta biosintética y función que tengan los compuestos producidos en el metabolismo son llamados primarios o secundarios.

Las rutas primarias del metabolismo encontramos a los metabolitos primarios, los cuales están presentes en la naturaleza y son esenciales para todas las formas de vida. Estos compuestos incluyen carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos nucleídos que son necesarios para crear y mantener vida. Típicamente se ven envueltos en la regulación de energía de los organismos con el crecimiento y el desarrollo de tejidos.

Los metabolitos secundarios son de una existencia más limitada. Mientras a algunos no se les ha encontrado una función en el organismo, otros aparentemente juegan un rol vital. Su producción puede variar con condiciones tales como el entorno y nutrición del organismo. Pueden tener un papel importante en la defensa contra plagas y patógenos, proporcionando protección contra la radiación UV y estrés o actuar como compuestos volátiles de olor y pigmentos (Tolonen, 2003).

Un rasgo característico de las plantas es su capacidad para sintetizar y almacenar una amplia variedad de los compuestos antes mencionados, también llamados productos naturales. El número de estos excede a más de 100 000, sin embargo el número real en la naturaleza es sin duda mucho mayor, ya que sólo el 20-30% de las plantas han sido investigadas fitoquímicamente hasta ahora. Estos metabolitos han evolucionado en respuesta a las necesidades y desafíos del ambiente de las plantas. La naturaleza ha estado llevando a cabo sus propias combinaciones químicas por más de 3 mil millones de años. Algunas de ellas poseen implicaciones farmacológicas, siendo interesantes para distintas aplicaciones biotecnológicas.

Un área importante es la fitoterapia donde varios de miles de plantas se usan alrededor del mundo para tratar padecimientos y enfermedades (Wink, 2010, Ramawat, Dass y Mathur, 2009).

La organización mundial de la salud (OMS) estima que 4 billones de personas, 80% de la población mundial utiliza la medicina a base de plantas en algún aspecto para el cuidado de la salud. Prácticamente todas las culturas alrededor del mundo han dependido históricamente, y continuaran dependiendo de las plantas medicinales para la atención primaria de salud. Los productos naturales de plantas tradicionalmente han proporcionado a la industria farmacéutica una de sus fuentes más importantes de compuestos guía y hasta un 40% de los fármacos modernos se derivan de fuentes naturales, utilizando la sustancia natural o una versión sintetizada (Jassim y Naji, 2003, Fabricant y Fansworth, 2001).

México posee una diversidad de flores, etnias y un viejo registro de uso de las plantas como medicinas que lo hacen un reservorio de nuevas y útiles sustancias bioactivas (Mata, Cruz y Rojas, 1999). En este contexto, la investigación de plantas medicinales supone una alternativa para la obtención de nuevos compuestos fitoquímicos produciendo un especial interés en zonas donde la medicina tradicional se usa cotidianamente. El estado de Chiapas entonces representa una alternativa viable para el estudio de plantas empleadas en el uso y tratamientos de enfermedades, por lo que surge la inquietud de evaluar la actividad biológica de *Elytraria imbricata*, planta utilizada tradicionalmente contra procesos infecciosos, cuya información bibliográfica no revela datos fitoquímicos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Chiapas cuenta con una gran cantidad de especies vegetales dentro de su flora nativa, muchas de estas han sido utilizadas como agentes terapéuticos en distintos sectores de la población, sin embargo, existe muy poca información reportada sobre los compuestos químicos presentes que proporcionen evidencia sólida sobre la eficacia y propongan alternativas viables que conlleven al aislamiento de metabolitos para su uso en distintas aplicaciones biotecnológicas.

Uno de los grandes problemas de salud pública en países en desarrollo son las enfermedades infecciosas causadas por bacterias, virus u hongos, han generado una problemática en la salud pública debido a la falta de disponibilidad de fármacos en los sectores menos favorecidos de la población así como también una creciente resistencia generada por el uso incorrecto de los mismos. La cantidad de metabolitos secundarios producidos por las plantas, así como la diversidad estereoquímica en sus grupos funcionales proponen una alternativa viable para la obtención de compuestos que presenten actividad antimicrobiana y posean efectos terapéuticos con mecanismos de acción diferente a la de algunos fármacos. Para ello es necesaria la identificación preliminar de compuestos, así como la realización de bioensayos fáciles de implementar con resultados relativamente rápidos que permitan la determinación de los principales constituyentes químicos y la posible presencia de alguna actividad biológica relevante.

Por lo anterior, se decidió elegir a *Elytraria imbricata*, especie vegetal que tiene distintos usos según la medicina tradicional y no cuenta con bibliografía reportada sobre sus principales metabolitos secundarios. Con ello se pretende establecer bases científicas que ayuden a la validación o no del uso tradicional que se le da a la misma. Además de la obtención de conocimientos que de ser significativos en un futuro permitirían la selección de moléculas bioactivas o bien reunir información que sirva de antecedente para la revisión de alguna otra actividad biológica a evaluar.

### 3. OBJETIVO

Identificar fitoquímicamente los metabolitos secundarios de *Elytraria imbricata* y su actividad biológica sobre virus y bacterias.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Identificación cualitativa de antraglucósidos, alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas y cumarinas.
- Obtención de extractos reconcentrados metanólicos y etanólicos
- Evaluación de la actividad antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* de los extractos metanólicos y etanólicos
- Evaluación de la actividad antiviral de los extractos metanólicos y etanólicos sobre el virus de la influenza AH1N1.

## **4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO**

### **4.1 Historia del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez**

En la década de los 70s, se incorpora el estado de Chiapas al movimiento educativo nacional extensión educativa, por intervención del Gobierno del Estado de Chiapas ante la federación.

Esta gestión dio origen a la creación del Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez (ITRTG) hoy Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG). El día 23 de agosto de 1971 el Gobernador del Estado, Dr. Manuel Velasco Suárez, colocó la primera piedra de lo que muy pronto sería el Centro Educativo de nivel medio superior más importante de la entidad. El día 22 de octubre de 1972, con una infraestructura de 2 edificios con 8 aulas, 2 laboratorios y un edificio para talleres abrió sus puertas el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez con las carreras de Técnico en Máquinas de Combustión Interna, Electricidad, Laboratorista Químico y Máquinas y Herramientas.

### **4.2 Misión**

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los morales éticos.

### **4.3 Visión**

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable en la región.

### **4.4 Valores**

- El ser humano
- El espíritu de servicio
- El liderazgo
- E trabajo en equipo
- La calidad

-Respeto al medio ambiente

#### 4.5 Política de calidad

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, establece el compromiso de implementar todos sus procesos, orientándolos hacia la satisfacción de sus clientes, sustentada en la Calidad del Proceso Educativo para cumplir con sus requisitos, mediante la eficacia de un Sistema de Gestión de Calidad y de mejora continua, conforme a la norma ISO 9001:2008 y su equivalente nacional NMX-CC-90001-IMNC-2008.

#### 4.6 Ubicación

Carretera panamericana km. 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

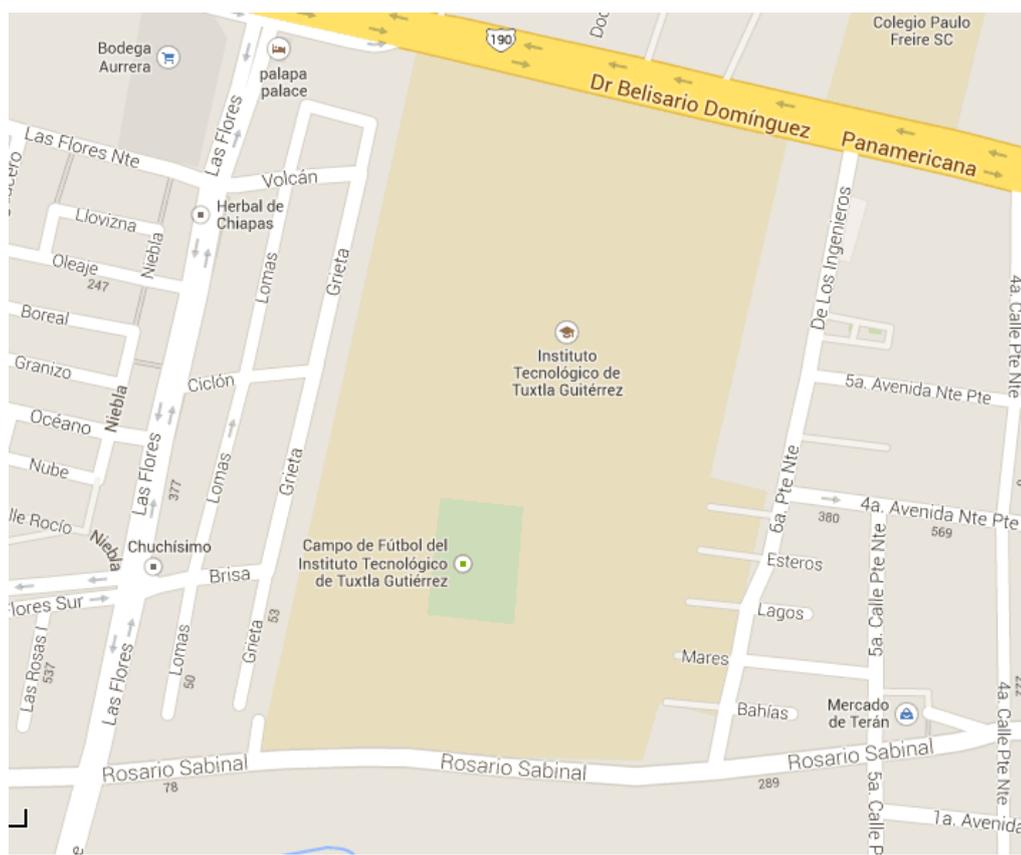


Figura 1. Ubicación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

## 5. PROBLEMAS A RESOLVER

- Generar información fitoquímica de *Elytraria imbricata* que no se encuentra reportada.
- Proveer información que relacione el uso tradicional de *Elytraria imbricata* con su actividad biológica.

## 6. ALCANCES Y LIMITACIONES

Con la realización de los objetivos propuestos se logró alcanzar la identificación de la mayoría de los principales metabolitos secundarios presentes en la raíz y las partes aéreas de la planta. Sin embargo las limitaciones que se presentaron para una identificación de todos los metabolitos fue la falta de reactivos y solventes. Los alcances que presentó la metodología empleada son las características que posee la cromatografía en capa fina, permitiendo la separación de metabolitos pero no la identificación de estructuras específicas.

Durante la realización del presente trabajo se limitó únicamente a la utilización de extractos metanólicos y etanólicos de las partes aéreas de la planta debido a la disposición de materia prima, misma que conlleva a una recolección e identificación adecuada. Evaluado con esto dos posibles actividades biológicas, que se pueden relacionar con enfermedades infecciosas. Entre ellas, las infecciones por bacterias se encuentran dentro el uso tradicional de la planta, sin embargo, los resultados obtenidos se limitan solo a ensayos *in vitro* y no representan evidencia para un posible uso médico.

## 7. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 7.1 Clasificación y biosíntesis del metabolismo secundario

Los compuestos bioactivos provenientes del metabolismo secundario de las plantas se dividen en tres categorías principales: (a) terpenos y terpenoides (aproximadamente 25.000 tipos), (b) alcaloides (aproximadamente 12.000 tipos) y (c) compuestos fenólicos (aproximadamente 8,000 tipos) (Croteu, 2000).

La mayoría de los compuestos bioactivos pertenecen a un grupo dentro de un número de familias, cada una tiene características estructurales particulares que surgen de la manera en que se construyen en la naturaleza. Hay cuatro vías principales para la síntesis de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos: (1) ruta del ácido shikímico, (2) ruta del acetato, (3) vía del ácido mevalónico y (4) la vía deoxixilulosa fosfato o metileritritolfosfato.

Los alcaloides son producidos a partir de los aminoácidos aromáticos (proviertes de la ruta del ácido shikímico) y aminoácidos alifáticos (ciclo del ácido tricarbóxico). Los compuestos fenólicos se sintetizan a través de vía del ácido shikímico y la ruta del acetato. A través de ácido mevalónico y deoxixilulosa se producen los terpenos. En la figura 2 se observan las diferentes vías metabólicas simplificadas para la producción de los tres principales grupos de compuestos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013).



Los hemiterpenos se producen a partir del Dimetilalildifosfato (DMAPP). Los demás terpenos se producen a partir de DMAPP y IPP por una cadena más larga de intermediarios de prenil difosfato formado por las preniltransferasas, estas catalizan la formación de geranildifosfato (GPP), farnesildifosfato (FPP) y geranilgeranildifosfato (GGPP) de una molécula de DMAPP y una, dos, o tres moléculas de IPP respectivamente (Figura 3), llevando a la formación de distintos terpenos (Keeling y Bohlmann, 2012).

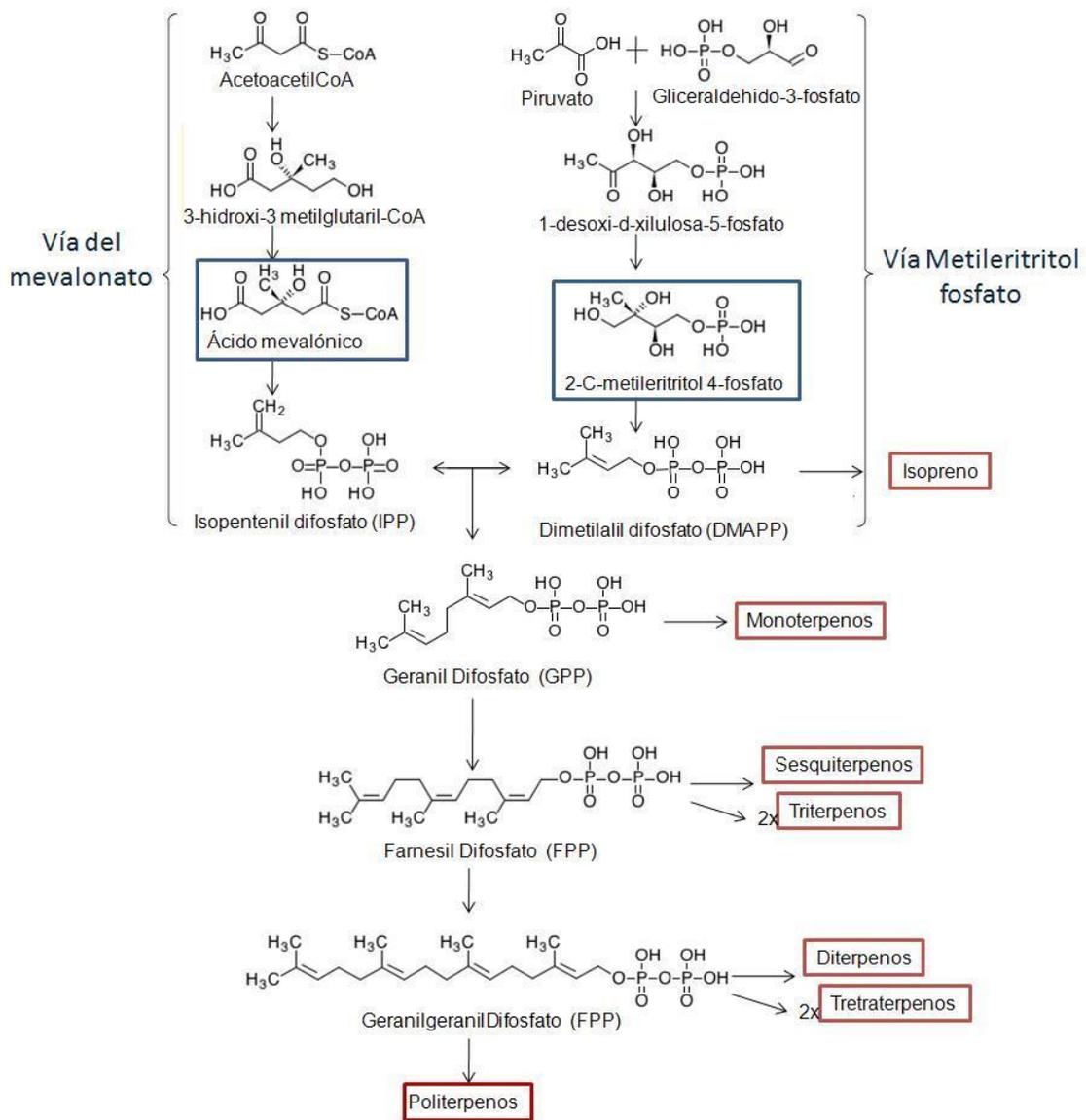


Figura 3. Biosíntesis de terpenos

### 7.1.2. Compuestos fenólicos

Prácticamente todas las plantas contienen productos naturales que incluyen un anillo aromático carbocíclico o heterocíclico que generalmente contiene uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes. Los compuestos aromáticos se forman por distintas rutas biosintéticas que incluyen la vía del acetato y shikimato (Cseke *et al.*, 2006).

#### *Vía del acetato*

Los productos naturales aromáticos de origen policético son menos prevalentes en las plantas comparadas con microorganismos. La mayoría de los constituyentes de las plantas que contienen estructuras aromáticas provienen de la vía del shikimato. A diferencia de los derivados de la vía de shikimato, productos aromáticos de la vía del acetato contienen invariablemente un patrón de oxigenación meta debido a su origen a partir de la ciclación de los policétidos (Keeling y Bohlmann, 2012).

La biosíntesis comienza con la unión de unidades de acetato por reacciones de condensación conocidas como reacciones Claisen, estas se repiten hasta generar un  $\beta$ -cetoéster con una longitud de cadena apropiada. Durante este proceso la cadena es altamente reactiva y se estabilizada con la asociación de grupos enzimáticos hasta completarla y las reacciones de ciclación ocurran (Dewick, 2002).

#### *Vía del shikimato*

La vía del shikimato vincula el metabolismo de los carbohidratos con la biosíntesis de productos naturales aromáticos a través de la formación de aminoácidos aromáticos (Figura 4). Esta ruta solo se encuentra en plantas y microorganismos, proporcionando la mayor parte de compuestos fenólicos en plantas. Una amplia gama de compuestos derivados de esta vía y en combinación con la ruta del acetato se pueden clasificar en:

- Derivados del ácido benzoico

Como se nota en sus estructuras, algunos derivados del ácido benzoico se forman directamente del ácido shikímico por reacciones de deshidratación, deshidrogenación y enolización. Dentro de los cuales encontramos al ácido gálico componente de los taninos hidrolizables.

- Derivados del ácido cinámico

El ácido cinámico y sus derivados encontrados en las plantas se originan a partir de aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina con la eliminación de amoniaco.

- Fenilpropanoides

Contienen una cadena lateral de tres carbonos unido aun fenol, estos se obtienen del ácido cinámico y sus derivados por una serie de reducciones y otras transformaciones.

- Coumarinas

Derivan de su precursor p-ácido coumárico se producen ampliamente tanto en forma libre como glucósidos.

- Estilbenos, flavonoides, antocianidinas e isoflavonoides

En contraste con otros compuestos fenólicos, el esqueleto de carbono base de estos incorpora elementos de las vías del shikimato y acetato. Los flavonoides tienen dos anillos bencénicos separados por una unidad de propano, derivados de una flavona. Las diferentes clases dentro del grupo se distinguen por oxígenos adicionales contenidos en los anillos heterocíclicos y grupos hidroxilo. Estos incluyen a las chalconas, flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianinas e isoflavonas. Otro grupo de flavonoides comunes incluyen auronas, xantonas y taninos condensados (Keeling y Bohlmann, 2012, Cseke *et al.*, 2006).

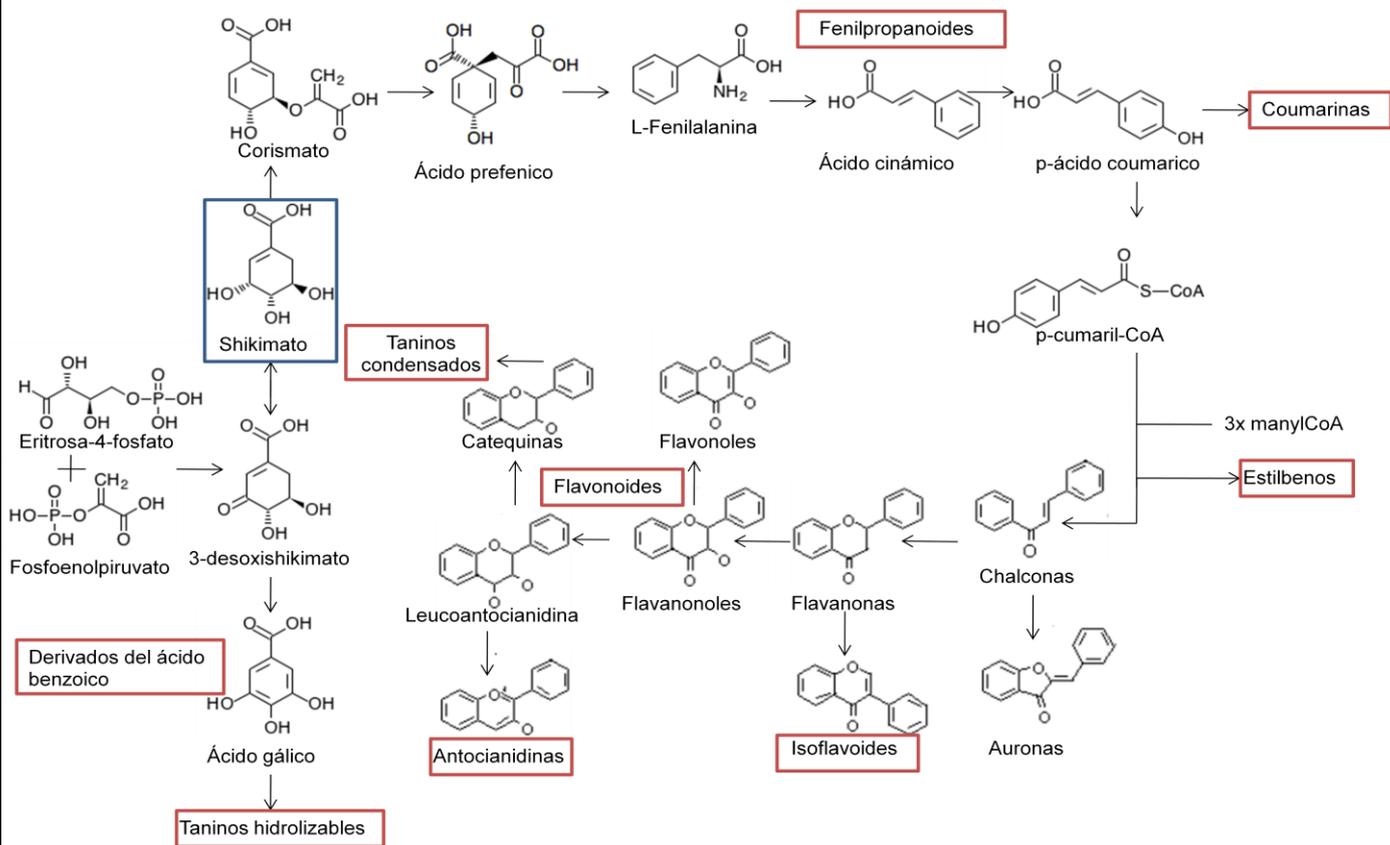


Figura 4. Compuestos fenólicos derivados de la vía del shikimato

### 7.1.3 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos que contienen nitrógeno ampliamente distribuidos en diferentes grupos de plantas. Casi todos los alcaloides son alcalinos y la mayoría son ópticamente activos. Se definen clásicamente como compuestos derivados de plantas, farmacológicamente activos, compuestos básicos derivados de aminoácidos que contengan uno o más átomos de nitrógeno heterocíclicos. En la práctica la mayoría de los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno son considerados alcaloides, amén que puedan clasificarse fácilmente de otro modo. Abarcan un enorme grupo de aproximadamente 12000 productos naturales. El requisito principal para la clasificación como alcaloide es la presencia de un átomo de nitrógeno básico en cualquier posición en la molécula, que no incluya nitrógeno en una amida o enlace peptídico. Como implica esta excepcionalmente amplia definición, los

alcaloides forman un grupo de moléculas estructuralmente diversas y biogenéticamente no relacionadas (O'Connor, 2010, Cseke *et al.*, 2006).

### *Clasificación*

Los alcaloides comúnmente se construyen con aminoácidos como materiales de partida, sin embargo, también se conocen algunos derivados de purinas. La estructura básica de un alcaloide se define por el sustrato utilizado como material de partida. Por ejemplo, tirosina es usada para la producción de alcaloides de tetrahidroisoquinolina (Figura 5a). El triptófano es el material de partida para los alcaloides indólicos así como también alcaloides de núcleo  $\beta$ -carbonilo. (Figura 5b). Adicionalmente el grupo índol del triptófano puede ser modificado para la formación de alcaloides quinolínicos (Figura 5b). La ornitina, un aminoácido no proteico derivado de glutamato o arginina, es usado para producir alcaloides pirrolizidínicos y tropánicos (Figura 5c). El ácido nicotínico puede ser usado en combinación con otros aminoácidos para producir alcaloides nicotínicos (Figura 5d). La lisina, aminoácido que contiene un grupo metileno extra comparado con ornitina produce análogos estructurales depiperidina, quinolizidina, e indolizidina (Figura 5e). Alcaloides conocidos que se deriven de otros aminoácidos son todavía más raros. Además de los aminoácidos como estructura base, existe un número de materiales que contienen nitrógeno que pueden servir como precursores de alcaloides. El ácido antralínico, un precursor del triptófano es usado para la producción de alcaloides de quinazolina, quinolina y acridina (Figura 5f). También han sido aislados un número de alcaloides derivados de purinas (Figura 5g). Finalmente algunos alcaloides adquieren el nitrógeno básico a través de la transaminación de poliacetatos o terpenos existentes. Estos compuestos también son llamados pseudoalcaloides (O'Connor, 2010).

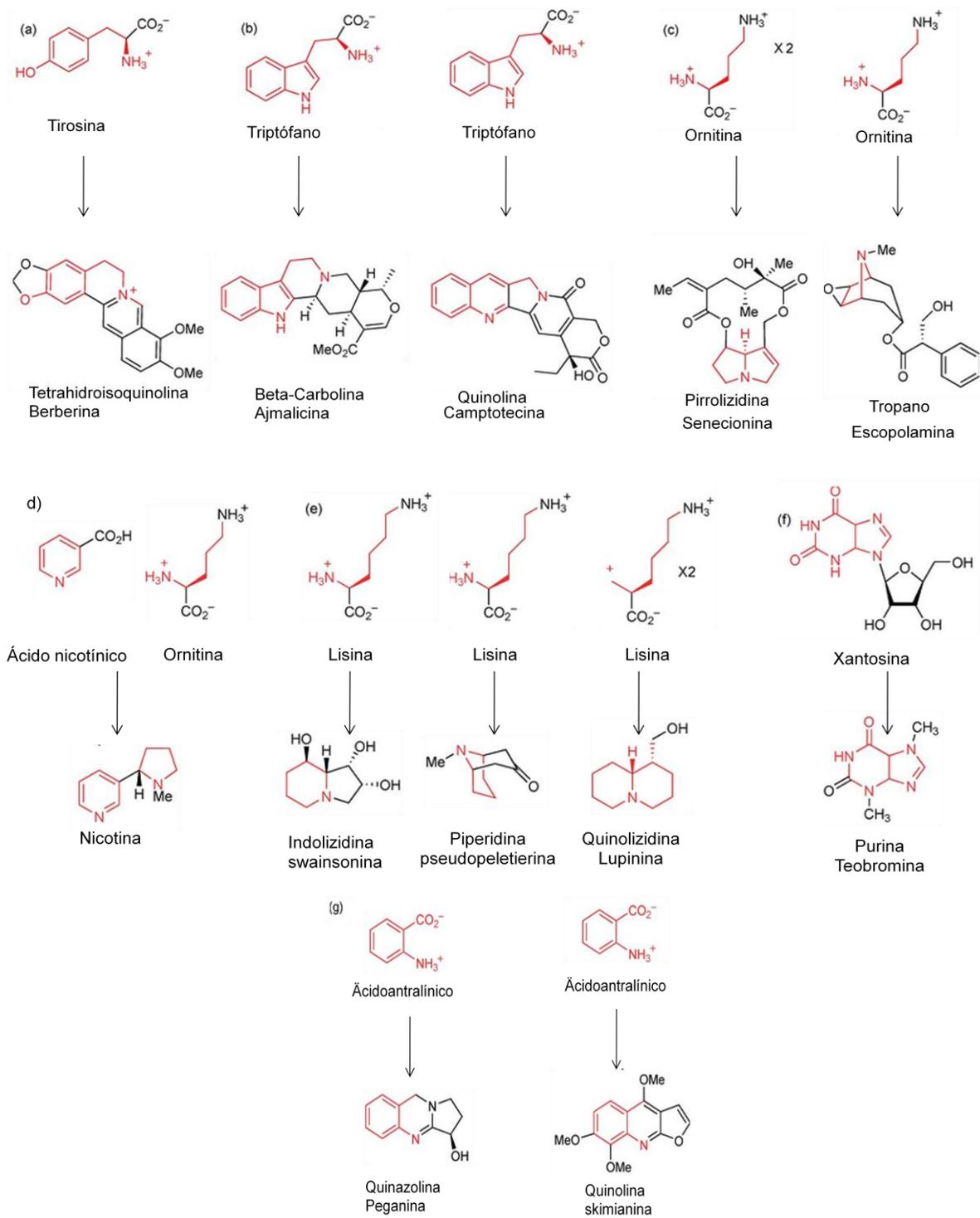


Figura 5. Clases de alcaloides

## **7.2 Extracción de metabolitos**

La extracción es un término usado farmacéuticamente que implica la separación de las porciones activas de los tejidos vegetales de la parte inactiva o los compuestos inertes mediante el uso selectivo de solventes en distintos procedimientos (Handa *et al.*, 2008).

Normalmente se realiza la extracción a partir de muestras secadas por aire o liofilizadas empleando una variedad de solventes, y a veces secuencialmente de baja a alta polaridad si se utiliza un fraccionamiento crudo. Sin embargo, generalmente se utiliza un solvente polar como etil acetato o metanol y se realiza la separación de los compuestos hasta una etapa cromatográfica posterior (Colegate y Molyneux, 2008).

A menudo los extractos contienen una serie de compuestos relacionados que comparten una funcionalidad en común. Los extractos crudos a partir de plantas que han sido desarrollados sin aislamiento de los componentes tienen muchas aplicaciones, en particular cuando parece que un número de compuestos presentes puedan tener efectos sinérgicos (Eloff y McGaw, 2006).

Las técnicas más utilizadas y mayormente aplicadas en las plantas medicinales para la extracción de los principios activos son la maceración, percolación e infusión. En estas extracciones básicas el único propósito es obtener la porción terapéutica y eliminar el material inerte con la selección de un solvente. Estas técnicas llegan a jugar un papel decisivo en la evaluación cualitativa y cuantitativa de los extractos (Handa *et al.*, 2008).

## **7.3 Cromatografía en capa fina**

La separación de una o más sustancias a partir de un extracto crudo o fracciones de un extracto puede ser un proceso largo y costoso. La obtención de un compuesto puro a menudo requiere varias etapas de separación que involucran diferentes técnicas cromatográficas. Este es el caso, particularmente cuando se trata de metabolitos bioactivos donde los compuestos pueden estar presentes como trazas en una matriz con docenas de otros constituyentes (Ghisalberti, 2008).

La cromatografía es uno de los medios más útiles en la separación de mezclas de compuestos y es altamente empleada como una técnica de identificación y purificación. En la cromatografía la mezcla es separada por la distribución diferencial de los componentes entre la fase estacionaria y la fase móvil (Cseke *et al.*, 2006).

La cromatografía en capa fina (CCF), también llamada cromatografía plana, ha sido ampliamente aceptada y usada como técnica de separación por más de 65 años. Se trata de una técnica simple, de bajo costo, versátil que se puede adaptar fácilmente cualquier situación cualitativa, cuantitativa o preparativa. A pesar de que no se compara con otras técnicas cromatográficas como herramienta analítica, no existe un sustituto de esta técnica cuando se requieren análisis cualitativos en extractos de plantas. Esta se ha vuelto casi indispensable para la estandarización de materiales provenientes de plantas ya que provee un perfil fitoquímico. Las muestras pueden ser aplicadas sin una preparación exhaustiva proporcionando distintos frentes con varios múltiples análisis y bajos costos por muestra (Handa *et al.*, 2008).

La CCF se lleva de la siguiente manera. Se coloca una pequeña alícuota cerca de un extremo de la fase estacionaria, una capa fina de absorbente, para formar la zona inicial. La muestra se seca y el final de la fase estacionaria se coloca con la zona inicial de la fase móvil, que por lo general son una mezcla de 2 a 4 solventes puros, dentro de una cámara cerrada. Si la fase estacionaria y la fase móvil se eligieron correctamente, los componentes de la mezcla migran a diferentes velocidades durante el movimiento de la fase móvil sobre la estacionaria. Cuando la fase móvil ha recorrido una distancia apropiada se deja secar y las zonas son detectadas en luz del día o bajo luz ultravioleta, con o sin la aplicación de algún reactivo (Fried, 2003).

## 7.4 Microorganismos Infecciosos

Una infección ocurre cuando un microorganismo sobrevive y se multiplica dentro de otro, generalmente más grande, llamado huésped. Dentro de las enfermedades infecciosas, los signos y síntomas no deseados por lo general son el resultado de daños provocados por el microorganismo que se conoce como patógeno. Existe una gran variedad de agentes patógenos que causan infecciones en los humanos que van desde virus, bacterias hasta complejos protozoarios (Saker *et al.*, 2004).

### 7.4.1 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas, rodeados de paredes celulares que contienen peptidoglucanos. Se dividen de distintas maneras de acuerdo a su forma (cocos, bacilos y espiroquetas) y características de acuerdo a su tinción (Gram-positivas y Gram-negativas) (Beltz, 2011).

Los *Staphylococcus* son bacterias gran positivas con diámetros de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ . A la fecha se han registrado 32 especies y 8 subespecies de este género, muchos de los cuales colonizan el cuerpo humano. Sin embargo, *S. aureus* y *S. epidermis* son dos de las cepas más caracterizadas y estudiadas. *S. aureus* se considera un patógeno importante que coloniza e infecta a pacientes inmunodeficientes y hospitalizados asociándose con enfermedades agudas en los tejidos, meningitis, endocarditis y síndrome de shock tóxico. *S. epidermis* es particularmente la especie más frecuentemente aislada del epitelio humano colonizando predominantemente cabeza, axilas y orificios nasales. Este es considerado como un importante patógeno oportunista, se considera la causa más frecuente de infecciones nosocomiales a una velocidad tan alta y con más virulencia que *S. aureus*. En particular *S. epidermis* representa la fuente más común de las infecciones en cirugías o implantación de prótesis. Esto probablemente se debe a que es un colonizador permanente y ubicuo de la piel resultando en una alta probabilidad de contaminación (Harris, Foster y Richards, 2002, O’Gara y Humpreys, 2001, Mack *et al.*, 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram negativo que mide de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$ . Casi todas las cepas son móviles por medio de un solo flagelo polar. Se trata de una bacteria que comúnmente se encuentra en el suelo y agua que pertenece a la familia Pseudomonadaceae. Casi todos los casos clínicos de infección por *P. aeruginosa* se atribuyen a una inmunodeficiencia general. Tres de las enfermedades más representativas causadas por *P. aeruginosa* son la bacteremia en víctimas de quemaduras graves, infección pulmonar crónica en personas con fibrosis quística y la queratitis ulcerativa en usuarios de lentes de contacto de uso prolongado, cuyos tratamientos pueden llegar a ser difíciles debido a su habilidad para producir biofilms y desarrollar resistencia a los antibióticos (Japoni, Farshad y Alborzi, 2009, Balcaso, Yeung y Zheng, 2011).

#### **7.4.2 Virus**

Los virus son partículas de nucleoproteínas ultramicroscópicas, acelulares y metabólicamente inertes que contienen segmentos de ARN o ADN, con o sin una capa lipídica envolvente. A diferencia de las bacterias, los virus obligatoriamente son parásitos intracelulares que utilizan la maquinaria de la célula huésped para propagar nuevos virus. Los virus tienen numerosas estrategias de invasión celular y cada cepa tiene su propia configuración única de moléculas que les permite entrar a las células huésped ajustando las moléculas de su superficie con las moléculas de la célula a infectar. La variación genética, diversidad de transmisión, replicación eficiente y la habilidad de persistir sin un hospedero son las principales ventajas evolutivas de los virus que en consecuencia les han permitido adaptarse a todas las formas de vida ocupando numerosos nichos ecológicos que resultan en enfermedades muy extendidas en los seres humanos y otros organismos (Chattopadhyay, 2006).

### **7.4.2.1 Influenza**

La influenza es una infección respiratoria generalizada. Cada año causa epidemias que se propagan de un país a otro, o incluso pandemias que involucran una parte importante de la población humana. Los síntomas más frecuentes son la tos y fiebre, congestión nasal, dolor de cabeza, dolor de garganta, fatiga, dolores articulares y musculares. Dentro de los grupos más vulnerables se encuentran los niños, ancianos y pacientes con enfermedades crónicas, los cuales se encuentran con alto riesgo de desarrollar complicaciones severas conduciendo a altas tasas de mortalidad (Kwon *et al.*, 2010, Sokolov *et al.*, 2012, Buch *et al.*, 2009).

El virus de influenza pertenece a la familia Orthomixoviridae, se encuentra formado por segmentos de ARN de polaridad negativa. De acuerdo a sus proteínas centrales se clasifican en 3 tipos: A, B y C. De estos, se conoce al virus del tipo A como el más común y patógeno causante de distintas pandemias (Christman *et al.*, 2012).

### **7.4.2.2 Características del virus de influenza A**

El virus de influenza A se encuentra constituido por 8 segmentos separados de ARN de una sola cadena con polaridad negativa. Cada segmento se encuentra encapsulado independientemente por la nucleoproteína viral (NP) y asociado con un complejo polimerasa. El conjunto de estas 3 unidades forma lo que se conoce como ribonucleoproteína (RNP). Las partículas de RNP se localizan dentro de una cápsula de proteínas M1 recubiertas por la membrana viral lipídica (Figura 5). La membrana lipídica se deriva de la membrana plasmática de la célula infectada durante el proceso de ensamblado. En la superficie de esta se encuentran 3 proteínas: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y la proteína M2. La HA se trata de un trímero que consta de subunidades idénticas responsables de la unión al receptor y la fusión de las membranas. La NA es un tetrámero de subunidades idénticas que se encarga de eliminar la unión con el receptor para la liberación de los virus a través de la membrana de la célula infectada. La proteína M2 se encarga de formar un canal iónico en la

membrana necesario para la liberación de partículas RNP en el citoplasma. (Sokolov *et al.*, 2012, Nicholson, Webster y Hay, 2000)

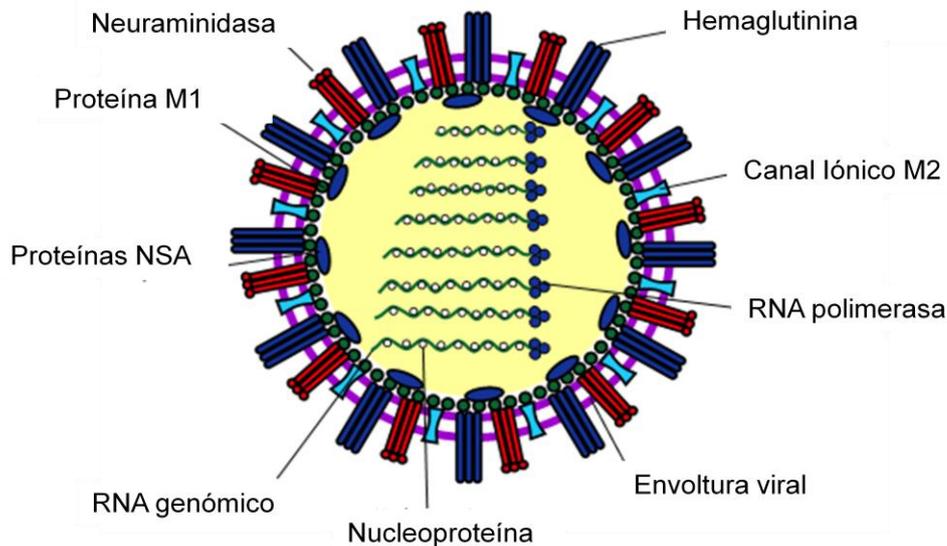


Figura 6. Estructura del virus de la influenza

#### 7.4.2.3 Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación inicia cuando la HA se une con los receptores celulares de ácido siálico. Después de la unión, el virus es llevado al interior por endocitosis (Figura 7a). La acidificación del endosoma conduce a la activación del canal de protones M2 resultando en la disociación de las RNPs y la cápside de proteínas M1 conduciendo su liberación en el citoplasma. El bajo pH dentro del endosoma también desencadena un cambio conformacional en la HA que provoca la fusión de las membranas virales y endosomales. Posteriormente señales de localización en las NPs dirigen el transporte de las RNPs hacia el interior del núcleo (Figura 7b). En el núcleo la polimerasa viral lleva a cabo síntesis de mRNA (Figura 7c). Las partículas virales de mRNA son transportadas al citoplasma para su traducción en proteínas virales. HA, M2 y NA son procesadas en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, posteriormente son transportadas a la membrana celular (Figura 7d). Además de la síntesis de mRNA, la polimerasa viral realiza la replicación de RNAs, transcribiéndose primero en cadenas positivas de cRNAs, que después funcionan como plantillas para la síntesis de RNAs que al mismo tiempo son

encapsulados por NPs (Figura 7e). La exportación de estas RNPs recién formadas llevado a cabo por el complejo M1-NS2 el cual encuentra enlazado a estas. Conforme llegan a la membrana celular, las RNPs se asocian con las glicoproteínas virales de la membrana plasmática de la cual saldrán los nuevos viriones (Figuras 7f). Finalmente la NA separa las uniones de ácido siálico de las glicoproteínas membranales celulares y virales, liberando así los viriones de la célula huésped (Vanderlinden y Naesens, 2013).

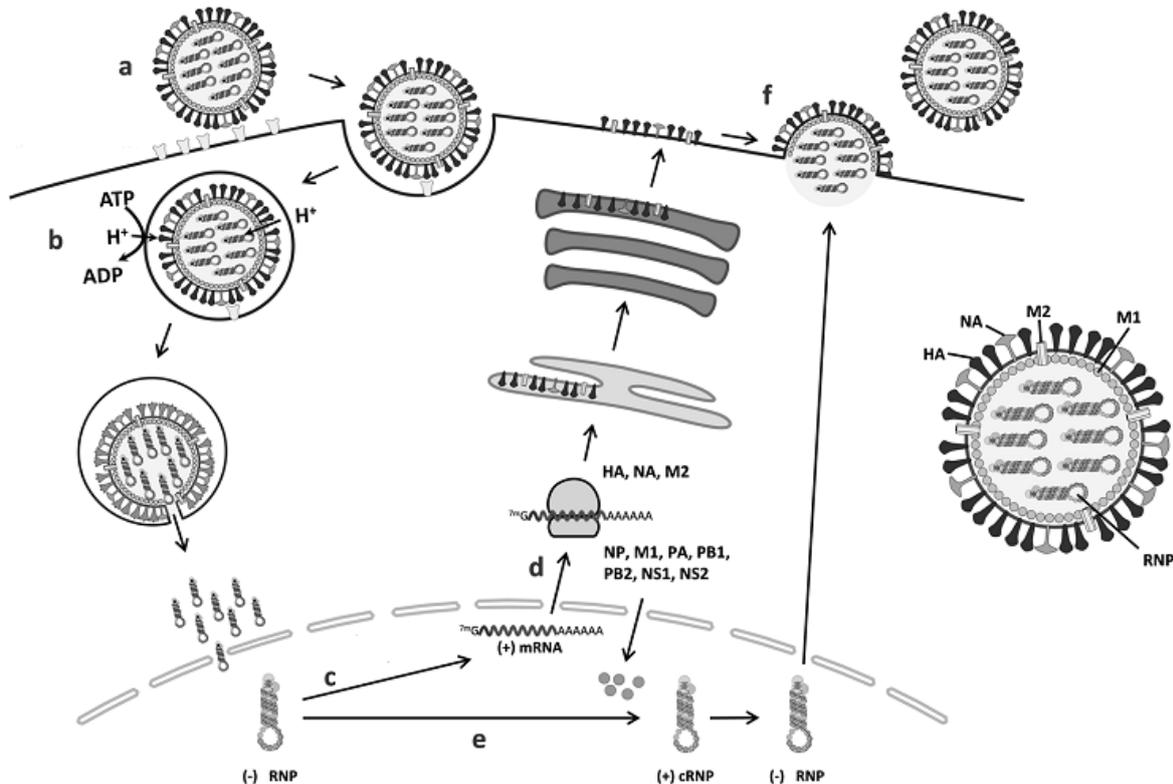


Figura 7. Ciclo de replicación del virus de influenza. HA: Hemaglutinina, NA: Neuraminidasa, M2: Canal iónico, M1: Proteína de matriz, RNP: Ribonucleoproteína.

#### 7.4.2.4 Variabilidad y evolución antigénica

La clasificación actual en subtipos se basa en las glucoproteínas de la superficie HA y NA. Hasta la fecha 16 subtipos de HA y 9 NA han sido descritos. Siendo las aves el reservorio principal de estos. Los principales subtipos de influenza A que han infectado humanos durante epidemias estacionales son H1N1, H2N2 y H3N2.

Para sobrevivir como un patógeno exitoso, el virus de influenza se basa en dos mecanismos evolutivos, mutación y recombinación del genoma, de esta

manera logra evadir los sistemas inmunes y adaptarse a nuevos huéspedes. Las mutaciones que causan pequeños cambios, a menudo son llamadas derivaciones genéticas. Mutaciones en posiciones críticas en la HA y NA pueden alterar las características antigénicas resultando en una derivación antigénica más conocida como “antigenic drift”.

La naturaleza segmentada del genoma viral de influenza permite el intercambio de segmentos (denominado recombinación) cuando virus distintos co-infectan a la misma célula huésped y generan una progenie con un genoma mixto. El reordenamiento puede implicar cualquiera de los ocho segmentos. Para el caso de las proteínas superficiales HA y NA este reordenamiento se conoce como “antigenic shift” (Das *et al.*, 2010, Liu, Liu y Yang, 2013, Christman *et al.*, 2012).

#### **7.4.2.5 Antivirales empleados contra el virus de la influenza**

##### *Bloqueadores del canal iónico M2*

La primera clase de antivirales desarrollados para el tratamiento de influenza fueron los adamantanos, que incluyen tanto la amantadina como rimantadina. Estos fármacos son bloqueadores del canal iónico M2 y se piensa que interfieren con el desdoblamiento viral dentro de la célula. Se ha limitado este tipo de fármacos para su uso clínico debido a la resistencia generalizada. Estos han perdido la actividad inhibitoria del canal M2 con el virus pandémico de influenza A H1N1 debido a una mutación en el aminoácido Ser31.

##### *Inhibidores de la Neuraminidasa*

En la actualidad el tipo predominante de antivirales usados para el tratamiento y la profilaxis de influenza son los inhibidores de la neuraminidasa (NAIs). Dentro de este grupo se encuentra el zanamivir y oseltamivir. Los NAIs interfieren con la liberación de nuevas partículas virales de influenza de las células infectadas previniendo así la infección de nuevas células. Aunque la mayoría de los virus de influenza A H1N1 aislados durante el 2009 son susceptibles a los NAIs, se registraron posteriormente virus con una mutación en H274Y que los hace resistentes a oseltamivir (Moss, 2010).

### 7.6 *Elytraria imbricata*

Hierba distribuida desde Arizona y Texas hasta las Antillas y el sur de Sudamérica; de hasta 50 cm de altura, con tallos a veces poco desarrollados, erectos, con los lados medio cuadrados, algunas veces con pelos. Hojas anchas en las puntas y muy delgadas en la base, de 3 a 13 cm de largo y 2 a 5 cm de ancho, con la punta muy bien marcada y los márgenes senefiados. Las hojas tienen pocos pelos, que se encuentran generalmente en los nervios principales. Las inflorescencias pueden ser desde una hasta muchas, o algunas veces se ramifican; de 5 a 28 cm de largo, tienen forma de espigas y crecen en las axilas de las hojas. Flores pequeñas, de 4 a 7 mm de largo, lila pálido a azul. Las flores no duran mucho en las plantas porque se caen con facilidad, además se secan muy rápido cuando el sol les da directamente (Toval y Rueda, 2009).



Figura 8. *Elytraria imbricata*

Cuadro 1. Ficha técnica taxonómica de *Elytraria imbricata*

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridaeplantae</i>
Infrakingdom	<i>Streptophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophytina</i>
Infraivisión	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden	<i>Asteranae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Acanthaceae</i>
Género	<i>Elytraria</i>
Especies	<i>Elytraria imbricata</i>

### 7.6.1 Usos reportados

Especie de uso común para curar la diarrea. En Michoacán, Nayarit y Yucatán con este propósito se prepara un cocimiento con toda la planta y se administra como té, en especial a los niños. Se le utiliza en el tratamiento de alteraciones del aparato excretor como dolor de riñones, mal de orín, cistitis, uretritis y para limpiar los riñones. De igual forma se le usa en afecciones del aparato reproductor como infecciones vaginales, hemorragia en el embarazo, cólicos menstruales y de parto. Uso en el dolor de vesícula, nervios, fiebre y afecciones gastrointestinales.

## 8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

### 8.1 Recolección y secado del material biológico

Se realizó la recolección de *Elytraria imbricata* en el municipio de Pujilic, Chiapas con las siguientes latitudes 16.34605, -92.40806 durante la primera semana del mes de agosto. Se cortaron partes aéreas y raíces de la planta, lavaron y congelaron a -8 °C. Se retiró la humedad por liofilización y se pulverizó el material almacenándose en un recipiente ámbar a temperatura ambiente.

### 8.2. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios

#### 8.2.1 Preparación de extractos

Para la detección cualitativa de los principales metabolitos secundarios se prepararon extractos utilizando raíz y partes aéreas de la planta. Se realizaron distintas extracciones con solventes que permiten la extracción de los principales constituyentes químicos. Siguiendo el esquema general que propone Wagner y Bladt (2003). Estos se almacenaron a 4 °C hasta su identificación por cromatografía en capa fina.

#### *Extracción de antraglucósidos y flavonoides*

Se calentó 1g de material biológico en polvo en un baño maría a 60 °C con 5 mL de metanol durante 10 minutos y se filtró utilizando papel Whatman No.1. Con el mismo procedimiento se realizó la extracción de antraglucósidos con la resina *Aloe barbadensis* que se utilizó como testigo de referencia.

#### *Extracción de alcaloides*

Se calentó 1g de material biológico en polvo en un baño maría a 60 °C con 1 mL de hidróxido de amonio al 10% (v/v) y 5 mL de metanol durante 10 minutos. Siguiendo la misma metodología se realizó la extracción de alcaloides empleando hojas *Nicotiana tabacum* que se utilizó como testigo de referencia.

### *Extracción de coumarinas y terpenos.*

Se calentó 1 g de material biológico bajo reflujo a 40 °C durante 15 minutos con 10 mL de diclorometano y se filtró utilizando papel Whatman No.1. Se llevó a sequedad y se disolvió en 0.5 mL de tolueno.

### *Extracción de saponinas*

Se siguió la misma metodología empleada para la extracción de antraglucósidos y el filtrado resultante se reconcentro a 1 mL. Se añadió 0.5 mL de agua destilada y se extrajo con 3mL de N-butanol saturado.

### **8.2.2 Identificación de metabolitos secundarios por CCF**

Se utilizó cromatografía en capa fina para la identificación de los principales metabolitos secundarios. Se realizó en placas de gel de sílice F<sub>254</sub> de 10x10cm utilizando distintas fases móviles propuestas por Wagner *et al.*, (2003), que permitieran la separación de los componentes de acuerdo a su polaridad. Las cromatografías se desarrollaron a temperatura ambiente en una cámara que se saturó durante 45 minutos con su respectivo sistema de solventes. Las placas de gel de sílice se dejaron secar y se revelaron rociando distintos reactivos que propician reacciones químicas y permiten la detección de sus componentes de una manera cualitativa. Además se calculó el factor de retardo (Rf) de los compuestos que es obtenido mediante la división entre el la distancia del compuesto y la distancia entre la línea del solvente y la de inicio (Deinstrop-Hahn, 2007).

### *Identificación de flavonoides*

Se colocó 40µL de los extractos y 20 µL de quercetina al 1% en metanol (p/v) como estándar en placas de gel de sílice desarrollándose en una cámara vertical empleando acetato de etilo ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26) como fase móvil. Se revelaron las placas utilizando una solución de 2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol (p/v) seguido de una solución de polietilenglicol-4000 al 5% en etanol. Se determinó la presencia de flavonoides observando la fluorescencia de los compuestos bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 325 nm.

#### *Identificación de antraglucósidos*

Se colocó 40µL de los extractos y estándar en placas de gel de sílice y se desarrollaron en una cámara vertical con un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10). Se aplicó una solución KOH al 10% en etanol sobre las placas (p/v). y se determinó la presencia los derivados de antraceno observando la coloración producida a simple vista.

#### *Identificación de alcaloides*

Se colocó 40 µL de los extractos y estándar en placas de gel de sílice desarrollándose en una cámara vertical con una fase móvil de tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10). Se empleó el reactivo de Dragendorff y se observó las placas para la determinación de alcaloides de acuerdo al cambio de coloración ocurrido a simple vista y bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

#### *Identificación de coumarinas*

Se colocó 40 µL de los extractos en placas de gel de sílice y se desarrollaron en una cámara vertical con el sistema de solventes compuesto por tolueno-etil acetato (93:7). Se observaron las placas bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 325 nm .

#### *Identificación de Terpenos*

Se colocó 40 µL de los extractos en placas de sílica gel y se resolviéndose en una cámara vertical con el mismo sistema de solventes que se empleó para la identificación de coumarinas. Se observaron las placas en longitud de onda visible y se utilizó el reactivo de vanillina-ácido sulfúrico, de acuerdo a la coloración obtenida se determinó la presencia de terpenos.

#### *Identificación de saponinas*

Se colocó 40 µL de los extractos y 20µL de diosgenina al 1% en metanol (p/v) como estándar en placas de gel de sílice y se desarrollaron en una cámara vertical utilizando una fase móvil compuesta por cloroformo-ácido acético glacial-metanol-agua (64:32:12:8). Se utilizó el reactivo vainillina-ácido sulfúrico

para revelar las placas. Se determinó la presencia de saponinas de acuerdo a la coloración producida.

Cuadro 2. Sistemas de solventes empleados para CCF

Sistema cromatográfico	Sistema de solventes	Metabolitos
1	Acetato de de etilo-Acido fórmico- Ácido acético glacial-Agua (100:11:11:26)	Flavonoides
2	Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10)	Antraglucósidos
3	Tolueno-Acetato de etilo- dietilamina. (70:20:10)	Alcaloides
4	Tolueno-Etil acetato (93:7).	Coumarinas y Terpenos
5	Cloroformo-Ácido acético glacial- Metanol-Agua (64:32:12:8).	Saponinas

### 8.3 Elaboración de extractos para las pruebas antibacteriales y antivirales

Se colocaron 15 gramos de muestra seca de partes aéreas en 150 mL de etanol y metanol respectivamente durante 48 horas en agitación constante. Se filtraron utilizando papel Whatman No.1. , se llevaron a sequedad en un rotavapor y se resuspendieron a las distintas concentraciones  $32.71 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $97.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente. Se almacenaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso (Oboh *et al.*, 2007).

### 8.4 Evaluación de la actividad antibacterial

Para la evaluación de la actividad antibacterial de los extractos se emplearon las siguientes cepas de bacterias Gram (+): *Staphylococcus epidermidis* (ITTG-8580), *Staphylococcus aureus* (ENCB-16883) y Gram (-): *Escherichia coli* (ITTG-1879) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) proporcionados por el cepario del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

#### **8.4.1 Ensayo antibacterial**

##### *Preparación de discos:*

Los discos se prepararon con papel filtro Whatman No.1 de 6 mm de diámetro esterilizados en cajas petri. Se impregnaron con 10  $\mu\text{L}$  de gentamicina ( $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como estándar y 40 $\mu\text{L}$  de distintas diluciones de los extractos (1:1,1:2,1:5,1:10). Estos fueron almacenados a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

##### *Preparación del Testigo McFarland:*

Se adicionó 0.5 mL de  $\text{BaCl}_2$  ( $0.048\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en 99.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0.18\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en agitación constante y se verificó. La densidad óptica de la suspensión a una longitud de onda de 625 nm. Se tomaron alícuotas de 6mL y se almacenaron a temperatura ambiente.

##### *Prueba de susceptibilidad mediante difusión en discos*

Se tomaron colonias previamente crecidas durante 18 horas en agar tripticasa de soya y se añadieron a una solución salina al 0.9% (v/v) hasta conseguir una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland. Con un hisopó estéril se inocularon cajas petri con agar Müeller-Hinton por triplicado y se dejaron secar durante 3 minutos. Se colocaron los discos preparados con el estándar y los extractos en la superficie inoculada. Se invirtieron las cajas, se incubaron a 37 °C durante 18 horas y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición (Wilkter *et al.*, 2006).

#### **8.5 Evaluación de la actividad antiviral**

Para evaluar la actividad antiviral de los extractos crudos de *Elytraria imbricata* se trabajó en el laboratorio de virología del Centro de Investigaciones “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán, ubicado en la ciudad de Mérida, Yucatán, y en el cual se proporcionó el virus de influenza A/Yucatán/2370/09 (H1N1) pmd09 que se utilizó en todos los ensayos de inhibición del efecto citopático, así como también el cultivo de la línea celular MDCK en la cual se propaga y aísla el virus manteniéndose a temperatura de -70°C para su conservación.

### **8.5.1 Mantenimiento y crecimiento celular**

Las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) se cultivaron en medio Eagle Modificado Dulbecco D-MEM adicionado con suero fetal bovino al 15% (v/v), 10 000 U·mL<sup>-1</sup> ampicilina, 10 000 µg·mL<sup>-1</sup> de estreptomicina y Hepes 25mM en placas con una capacidad de 2x10<sup>7</sup> células se incubaron a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez confluyente la monocapa se retiró el medio y se lavó con solución salina de fosfatos (PBS) dos veces. Se incubó con 4 mL de una solución tripsina-verseno al 0.005% (v/v) en PBS durante 6 minutos. Se retiró la solución y se adicionó medio DMEM con suero fetal bovino (SFB) al 10% y L-glutamina al 1% para su distribución en placas de 96 pozos a una densidad celular de 1x10<sup>5</sup>

### **8.5.2 Ensayo de hemoaglutinación**

En una placa de 96 pozos se adicionó 100 µL del virus y se realizó diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128). Se depositó 50µL de PBS en otra fila. Se añadió 50 µL de una solución de eritrocitos de pavo al 0.5% y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La última dilución que produjo hemoaglutinación completa de los virus se consideró como el título hemoaglutinante (Nicholson *et al.*, 2000).

### **8.5.3 Cuantificación de virus por ensayo en placa**

Se sembraron células MDCK en placas de 6 pozos con medio DMEM complementado con SFB al 10% y se incubaron a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr confluencia en la monocapa. Se lavaron las placas con PBS y se adicionó 200µL de diluciones seriadas del virus (1x10<sup>-1</sup> hasta 1x10<sup>-6</sup>), posteriormente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el inoculo y se adicionó medio overlay con agar oxoid al 3% (p/v) y tripsina TPCK (2.5 µg·mL<sup>-1</sup>) incubándose a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Se tiñó con cristal violeta al 4% en metanol (v/v) durante 30 minutos. Se lavaron con agua las placas y se dejaron secar para llevar a cabo el conteo de placas (Roth, 1995).

#### **8.5.4 Evaluación de la citotoxicidad**

Se cultivaron células MDCK en placas de 96 pozos células en medio DMEM durante 24 horas a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiró el medio lavándose con PBS y se añadió diluciones seriadas (100 µg/mL hasta 3.125 µg/mL) de cada extracto en medio DMEM incubándose durante 72 horas en las mismas condiciones.

Después del periodo de incubación se tiñeron las células con 50 µL cristal violeta al 0.4% en metanol durante 30 minutos. Se lavaron con agua y se dejaron secar. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm para determinar el porcentaje de viabilidad celular mediante la siguiente fórmula:

%Viabilidad =  $[(A/A_0) \times 100]$  donde:

A es la absorbancia de las células tratadas con extractos en distintas concentraciones y A<sub>0</sub> la absorbancia del control celular que equivale al 100% de células viables (Mbarek *et al.*, 2007).

#### **8.5.6 Ensayo de reducción del efecto citopático**

##### *Pre-tratamiento*

Se cultivaron células MDCK en placas de 96 pozos con medio DMEM complementado con SFB al 10% incubándose a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr confluencia en la monocapa. Se lavaron las células con PBS y se adicionó 100 µL de los extractos a distintas concentraciones (50 hasta 1.56 µg/mL) por cuadruplicado con un tiempo de incubación de 24 horas. Se lavaron las células nuevamente y se infectaron con el virus a una MOI de 0.01 incubándose durante 1 hora a 37 °C. Se removió el inóculo viral y las células se incubaron con medio DMEM adicionado con tripsina TPCK (2.5 µg/mL) por 72 horas a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

##### *Cotratamiento*

Se cultivaron células MDCK en placas de 96 pozos con medio DMEM complementado con SBF al 10% incubándose a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr confluencia en la monocapa. Se realizó diluciones seriadas de distintas concentraciones de los extractos (50 hasta 1.56 µg/mL) y se incubaron con el inóculo viral durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las

células con PBS y se infectaron con las soluciones preparadas anteriormente incubándose a 37 °C durante 1 hora por cuadruplicado. Se lavaron las células nuevamente y se añadieron 100 µL de medio DMEM adicionado con tripsina TPCK (2.5 µg/mL) y 0.21% de albumina de suero bovino (v/v) por 72 horas a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Postratamiento*

Se cultivaron células MDCK en placas de 96 pozos con medio DMEM complementado con SBF al 10% incubándose a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr confluencia en la monocapa. Se lavaron las células con PBS y se infectaron con el virus a una MOI de 0.01 incubándose durante 1 hora a 37 °C. Se removió el inóculo viral y se adicionaron 100 µL de distintas concentraciones de los extractos (50 hasta 1.56 µg/mL) por cuadruplicado en medio DMEM adicionado con tripsina TPCK (2.5 µg/mL) y 0.21% de albumina de suero bovino (v/v) por 72 horas a 37 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de las 72 horas de incubación de cada uno de los ensayos antivirales. Se removió el medio y se reemplazó con 50 µL cristal violeta al 0.4% en metanol incubándose durante 30 minutos. Las placas se lavaron con agua y se dejaron secar para medir la absorbencia a una longitud de onda de 490 nm y calcular el porcentaje de inhibición viral de acuerdo a la siguiente formula:

$$[(A-B)/(C-B)] \times 100$$

Donde A es la absorbancia de las células infectadas tratadas con los extractos, B es la absorbancia del control viral y C es la absorbancia del control celular (Kwon *et al.*, 2010, He, Han y Wang, 2011, Silva *et al.*, 2006, Ketabchi *et al.*, 2011, Sood *et al.*, 2012).

#### **8.6 Análisis estadístico**

Los datos estadísticos generados se evaluaron estadísticamente con el software SigmaPlot 12.3.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 9.1 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios

#### 9.1.1 Detección de flavonoides

La figura 9 muestra la cromatografía en capa fina realizada para identificar flavonoides. Al observar las placas cromatográficas resueltas con el sistema 1 se pueden observar 5 bandas de coloración verde para las partes aéreas y 5 de la misma coloración para la raíz. Los Rf para cada uno de los compuestos se pueden observar en cuadro 3. El sistema eluyó la naringenina con un Rf de 0.99 por lo que se puede deducir que la mayoría de los compuestos extraídos son de una naturaleza de mayor polaridad al testigo. Esto se debe a que la fase estacionaria (silica) incrementa su afinidad conforme incrementa la polaridad de los compuestos, de esta manera son retenidos por más tiempo, haciendo que recorran menor distancia.

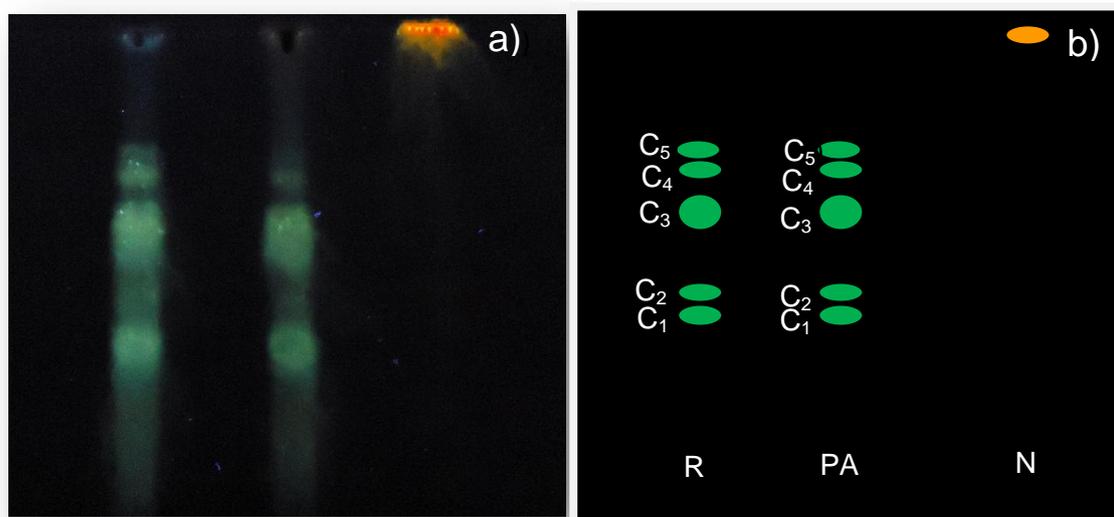


Figura 9. a) Placa cromatográfica de flavonoides revelada con NP, bajo luz UV 364 nm. PA: partes aéreas, R: raíz, N: naringenina. b) Representación esquemática de la ubicación de los compuestos

En la misma figura se puede observar que la separación de los extractos y la elución de los distintos compuestos. La separación de los flavonoides presentes en el extracto fue buena ya que se lograron visualizar bandas bien definidas, con la excepción de una serie de bandas que corresponde al Rf 0.56 posiblemente debido a una serie de flavonoides con estructura y grupos

funcionales bastantes similares. En general la polaridad de la fase móvil fue correcta, logrando solubilizar y arrastrar las muestras. El uso de metanol como solvente para la extracción fue bastante apto posiblemente porque la mayoría de los flavonoides se encuentran glucosilados en la naturaleza (Cseke *et al.*, 2006). La presencia de las manchas color verde forman parte de la fluorescencia característica de flavonoides indicando un resultado positivo que ocurre debido a que la estructura básica consta de dos anillos bencénicos, siendo un excelente cromóforo activado por la luz ultravioleta (Andersen y Markhan, 2006).

Cuadro 3. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de flavonoides

Partes de la planta	Compuestos	Valores de Rf
Partes aéreas	C <sub>1</sub>	0.33
	C <sub>2</sub>	0.42
	C <sub>3</sub>	0.56
	C <sub>4</sub>	0.68
	C <sub>5</sub>	0.73
Raíz	C <sub>1</sub>	0.33
	C <sub>2</sub>	0.42
	C <sub>3</sub>	0.56
	C <sub>4</sub>	0.68
	C <sub>5</sub>	0.73

La fluorescencia intensa de los flavonoides se presenta de acuerdo a su tipo de estructura. Cuando se observan a un longitud de onda de 365 nm presentan fluorescencia amarilla oscura, verde o azul, siendo cambiada e intensificada por distintos reactivos. El reactivo natural products (NP) se compone por una serie de dos reactivos, el primero se trata de una solución del éster 2-aminoetil difenil bórico al 1% (Reactivo de Neu) (Figura 10). Este reacciona formando complejos que intensifican su fluorescencia, el segundo reactivo es una solución de PEG-4000 que disminuye el límite de detección de 10mg (límite promedio de detección de la CCF) a 2.5mg (Andersen *et al.*, 2006, Jork *et al.*, 1990).

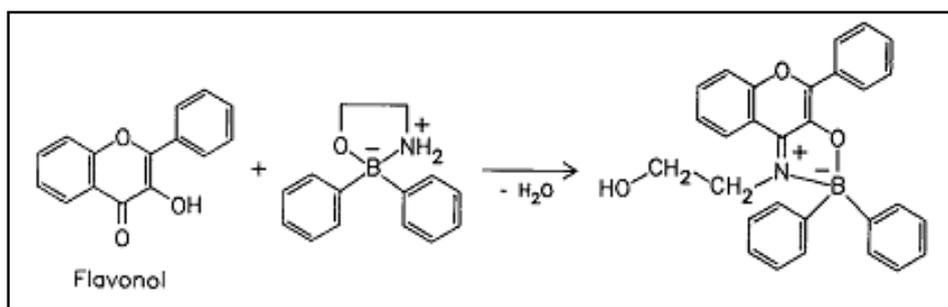


Figura 10. Formación de complejo. La reacción propuesta por Jork *et al.*, (1990) ilustra la reacción entre un flavonol y el reactivo de Neu (éster 2-aminoetil difenil bórico) que da a lugar a la formación de un complejo, que aumenta el espectro de absorción de luz UV

### 9.1.2 Detección de antraglucósidos

La detección de antraglucósidos, se llevó a cabo mediante CCF empleando el sistema 2. El uso de una solución metanólica de KOH al 1% permitió la identificación de antraquinonas y antronas debido a la coloración rojo-violeta y amarillo intenso que presentan respectivamente (Wagner *et al.*, 2003). Esta reacción conocida como “reacción de Bornträger” provoca un cambio de coloración de amarillo-naranja a rojo-purpura debido a la ionización del grupo OH, provocando un efecto resonante mayor que resulta en un cambio de absorción a una mayor longitud de onda. Las antronas por su parte presentan una coloración amarilla intensa, que para el caso de sus derivados el color se torna casi inmediatamente a café-rojo o azul-purpura. (Jakobsen y Chrisensen, 2008, Bruneton, 2008, Van den Berg, 1989, Rahman, 2002)

En la figura 11 se puede observar la presencia de bandas para las partes aéreas y bandas para la raíz de coloración amarilla indicando la presencia de antronas en ambas partes de la planta, mismas que posteriormente se tornaron color café debido a una reacción de oxidación. (Rahman, 2002). En la misma figura se pueden observar una de serie de antraquinonas de *Aloe barbadensis* (Wagner y Bladt, 2003) empleado como testigo positivo. Los Rf de de estos y demás compuestos eluidos son mostrados en el cuadro 4.

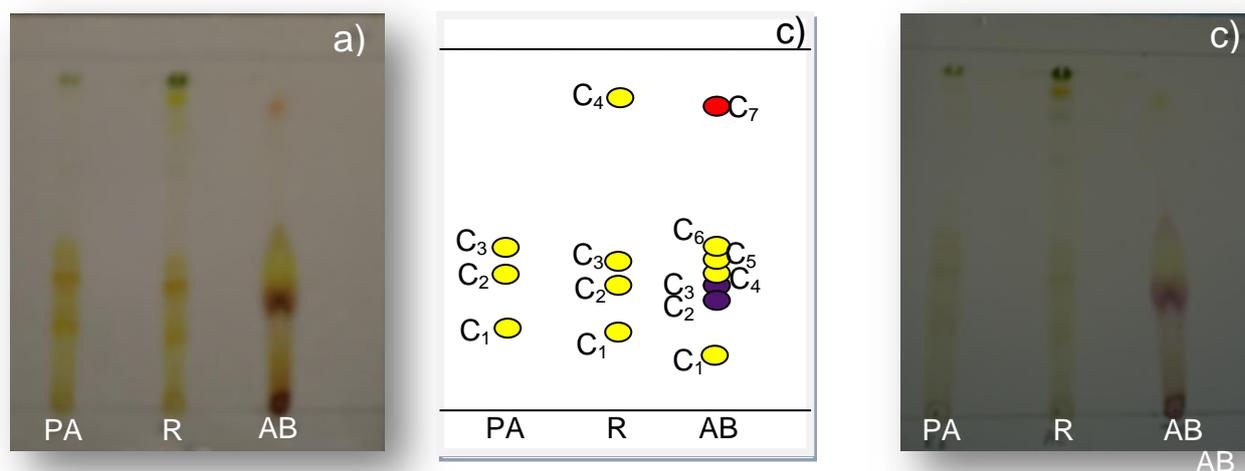


Figura 11. a) Placa cromatográfica de antraglucósidos, b) Representación esquemática de los compuestos, c) Placa cromatográfica de antraglucósidos con posibles compuestos oxidados. PA: Partes aéreas, R: Raíz, AB: *Aloe barbadensis*.

**Cuadro 4. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de antraglucósidos**

Extracto	Compuesto	Rf
Partes aéreas	C <sub>1</sub>	0.24
	C <sub>2</sub>	0.39
	C <sub>3</sub>	0.45
Raíz	C <sub>1</sub>	0.22
	C <sub>2</sub>	0.37
	C <sub>3</sub>	0.43
	C <sub>4</sub>	0.90
<i>Aloe barbadensis</i>	C <sub>1</sub>	0.14
	C <sub>2</sub>	0.32
	C <sub>3</sub>	0.35
	C <sub>4</sub>	0.40
	C <sub>5</sub>	0.44
	C <sub>6</sub>	0.49
	C <sub>7</sub>	0.89

Las antraquinonas, antronas, antranoles y diantronas son derivados del compuesto aromático tricíclico antraceno. Las antraquinonas y antronas difieren en el grado de oxidación de su estructura básica mientras que los antranoles son formas tautoméricas de antronas (Figura 12). Los sustituyentes más comunes son grupos hidroxilo, metoxilo, metil y carbonil. La mayor parte de los compuestos pertenecientes a este grupo se encuentran en las plantas como O-glucosidos (Jakobsen y Christensen, 2008). Con lo anterior y lo resultados en la CCF se comprobó que el solvente empleado durante la extracción, cumplió su función extrayendo antraglucosidos. Las distintas coloraciones presentadas en el extracto de *Aloe barbadensis* nos confirman que la extracción de este tipo compuestos debido a ese característico cambio de color que presentan con la adición de KOH al 1%.

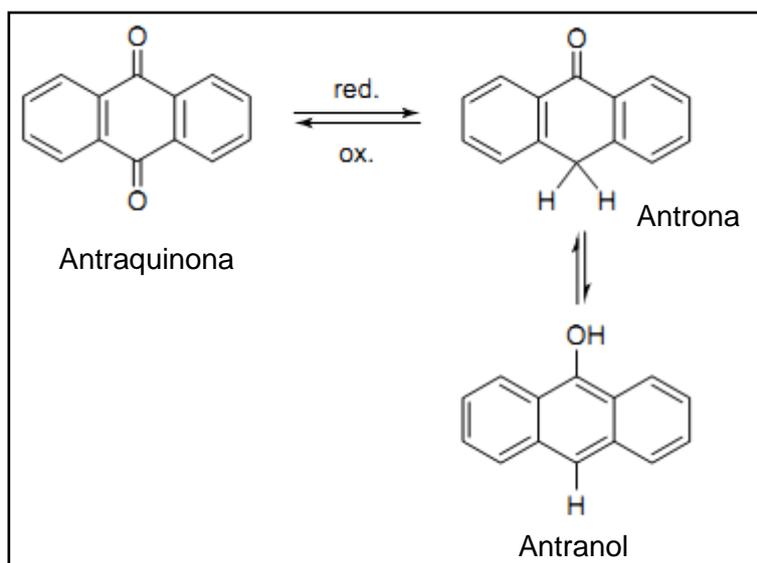


Figura 12. Estructura química de antraquinonas, antronas, y antranoles

De acuerdo a los valores obtenidos de R<sub>f</sub> se determinó que la fase del sistema empleado fue útil para resolver los compuestos presentes en el extracto. De acuerdo al cambio de color que ocurrió tiempo después en el cromatofolio se sugiere la presencia de antronas en las partes aéreas y raíz, mismo que pudiera ser explicado con el proceso de oxidación que Rahman, (2002) reporta. Sin embargo la realización de un extracto crudo metanólico pudo provocar que otros compuestos con polaridad similar afectarán la visualización de bandas bien definidas.

### 9.1.3 Detección de Alcaloides

La realización de un extracto a un pH alcalino, que se logró con la adición de hidróxido de amonio se empleó debido a que la mayoría de los alcaloides son alcalinos (Cseke *et al.*, 2006, Harbone, 1998) esto permitió abarcar la mayor cantidad de posibles alcaloides en las distintas partes de la planta.

La identificación de alcaloides por CCF se llevó a cabo utilizando el sistema de solventes 3. La (Figura 13) muestra la cromatografía en la cual la mancha café oscuro indica la presencia un alcaloide en la raíz de la planta, mientras que la nicotina del extracto proveniente de las hojas de tabaco se visualiza como una mancha color naranja con un Rf de 0.66 (figura 14) (Houghton, 2008). Para la detección de la nicotina se empleó únicamente el reactivo de Dragendorff, con el cual la coloración se desvanece rápidamente (Wagner y Bladt, 2003). El compuesto de la raíz no se alcanzó a visualizar completamente, por ello se empleó nitrito de sodio al 10% provocando la intensificación de su color (Houghton, 2008). Las coloraciones características presentes en la CCF se deben a la combinación de alcaloides con metales y metaloides, en este caso el ioduro de potasio y el nitrato de bismuto presentes en el reactivo de Dragendorff (Bruneton, 2008). El valor en el cual eluyó el compuesto presente en la raíz fue de 0.24.

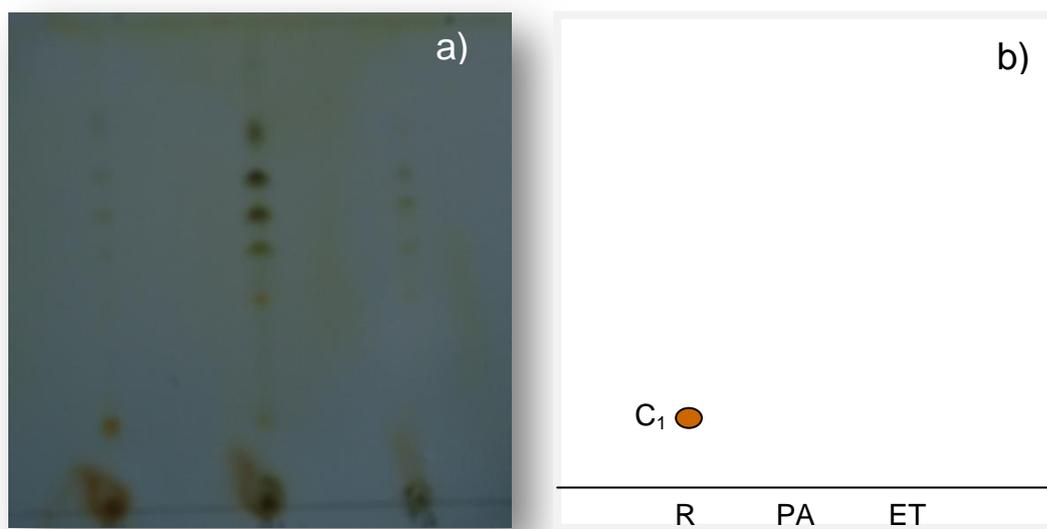


Figura 13. a) Placa cromatográfica de alcaloides, b) Representación esquemática de los compuestos, R: Raíz , PA: Partes aéreas, ET: Extracto de *Nicotiana tabacum*

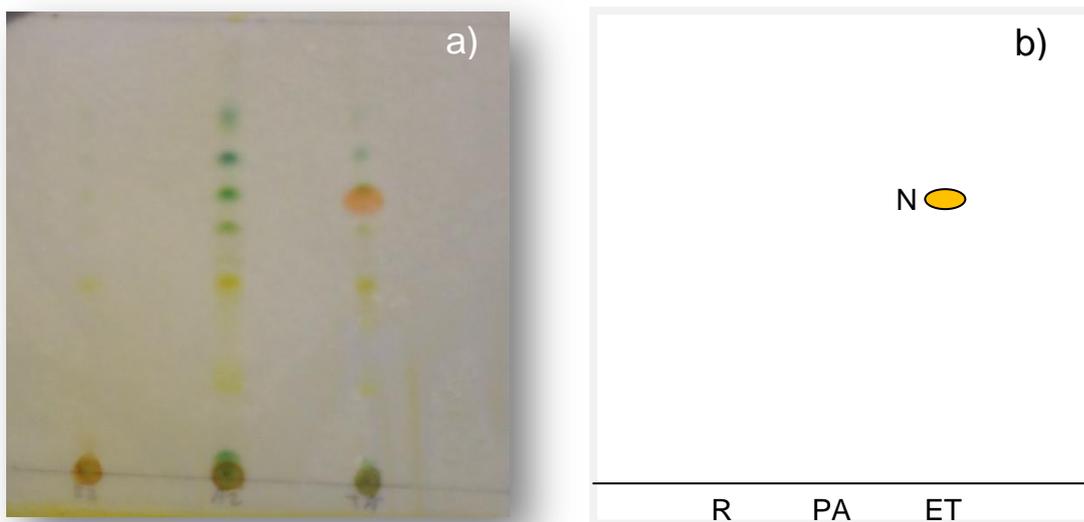


Figura 14 a) Placa cromatográfica de alcaloides al momento de aplicación de Dragendorff, b) Representación esquemática de la aparición de nicotina en la placa, R: Raíz, PA: Partes aéreas, ET: Extracto de *Nicotiana tabacum*, N: Nicotina

Además del uso del reactivo de Dragendorff para revelar los compuestos, se realizó otra CCF bajo las mismas condiciones antes mencionadas visualizándose a una longitud de onda de 264 nm, donde los alcaloides indólicos, quinólinicos, isoquinólinicos y purínicos absorben este tipo de radiación (Wagner y Bladt, 2003). En esta CCF (Figura 15) se observan dos manchas oscuras que presentan los mismos Rf que los anteriormente reportados, esto sugiere que se tratan de los mismos compuestos, presentando así dos características propias de los alcaloides.

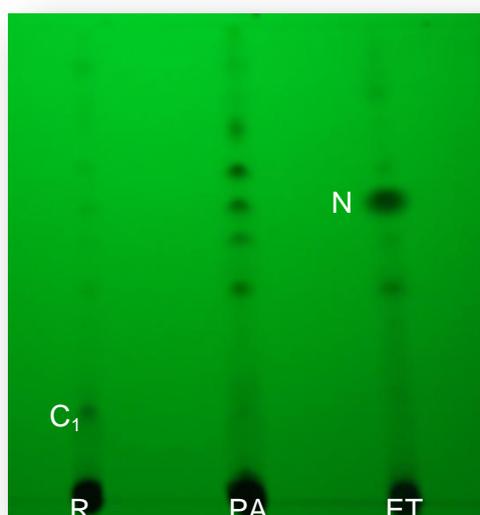


Figura 15. Placa cromatográfica de alcaloides bajo luz UV de 264 nm. R: Raíz, PA: Partes aéreas, ET: Extracto de *Nicotiana tabacum*., C<sub>1</sub>: Compuesto 1, N: Nicotina.

#### 9.1.4 Detección de coumarinas

El cromatofolio empleado para detectar coumarinas llevó como fase móvil el sistema de solventes 4. En este (Figura 16) se observa una banda de fluorescencia azul y 4 bandas de la misma fluorescencia en el extracto de partes aéreas y raíz respectivamente. Esta fluorescencia característica se debe a una benzopirona en su estructura que les permite absorber la luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm (Wagner y Bladt, 2003, Walksmunzka-Hajnos y Hawryl, 2008). De acuerdo con estos resultados resulta positiva la presencia de coumarinas en ambas partes de la planta, siendo la raíz la parte que posee mayor cantidad de este tipo de compuestos. Los Rf de los distintos compuestos son mostrados en cuadro 5.

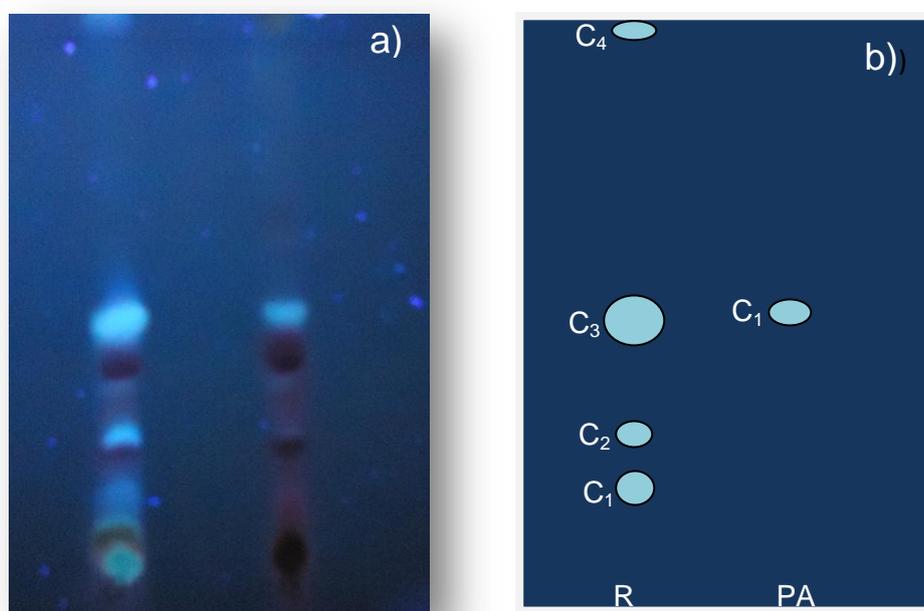


Figura 16 a) Placa cromatográfica de coumarinas bajo luz UV de 364 nm. b) Representación esquemática de los compuestos. R: Raíz, PA: Partes aéreas.

Las coumarinas existen en la naturaleza como moléculas libres y glucósidos, estos últimos se convierten en agliconas a través de reacciones enzimáticas a la hora del secado (Walksmunzka-Hajnos y Hawryl, 2008). Por ello el proceso de extracción con diclorometano garantiza la obtención de la mayoría de los compuestos. Debido a que la mayoría son solubles en solventes no polares y de polaridad media. El empleo de una fase móvil de tolueno- etil acetato cuya naturaleza es poco polar permitió la separación de los compuestos,

arrastrándolos lo suficiente para llevar a cabo su identificación a partir de un extracto crudo.

Cuadro 5. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de coumarinas

Parte de la planta	Compuesto	Rf
Raíz	C <sub>1</sub>	.12
	C <sub>2</sub>	.22
	C <sub>3</sub>	.42
	C <sub>3</sub>	.98
Partes aéreas	C <sub>1</sub>	.43

### 9.1.5 Detección de terpenos

Para la detección de terpenos, fue necesaria una extracción con un solvente que permitiera la obtención de los compuestos de acuerdo a sus características estructurales. De acuerdo con la bibliografía los monoterpenos y sesquiterpenos generalmente se extraen con pentano, hexano, dietileter, cloroformo o diclorometano. Los diterpenos son compuestos con características fisicoquímicas y cromatográficas distintas, pero son de polaridad media o poco polares. Los triterpenos simples y agliconas se pueden extraer efectivamente con el uso de solventes no polares (Koch, Basar y Richter, 2008, Hajnos, 2008). La utilización diclorometano permitió entonces abarcar la mayor cantidad de terpenos en su extracción. Así mismo se logró la separación de los compuestos debido a la naturaleza poco polar de la fase móvil que permitió solubilizarlos, arrastrarlos y separarlos para su identificación en los extractos crudos de partes aéreas y raíz con la aplicación del reactivo vainillina-ácido sulfúrico. Reactivo como este que contiene un aldehído aromático como la vainillina que en presencia de ácidos inorgánicos fuertes como el ácido sulfúrico producen una coloración en distintas tonalidades que van desde el azul- violeta hasta el rojo-café (Oleszel, Kapusta y Stochmal, 2008, Wagner y Bladt, 2003).

En la CCF realizada para la identificación de terpenos (Figura 17) se observan 2 bandas de color azul en el extracto de las raíces y dos bandas del mismo

color en las partes aéreas indicando la presencia de compuestos terpénicos en toda la planta. Así mismo se puede deducir por los valores en los Rf (Cuadro 6) que se trata de compuestos con estructuras similares debido a que eluyen con valores muy parecidos. A pesar que la detección de terpenos fue positiva, y la presencia de compuestos poco polares es evidente no fue posible una determinación más específica entre monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos o triterpenos, debido a que la reacción del reactivo no se entiende con precisión y es poco específica (Oleszel *et al.*, 2008).

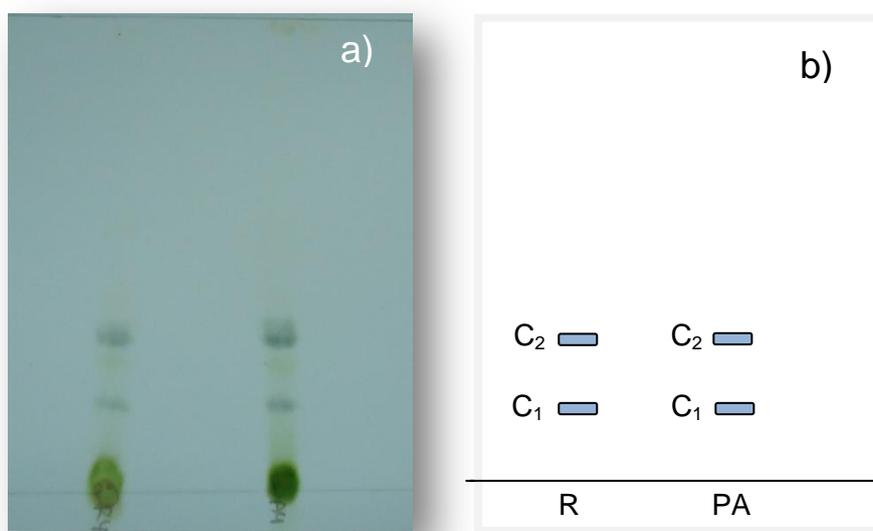


Figura 17 a) Placa cromatográfica de terpenos revelada con el reactivo de vainillina-ácido sulfúrico. b) Representación esquemática de los compuestos. R: Raíz, PA: Partes aéreas

Cuadro 6. Rf de los compuestos en la placa cromatográfica de terpenos

Partes de la planta	Compuestos	Valores Rf
Partes aéreas	C1	0.17
	C2	0.31
Raíz	C2	0.17
	C3	0.31

### 9.1.6 Detección de saponinas

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en especies de plantas, existiendo naturalmente como glucósidos. Su estructura consiste en una aglicona que puede ser clasificada como un grupo triterpénico o esteroidal unido

a una cadena de azúcares (Oleszel *et al*, 2008). Debido a esta característica se realizó una extracción con metanol que permitió la obtención de compuestos polares, entre ellos las saponinas. La segunda extracción con agua y butanol permitió un cierto grado de purificación del extracto ya que los compuestos altamente polares permanecieron en el agua (Wagner y Bladt, 2003).

En la CCF realizada con el sistema 5 (Figura 18) se observa la presencia de 4 bandas de color azul-violeta y 1 banda amarillo-café para la raíz y las partes aéreas. El testigo empleado, diosgenina presentó una coloración amarillo-café característica de las saponinas. Las coloraciones obtenidas en las bandas con la aplicación del reactivo vainillina-ácido sulfúrico indican la presencia de saponinas en el extracto crudo de ambas partes, cuya absorción de luz de máxima varía entre 510 y 620 nm, produciendo distintas tonalidades que van desde azul, azul-violeta, rojo o amarillo-café (Wagner y Bladt, 2003, Wagner y Bladt, 2003). Para esta detección se utilizó el Rf, que se calcula dividiendo la distancia recorrida por el compuesto sobre la distancia recorrida de de la sustancia testigo (Deinstrop-Hahn, 2007), esto debido a que el frente del solvente presenta muchos problemas y la mezcla resultaba en frentes desiguales.

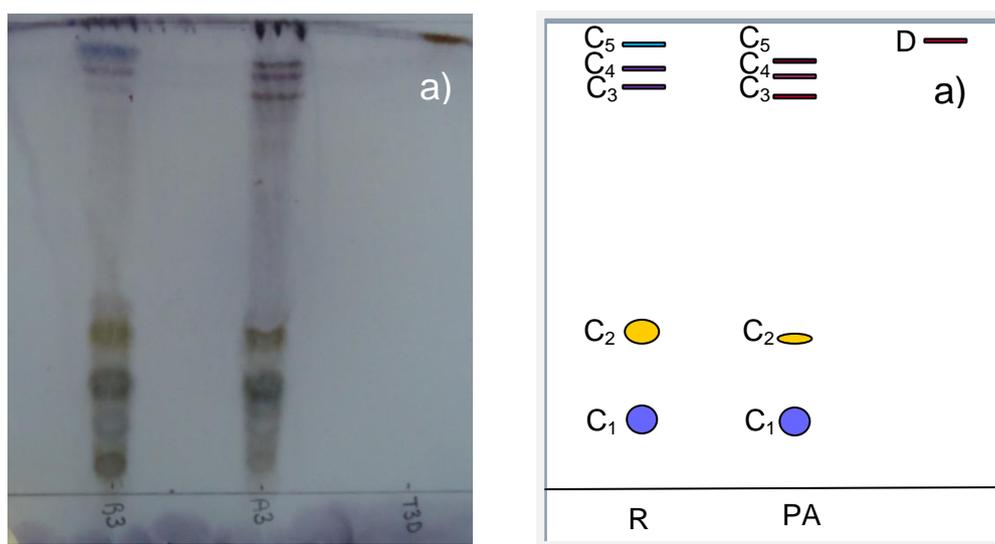


Figura 18 a) Placa cromatográfica de saponinas revelada con el reactivo de vainillina-ácido sulfúrico. b) Representación esquemática de los compuestos. R: Raíz, PA: Partes aéreas.

## 9.2 Evaluación de la actividad antibacterial

Muchas plantas han sido utilizadas para tratar o prevenir enfermedades diarreicas. La evaluación de los extractos provenientes de estas plantas es relativamente sencillo. La detección de la actividad antibacterial se lleva a cabo utilizando ensayos convencionales que se usan para la evaluación de antibióticos que detectan la inhibición del crecimiento bacteriano en un medio líquido o sólido (Eloff y McGaw 2006). Sin embargo, la evaluación antibacterial que se reporta de productos naturales entre los cuales se incluyen flavonoides pueden tener discrepancias que quizá puedan ser atribuidas a diferentes ensayos en los que se realizan. Es necesario la estandarización de diversos factores que permitan evitar la malinterpretación de resultados y resulten en falsos positivos (Cushie y Lamb, 2005). Por ello la selección del método de difusión en discos utilizando la metodología de la NCCLS que describe la estandarización de diversos factores como tamaño del inóculo, tamaño de discos, pH, cantidad y tipo de agar, logró la realización de un ensayo confiable y reproducible para la evaluación antibacterial realizada.

En este ensayo se evaluó la actividad antibacterial de los extractos crudos metanólicos y etanólicos de las partes aéreas de la planta contra cepas patógenas de distintas clases que permitió ver su actividad contra dos bacterias Gram (+), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis*, y dos bacterias Gram (-), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. La selección única de estos dos tipos de solventes (metanólico y etanólico) se realizó debido a que el método de difusión no es apropiado para el análisis de muestras no polares o aquellas que no se difundan fácilmente en el agar, (Cos *et al.*, 2006) limitándose únicamente a la evaluación de estos dos. Sin embargo la extracción con estos dos solventes se abarca una gran cantidad de metabolitos, con excepción de aquellos que tienen una polaridad muy baja (Tiwari *et al.*, 2011). La selección de las cepas se llevó a cabo debido a que el uso tradicional reporta actividad contra una serie de enfermedades infecciosas. Sin embargo ninguno de los extractos presentó halos de inhibición en la prueba de difusión en discos por lo que resulta negativa su actividad contra las distintas clases de bacterias mencionadas anteriormente. La gentamicina, testigo utilizado en la prueba mostró los siguientes halos de inhibición:

Cuadro 7. Halos de inhibición de las bacterias evaluadas contra Gentamicina ( $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Bacteria	Halo de inhibición (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ENCB-16883)	16.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ITTG-8580)	18.5
<i>Escherichia coli</i> (ITTG-1879)	15.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-27853)	17.4

El uso de gentamicina como testigo positivo durante la prueba se debe a su capacidad de inhibición de bacterias Gram (+) y Gram (-). Este es un antibiótico que pertenece a la clase de las aminoglucósidos cuyo mecanismo se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas a nivel ribosomal, uniéndose a la subunidad ribosomal 30S (Coyle, 2005). Los rangos de zonas de inhibición corresponden con mínimas desviaciones a los que reporta la CLSI, de esta manera se deduce que a pesar de que la mayoría de las cepas no son de colección presentan valores que se encuentran dentro del rango de susceptibilidad reportado. La similitud de los rangos de halos de inhibición, permite verificar la actividad antibacteriana de este y más compuestos, ya que un desbalance de cationes, pH, entre otros factores, resultaría en un halo de inhibición menor (Wiklter, *et al.*, 2006), que también se verificó con mediciones de pH de acuerdo a las recomendaciones de la metodología utilizada. Otro factor importante durante la realización de la técnica de difusión de discos fue la estandarización del inóculo. Los resultados obtenidos de la absorbancia del testigo de McFarland resultaron de  $0.92 \pm 0.08$ . Estos valores encontrados dentro del rango establecido asegurarán que la suspensión directa de colonias para la estandarización del inóculo, seleccionadas del agar tripticosa tuvieran valores de  $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , adecuados para cada una de las cepas y la evaluación de la actividad antibacteriana (Andrew, 2003).

### 9.3 Evaluación de la actividad antiviral

Las células epiteliales de mamífero proveen el sistema celular de cultivo mas sensible para la propagación *in vitro* de influenza humana A descritas a la fecha. La línea de cultivo mas común y que generalmente se usa para el diagnóstico de influenza son las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), línea celular polarizada continua que contiene los receptores de ácido siálico y galactosa unidos por un enlace  $\alpha$ -(2,3) y  $\alpha$ -(2,6) en su superficie celular (Nicholson *et al.*, 2000).

#### 9.3.1 Ensayo de hemoaglutinación

El ensayo de hemoaglutinación se llevó a cabo para la determinación del título del virus, es una medida indirecta de determinar el título del virus mediante unidades hemoaglutinantes. Ocurre cuando los virus de influenza aglutinan eritrocitos de diversas especies de aves o mamíferos uniéndose al ácido siálico en la superficie de estas células (Nicholson *et al.*, 2000). En esta prueba el virus de influenza empleado mostró el título de 1:16. Demostrando capacidad hemoaglutinante y suficiente título para la realización de los ensayos siguientes.

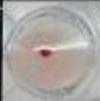
Dilución:	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Control								
Título								

Figura 18. Ensayo de hemoaglutinación En la segunda fila se puede observar el control. En la tercera el título del virus 1:16. En esta figura se puede observar como los eritrocitos que no se unen al virus, caen al fondo de los pozos y forman botones. Mientras que los eritrocitos que se unen al virus forman un entramado o hemoaglutinación que cubre el pozo

### **9.3.2 Cuantificación de virus por ensayo en placa**

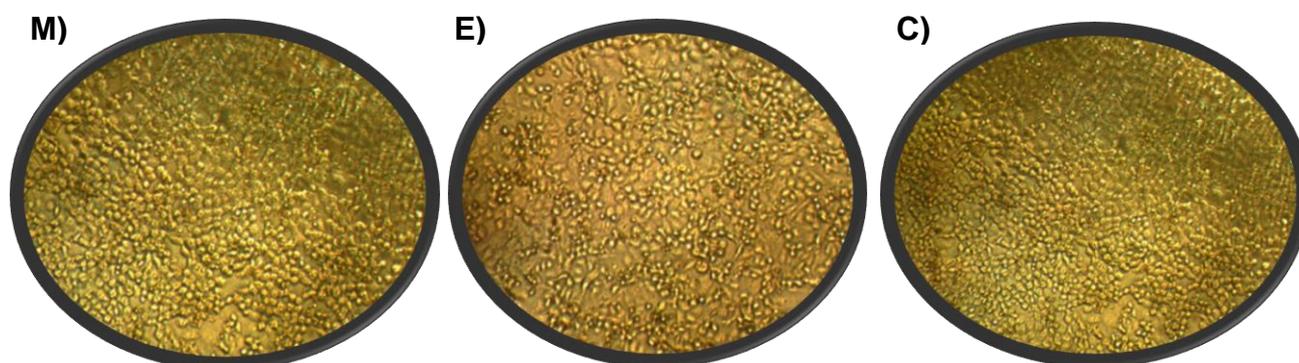
Este ensayo permitió la cuantificación del número de viriones infecciosos en una suspecion de virus. El principio de esta prueba es infectar células con diluciones de virus y después cultivarlas en agar de tal manera que la progenie de virus sea transmitida solo de la célula infectada hacia sus vecinos inmediatos. El agar previene la difusión del medio hacia otras regiones de la monocapa. Después de varias rondas de infección, el virus se extiende para producir un área localizada de células muertas que se refieren como placas, dentro de la monocapa celular (Roth, 1995). El número de placas determinado fue de  $3.85 \times 10^7$  UFP·mL<sup>-1</sup>, con esto se calculó una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001, que se usó en los siguientes ensayos.

### **9.3.3 Evaluación de la citotoxicidad**

La citotoxicidad es definida como la interferencia de un compuesto químico con estructuras y/o funciones esenciales para la supervivencia y reproducción de casi cualquier célula (Zapór, 2004).

La evaluación de la citotoxicidad llevada a cabo en la línea celular MDCK, células huésped del virus de influenza en los ensayos antivirales, permitió determinar valores a los cuales los extractos de las partes aéreas no son citotóxicos. De esta manera se garantiza que la actividad antiviral pueda ser evaluada a través de los efectos producidos por los virus con la selección apropiada de distintas concentraciones de los extractos. La realización del ensayo comenzó con una concentración inicial de 100 µg·mL<sup>-1</sup>, de acuerdo con lo que recomienda Cos *et al.*, (2006). Sin embargo los resultados obtenidos partiendo de esta concentración inicial no mostraron citotoxicidad en las células obteniendo valores de porcentajes de viabilidad celular prácticamente iguales a los controles celulares.

Debido a que los valores de viabilidad celular no se ven afectados por ninguno de los extractos, no fue posible determinar la concentración citotóxica media (CC50) y se decidió usar la misma concentración inicial para los ensayos antivirales puesto no poseen citotoxicidad a esa concentración.



En la figura 19 se muestra a las células MDCK observadas al microscopio después del ensayo de citotoxicidad, para el extracto metanólico y etanólico respectivamente evaluadas a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En esta no se aprecian cambios morfológicos significativos con respecto al control celular, presentando la monocapa celular completa. M: Extracto metanólico, E: extracto etanólico, C: control

#### 9.4 Ensayo de reducción del efecto citopático

Las plantas medicinales tienen una variedad de componentes químicos, que tienen la capacidad de inhibir el ciclo de replicación de diversos tipos de virus de ADN o ARN. Se ha reportado que muchas plantas empleadas en la medicina tradicional tienen un fuerte efecto sobre la actividad antiviral y algunas de ellas han sido utilizadas para tratar animales y personas que sufren de infecciones virales (Chattopadhyay, 2006).

Los métodos comúnmente usados para la evaluación inactiviral *in vitro* se basan en diferentes habilidades de los virus para replicarse en células cultivadas. Algunos causan efectos citopáticos o forman placas. Otros son capaces de producir funciones especializadas o transformaciones celulares (Cos *et al.*, 2006).

Los efectos citopáticos se describen como una serie de cambios morfológicos en las células causados por una infección viral que varía con el tipo de virus, células huésped, MOI y otros factores (Suchman y Blair, 2007). La evaluación

antiviral mediante el ensayo de reducción del efecto citopático permitió la determinación de la inhibición de la citotoxicidad inducida por el virus en las células MDCK. En este ensayo las monocapas confluentes de las células infectadas con el virus incubadas en combinación con varias concentraciones de los extractos permitió evaluar la actividad antiviral de los extractos metanólicos y etanólicos mediante la determinación colorimétrica del porcentaje de células viables (Chattopadhyay, 2006).

El ensayo de reducción del efecto citopático se realizó con 3 diferentes estrategias que permitió evaluar la actividad antiviral de extractos en distintas partes del ciclo de replicación viral. Los ensayos de pretratamiento y cotratamiento se realizaron con el fin de determinar el efecto antiviral sobre la entrada del virus a la célula, mientras el postratamiento se efectuó con el fin de determinar la acción antiviral sobre la replicación o salida del virus (Kwon et al., 2010).

#### *Pretratamiento*

Durante el ensayo del pretratamiento, ninguno de los extractos fue capaz de reducir el efecto citopático. Los resultados estadísticos de porcentajes de viabilidad mostraron valores de citotoxicidad muy similares al control viral utilizado, sin diferencias significativas. La incubación de los extractos con las células MDCK 24 horas antes de la infección permitió determinar que los metabolitos presentes no tuvieron algún tipo de interacción que evitará la infección. Esto sugiere que no existe una interacción con los receptores del ácido siálico celulares y por lo tanto no poseen la capacidad de bloquear la absorción viral o entrada del virus a las células, permitiendo llevar a cabo la infección y el ciclo de replicación viral tal como ocurrió en los controles virales.

#### *Cotratamiento*

Los resultados estadísticos no mostraron ninguna reducción del efecto citopático de los extractos evaluados. Los valores obtenidos para cada uno de los extractos no presentaron diferencias significativas con los controles virales.

La incubación de los extractos con los virus permitió en este ensayo determinar que ningún metabolito presente en cada uno de los extractos interacciona con este. Al no presentar alguna interacción con la hemaglutinina, la absorción viral se llevó a cabo y los extractos no fueron capaces de inhibir la entrada o absorción del virus traduciéndose en una actividad antiviral nula.

### *Postratamiento*

Los resultados obtenidos durante el postratamiento no mostraron la reducción del efecto citopático. Este ensayo, en el cual se incubaron las células MDCK con los extractos después de la infección permitió determinar la falta de actividad antiviral durante la replicación o liberación del virus. De acuerdo con los resultados obtenidos se sugiere que los compuestos presentes no interaccionan con la neuraminidasa ni evitan la replicación viral. Con esto se propaga la infección y se lleva a cabo de la misma manera el ciclo de replicación viral que con los controles virales, reflejando así resultados sin diferencias estadísticas significativas con estos.

Con estos resultados obtenidos se descarta la actividad antiviral en los extractos metanólicos y etanólicos de las partes aéreas de *Elytraria imbricata* de acuerdo a los valores obtenidos. Es importante recordar que un componente intrínseco de los ensayos antivirales es la determinación del índice de selectividad (IS) hacia la célula huésped. Este índice se refiere a la relación máxima del fármaco o compuesto que causa el 50% de inhibición de las células normales (CC50) y la concentración mínima del compuesto a la que se inhibe el 50% del virus (IC50) (Cos *et al*, 2006). Mismo que no fue calculado debido a que el porcentaje de inhibición del efecto citopático no fue estadísticamente significativo.

## 10. CONCLUSIONES

- Se identificó la presencia de flavonoides, antraglucósidos, coumarinas, terpenoides en las partes aéreas y raíces.
- Se detectó positiva la presencia de un alcaloide únicamente en las raíces.
- Los extractos metanólicos tuvieron un mayor peso que los etanólicos al reconcentrarse, esto sugiere una mayor presencia de metabolitos secundarios, sin embargo debe corroborarse.
- Los extractos metanólicos y etanólicos no poseen actividad antibacterial contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
- Los extractos metanólicos y etanólicos no poseen actividad antiviral contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09.
- De acuerdo a los datos obtenidos se sugiere el uso tradicional de la planta se debe a mecanismos distintos a los antibacteriales, sin embargo debe corroborarse.

## 11. REFERENCIAS

Andersen, M.O., Markham, K.R (2006). *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis Group: USA.

Andrew, J. (2003). *BSAC Disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing*. U.K: British society for microbial technology.

Azmir, J., Jannatul, M.H., Zaidul I.S.M., M. Mohamed, A., Sharif K.M., Sahena F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini N.A.N. , Omarb A.K.M.(2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.

Balcase, M., Xu, T., Yeung. K., Zheng, D (2011). Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 required LasI and was stimulated by the *Pseudomonas* Quinolone Signal although Salicylic Acid Inhibition is Independent of the pqs pathway. *Journal of experimental microbiology and immunology*. 15, (84-89).

Beltz, L.A. (2011). *Emerging infectious diseases*. San Francisco, California, USA: 2011 John Wiley & Sons.

Bruneton, J (2008). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicianl plants*. France: Lavoisier.

Burch, J., Paulden, M., Conti, S., Stock, C., Corbett, M., Welton, N., Ades, A., Sutton, A., Cooper, N., Elliot, A., Nicholson, K., Duffy, S., McKenna, C., Stewart, L., Westwood, M., Palmer, S., (2009). Antiviral drugs for the treatment of influenza: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assesment*, 13, (1-265).

Chattopadhyay, D., (2006). Ethnomedicinal antivirals: scope and opportunity. En EnAhma, I., Aqil, F., y Owais M (Eds.). *Modern phytomedicine, Turning medicinal plants into drugs*. (pp. 313-339). Germany: Wiley-VCH VerlagGmbh & Co. KGaA.

Christman M., Kedwaih, A., Xu, J., Donis R., Lu, G., (2012). Pandemic (H1N1) 2009 Virus revisited: an evolutionary retrospective. *Infect. Genetic Evolutionary*, 11 (803-811).

Colegate S.M., Molyneux R.J. (2008). *Bioactive natural products. Detection, Isolation and structural determination*. London: Taylor & Francis Group.

Corderio da silva, A., Kratz. J. M., Farias, F. M., Henriques, T. A., Santos, J., Leonel, R.M., Lerner, C., Mothes, B., Barardi, C.R.M., Simoes, C.M.O. (2006). In vitro antiviral activity of marine sponges collected off brazilian coast, *Biological and pharmaceutical bulletin*. 29, (135-140).

Cos, P., Vlietink, A.J., Berghe, D.V., Maes, L.(2006). Anti-infective potencial of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *Journal of Ethnopharmacology*, 106, (290-302).

Coyle, M.B. (2005). Manual of antimicrobial susceptibility testing. USA: *American Society for Microbiology*.

Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). En Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1250–1318). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.

Cseke, L.J., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Warber, S.L., Duke, J.A., Briemann H.L.(2006). *Natural products from plants*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & francis group.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Internacional journal of antimicrobial agents*. 26, (343-356).

Das, K., Aramini, M.J., Ma, L., Krug, M.R., Arnold, E., (2010). Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Natural structure & molecular biology*, 17, (530-538).

Deinstrop-Hahn, E., (2007). *Applied thin-layer chromatography*. Heppenheim, Germany: Wiley-VCH.

Dewick M.P. (2002). *Medicinal natural products, a biosynthetic approach*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.

Eloff N.J., y McGaw L.J. (2006). Plant extracts used to manage bacteria, fungal, parasitic infections in southern África. En Ahma, I., Aqil, F., y Owais M. (Eds.) , *Modern phytomedicine, Turning medicinal plants into drugs*. (pp. 97-121). Germany: Wiley-VCH VerlagGmbH& Co. KGaA.

Fabricant, D.S., y Farnsworth, N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Enviromental health perspective*, 109, 69-75.

Fried, J.S.B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. Madison Avenue, New York, NY: Marcel Dekker, Inc.

Ghisalberti E.L. (2008). Detection and isolation of bioactive natural products. En Colegate S.M., y Molyneux R.J. (Eds.). *Bioactive natural products. Detection, Isolation and structural determination*. (pp. 11-76). London: Taylor & Francis Group.

Hajnos, M. L.,(2008) TLC of Diterpenes. En Hajnos, M.W., Sherma, J., Kowalska, (Eds). *T. Thin layer chromatography in phytochemistry*. USA: Taylor Francis & Group.

Handa, S.S., Khanuja S.P.s., Longo. G., Rakesh, D.D. (2008). *Extraction Technologies for medicinal and aromatic plants*. Trieske, Italy: International centre for science and high technology.

Harbone, J.B. (1998). *Phytochemical methods*. Philadelphia, USA: Thompson Science.

Harris, L.G., Foster, S.J., Richards, R.G., (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials*, 4. (39-60).

He, W., Han, H., Wang, W., Gao, B. (2011). Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from dandelion. *Virology journal*, 8, (538-549).

Houghton, P.J. (2008). TLC of indole alkaloids. En Hajnos, M.W., Sherma, J., Kowalska, (Eds). *T. Thin layer chromatography in phytochemistry*. USA: Taylor Francis & Group.

Jakobsen, B.H., Christensen, L.P., (2008). Polyacetylenes: Distribution in Higher plants, Pharmacological effects and analysis. (Eds.) En Hajnos, M.W., Sherma, J., Kowalska, *T. Thin layer chromatography in phytochemistry*. USA: Taylor Francis & Group.

Japoni, A., Farshad, S., Alborzi, A. (2009). Pseudomonas aeruginosa: Burn infection, treatment and antibacterial resistance. *Iranian Red. Crescent medical journal*. 11, (244-254).

Jassim, S.A.A., y Najji, M.A., (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of applied microbiology*, 95, (412-427).

Jork, H., FUnk, W., Fischer, w., Wimmer, H., (1990). *Thin-layer cromatography. Reagents and detection methods*. Germany: VCH.

Keeling C.I., y Bohlmann J. (2012). Plant terpenoids. En Natanya, C (Ed) *Natural products in chemical biology* (pp. 127-142), Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Ketabchi, S., Moatari, A., Shadram, M., Rostami, Y. (2011). The anti influenza virus activity of *Anchusaitalica*. *Society of applied sciences*, 4, (758-761).

Koch, A., Basar, S., Richter, R. (2008). TLC of Mono- and sesquiterpenes. En Hajnos, M.W., Sherma, J., Kowalska (Eds). *T. Thin layer chromatography in phytochemistry*. USA: Taylor Francis & Group.

Kwon H.J., Kim, H., Yoon, S.Y., Ryu Y.B., Chang, J.S., Cho, K., Rho, M., Park, S., Lee, W.S., (2010). *In vitro* inhibitory activity of *Alpinia katsumadai* extracts againts influenza virus infection and hemagglutination. *Virology journal*. 7, (307-314).

Liu, Q., Liu, D., Yang, Z., (2013). Characterisitics of human infection with avian influenza viruses and development of new antiviral agents. *Acta pharmacologica sinica*, 32 (1257-1269).

Mack, D., Davies, A.P., Harris, L.G., Jeeves, R., Pascoe B., Knobloch, J.K.M., Rohde, H., y Wilkinson T.S., (2013). Staphylococcus epidermis in biomaterial-associated infections. En Moriarty, F., Zaat, S.A.J., Busscher, H.J. (Eds), *Biomaterials associated infection* (pp.25-56). New York, USA: Springer Science business media.

Mata, R., Cruz, F.R., Rojas. A. (1999). Bioactive natural products of medicinal and agrochemical interest from selected mexican medicinal plants. En Hostettman, K., Gupta, M.P., Marston, A. Amsterdam (Eds). *Chemical, Biological and Pharmacological properties of medicinal plants from the americas*. The Netherlands: Overseas publishers association.

Mbarek, L.A., Mouse, H.A., Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., Kamal, M., Dalal, A., Ziad, A., Antitumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and biological research*, 40, (839-847).

Moss, R.B., Davey, R.T., Steigbigel R.T., Fang, F., (2010). Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 10, (1086- 1093).

Nicholson, K.G., Webster, R.G., Hay, A.J., (2000) *Textbook of Influenza*. Oxford, London: Blackwell science Ltd.

O'Connor, S.E.(2010). Alkaloids. En Mander L., Liu H.W. (Eds.) *Comprehensive natural products. Chemistry and biology Volume I* (977- 1007) Kidlington, United Kingdom: Elsevier Ltd.

O'Gara, J.P., Humphreys H., (2001) *Staphylococcus epidermis* biofilms: importance and implications. *Journal of medical microbiology*, 50, (582-587).

Oboh, I.E., Akerele, J.O., Obasuy, O., (2007). Antimicrobial activity of the ethanol extract of the aerial parts of *Sidaacuta burm. f.* (malvaceae). *Tropical journal of pharmaceutical research*, 6, (809-813).

Oleszel, W., Kapusta, I., Stochmal, A., TLC of triterpenes (including saponins). En Hajnos, M.W., Sherma, J., Kowalska, (Eds). *T. Thin layer chromatography in phytochemistry*. USA: Taylor Francis & Group.

Rahman, A., (2002). *Studies in natural products chemistry*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier science B.V.

Ramawat, K.G., Dass, S., y Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential .En *Herbal Drugs: Ethnomedicine to modern medicine* (pp. 7-32). Verlag Berlin Heidelberg: Springer.

Roth, M.G. (1995). *Methods in cell biology*. San Diego, California, USA: Academic Press, INC.

Saker, L., Lee, K., Cannito, B., Gilmore, A., Lendrum, D.C. (2004). Globalization and infection diseases: A review of the linkages. *World health organization. Special topics No.3*.

Sokolov, D.N., ZarubaeV, V.V., Shro, A.A., Polovinka, M.P., Luzina, O.A., Komarova, N.I., Salakhutdinov N.F., Kiselev, O.I., (2012). Anti-viral activity of (-) and (+)-usnic acids and their derivates againts influenza virus A(H1N1)2009. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22, (7060-7064).

Sood, R., Swarup, D., Bhatia, S., Kulkarni, D.D., Dey, S., Saini, M., Dubey, S.C., (2012). Antiviral activity of crude extracts of *Eugenia jambolana* Lam. againts highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus. *Indian journal of experimental biology*, 50, (179-186).

Suchman, E., Blair, C. (2007). Cytopathic effects of viruses protocols. *American society for microbiology*. (En línea).

Tiwari, P., Kumar, B., Gurpreet, K., Kaur. G., Kaur H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*. 1, (98-103).

Tolonen, A.(2003). *Analysis of secondary metabolites in plant and cell tissue of Hypericum perforatum L. and Rhodiola Rosea L.* "Tesis de doctorado", University of Oulu, Oulu, Finland.

Toval N.H., Rueda, R.M. (2009), *Malezas comunes de León, Nicaragua.*, Costa Rica: INBio.

Van den berg, A.J.J., (1989). Labadie, R.P., Quinones, En Dey, P.M., y Harbone, J.B., *Methods in plant biochemistry*. San Diego, C.A., USA: Academic Press Inc.

Vanderlinden, E. y Naesens, L. (2013), Emerging Antiviral Strategies to Interfere with Influenza Virus Entry. *Med. Res. Rev.*doi: 10.1002/med.21289.

Walksmunzka-Hajnos, M., Hawryl M.A., (2008) . Application of TLC in the isolation and analysis of coumarins. En Hajnos, M.W., Sherma, J., Kowalska (Eds). *T. Thin layer chromatography in phytochemistry*. USA: Taylor Francis & Group.

Wiklter, M.A., Cockrill, F.R., Craig, W.A., Dudley M.N., Eliopolus, G.M., Hecht. D.W., Hindler, J.F., Ferraro, M.J., Swenson. J. M., Low. D.E., Sheehan, D.J., Tehover, F.C., Turnidge. J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L., (2006). *Performance standars for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard Ninth edition*. Clinical and laboratory standards Institute: Pennsylvania, USA.

Wink, M. (2010). Introduction. En Wink, M. (Ed.). *Annual plant reviews volume 39 functions and biotechnology of plant secondary metabolites*(pp. 1-20). Germany: Wiley.

Zapór, L. (2004). Toxicity of some phenolic derivates *in vitro* studies. *International journal of occupational safety and ergonomics*. 4, (319-331).

## 12. ANEXOS

### 12.1 Preparación de reactivos de CCF

#### *Reactivo de Dragendorff*

- Solución a): Disolver 0.85g de nitrato básico de bismuto en 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua bajo calentamiento.
- Solución b): Disolver 8 g de Ioduro de potasio en 30 mL de agua
- Solución stock. (a)+( b) en una relación 1:1

Aplicación: 1mL de la solución stock se mezcla con 2 mL de ácido acético glacial y 10mL de agua.

#### *Reactivo Natural products*

- Reactivo Neu: 1g de éster 2-aminoetil difenil bórico se disuelven en 100mL de Metanol.
- Reactivo PEG-4000: 5g de polietilenglicol-400 se disuelven en 100mL de Etanol.

Aplicación: 10mL del reactivo de Neu y 8mL del reactivo PEG-4000. Reactivo de hidróxido de potasio

#### *Reactivo de hidróxido de potasio*

- 5g de KOH se disuelven en 100 o 50 mL .

#### Reactivo vainillina-ácidosulfúrico

- a) Disolver 1 g de vainillina en 100 mL de etanol.
- b) 10 mL de Ácido sulfurico en 100 mL de etanol.

Aplicación: 10 mL de (a) seguidos inmediatamente de 10 mL de (b)