

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Calea
urticifolia* (MILL.) DC. Y BIOENSAYO DIRIGIDO PARA DETERMINAR SU
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *IN VITRO***

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA DE LOS ÁNGELES ZERMEÑO MACÍAS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ

ASESORES:

DR. MARCO MARTÍN GONZÁLEZ CHÁVEZ

DR. ISRAEL RAZO SOTO

DICIEMBRE 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Calea urticifolia* (MILL.)DC. Y BIOENSAYO DIRIGIDO PARA DETERMINAR SU ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *IN VITRO*.

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA DE LOS ÁNGELES ZERMEÑO MACÍAS

COMITÉ TUTELAR:

DIRECTOR: DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ

ASESOR: DR. MARCO MARTÍN GONZÁLEZ CHÁVEZ

ASESOR: DR. ISRAEL RAZO SOTO

SINODALES:

PRESIDENTE: DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ

SECRETARIO: DR. MARCO MARTÍN GONZÁLEZ CHÁVEZ

VOCAL: DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

**PROYECTO REALIZADO EN:
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ZONAS DESÉRTICAS
EN EL LABORATORIO DE RECURSOS BIÓTICOS, UASLP.**

EN COLABORACIÓN DE:

**LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA ORGÁNICA Y SÍNTESIS
ORGÁNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UASLP.
LABORATORIO DE GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UASLP.**

CON FINANCIAMIENTO DE:

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO EL FINANCIAMIENTO DE **PROMEP**, A TRAVÉS DEL APOYO AL CUERPO ACADÉMICO DE "RECURSOS BIÓTICOS"; AL FONDO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN CONVENIO **C13-FAI-03-13.13.**, Y EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ZONAS DESÉRTICAS POR SU APOYO FINANCIERO EN LA IMPRESIÓN DE MI TRABAJO, LA FACILITACIÓN DE SUS INSTALACIONES Y APOYO ADMINISTRATIVO.

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES DE LA SIERRA MADRE
ORIENTAL DE SAN LUIS POTOSÍ**

**AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS
Becario No. 417333**

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

DEDICATORIA

A mis padres, que han sido un gran apoyo incondicional, un gran ejemplo y que me han enseñado a luchar por mis ideales y por hacerme la persona que soy con su entera dedicación hacia mi educación.

A la memoria de mi padre, Lic. Casildo Zermeño Zermeño, que siempre me brindó su apoyo incondicional y estuvo conmigo en la mayoría de las etapas de este proyecto.

A mi madre, Yolanda Macías Alvarado por apoyarme y tolerar mis ausencias en casa, por escucharme y hacerme sentir mejor en los momentos difíciles.

A mis hermanos Yolanda y Antonio por todos los momentos que hemos pasado juntos, su apoyo incondicional y por enseñarme muchas cosas.

A mi novio, por brindarme su apoyo incondicional y hacer más llevaderos los momentos difíciles, por escucharme y motivarme.

A todos mis amigos, por estar siempre ahí, para mí, cuando más los he necesitado, por comprender mis ausencias a las reuniones, porque no sólo están en los momentos buenos, sino también en los difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por darme la oportunidad de poder enriquecer mis conocimientos y desarrollarme profesionalmente.

A CONACyT, por el otorgamiento de la beca durante el periodo de estancia en el posgrado.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, en especial a la Dra. Erika García Chávez por haberme dado la oportunidad de conocer este mundo de la investigación, por transmitirme su gran pasión por la ciencia, por confiar en mí, por su apoyo incondicional durante este tiempo que he estado trabajando con ella, por su comprensión, amistad y por todas las enseñanzas profesionales y personales que me ha dado.

Al Dr. Gerson Alonso Soto Peña por su apoyo y enseñanzas durante el trabajo experimental en cultivo celular.

Al Dr. Marco Martín González Chávez por todas las enseñanzas profesionales y personales que me ha brindado, por confiar en mí y dejarme trabajar con él.

Al Dr. Israel Razo Soto por su colaboración en el proyecto, por las sugerencias brindadas y su apoyo en la revisión del escrito y los avances.

A la Dra. Norma Cecilia Cárdenas Ortega, por su asesoría en la realización del análisis fitoquímico preliminar, por su apoyo y recomendaciones.

A la QFB. Josefina Acosta, por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el IIZD, por los reactivos que me facilitó, por la capacitación en el uso de equipo y tratamiento de desechos, por su amistad y por motivarme a seguir adelante.

A la Dra. Perla del Carmen Niño Moreno por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por la confianza que tuvo conmigo para dejarme utilizar sus equipos, por siempre motivarme y por todas las atenciones que tuvo durante que el tiempo que pasé en su laboratorio.

A la I.A María Estela Núñez Pastrana por su paciencia y enseñanza en el manejo de equipo, por todas las atenciones que tuvo conmigo durante mi paso por el Laboratorio de Síntesis Orgánica, por motivarme y preocuparse por mí, por su amistad.

Al Dr. Gregorio Álvarez Fuentes por su asesoría en la parte estadística de mi proyecto.

A la Dra. Bertha Irene Juárez Flores por sus aportaciones, recomendaciones y motivación durante la realización del proyecto.

Al M. en C. Edgar Turrubiarres por su enseñanza en el manejo de los equipos, por los materiales y equipos que me hizo favor de prestar.

A mi novio, mi mejor amigo, Ing. Gabriel Izquierdo por motivarme siempre a salir adelante, por escucharme y hacerme sentir mejor en los momentos difíciles, por su compañía, gran amistad, por su ayuda incondicional durante este tiempo.

A la M. en C. Lucy Torres y al QFB Edgar Esparragoza por su apoyo incondicional, por todos los momentos divertidos que hemos pasado, por los ratos de ciencia, por siempre estar apoyándome y ayudándome en la etapa experimental, pero sobre todo por esa amistad incondicional que siempre me han brindado.

A Pablo, Yosahandy, Amaranta, Paloma, Blanca, Octavio, Ulises por su gran amistad y apoyo incondicional, por alegrar los momentos de ciencia, por el apoyo

brindado durante mi estancia en el IIZD, pero sobre todo por comprender mis ausencias y por motivarme a salir adelante.

A Oziel, Sarita, Conny, Carmen, Maru, Rodo, Paco, Lucía, Saraí y todos los chicos del laboratorio de Síntesis Orgánica, por enseñarme a usar aparatos, por darme tips en el uso de ciertas técnicas, por darme consejos y por los ratos de distracción que tuvimos.

A Yaz, Cindy, Jehú, Desi del Laboratorio de Diagnóstico Genético y Molecular por alegrar el laboratorio con sus pláticas, bromas y comentarios.

Al Geógrafo Ulises Pineda por su apoyo en la realización del mapa de ubicación, por ser un gran amigo y darme su apoyo y brindarme un poco de su tiempo.

A los chicos de verano de la ciencia, Nancy y Edgar por su apoyo en la realización de alguna parte del proyecto y por su amistad.

A Paulina Guzmán y Ale Covarrubias por todo lo que pasamos juntas desde el comienzo de este bonito proyecto, por sus enseñanzas y su amistad.

A todos mis amigos, por todo el apoyo que me han brindado con el paso de los años, por alegrar y hacer más llevadero nuestro paso por esta vida.

A la QFB Laura Begbeder y Lorena Leija por ser siempre serviciales, amables y por su apoyo en los trámites administrativos durante mi estancia en el posgrado.

A la Sra. Simona y toda su familia, por brindarnos siempre un lugar cálido en las salidas en campo, por ser tan atenta con nosotros y ayudarnos en la recolección.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antiinflamatorio *in vitro* de las fracciones orgánicas de extractos de *Calea urticifolia* (Mill.) DC. a través de la cuantificación de TNF- α y determinar la fracción bioactiva para su caracterización química.

Se realizó la evaluación de la actividad biológica en cultivo de células mononucleares humanas (CMN) de 9 fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico, 4 extractos de diferente polaridad (hexano, diclorometano, etanol y agua) obtenidos por percolación, 11 fracciones del extracto diclorometano y 12 del extracto hexánico. Se tomaron CMN de cinco individuos sanos, las cuales fueron cultivadas con los diferentes tratamientos. Experimento 1 y 2: 88, 8.8, 0.88 y 0.088 $\mu\text{g/mL}$, experimento 3 y 4: 88 y 8.8 $\mu\text{g/mL}$ de cada una de las fracciones/extractos diluidos en DMSO 1%; control de células sin estímulo, control de LPS 1 $\mu\text{g/mL}$, control de indometacina 5 $\mu\text{g/mL}$, control DMSO 1%. Tras 24 hrs de incubación, se obtuvo el sobrenadante que fue analizado para determinar la concentración de TNF- α mediante la técnica de ELISA. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza y un posterior análisis de comparación de medias de Tukey.

Se determinaron los compuestos químicos presentes en las fracciones más activas mediante CG/EM tras un proceso de derivatización. Se realizó la identificación de lactonas sesquiterpénicas por cromatografía en capa fina en las fracciones activas, así como la purificación y determinación de Rf de los productos puros más abundantes, los cuales fueron sometidos a un análisis por espectroscopía infrarrojo.

Los resultados obtenidos mostraron que las 9 fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico presentaron efecto inhibitorio de TNF- α dosis dependiente ($p < 0.05$). De los extractos obtenidos por percolación, tres presentaron efecto inhibitorio de TNF- α en comparación con el grupo estimulado con LPS, sin ser diferentes entre ellos ($p < 0.05$). Las fracciones 8 y 9 del extracto diclorometano y 9

y 10 del hexánico presentaron efecto inhibitorio de TNF- α comparado con el grupo estimulado con LPS. Siendo este efecto antiinflamatorio igual al del grupo tratado con el fármaco prototipo antiinflamatorio (indometacina) para las fracciones 8 y 9 de diclorometano; en cambio las fracciones 9 y 10 presentaron un mayor efecto antiinflamatorio que el observado con indometacina ($p < 0.05$). En las fracciones activas fueron identificados los siguientes compuestos: acetato de fitol, transfitol, fitol, ácido palmítico, ácido málico, ácido linoleico, ácido linolénico, oftalato de isooctilo, oftalato de 2-didecanilo, ácido oftálico; de estos, los ácidos: palmítico, linoleico y linolénico, así como el fitol han sido reportados en la literatura como compuestos que presentan actividad antiinflamatoria. Manchas negras, verdes y rojas observadas en la cromatografía en capa fina correspondieron a lactonas sesquiterpénicas. Fueron obtenidos 9 compuestos (C) puros, siendo mayoritarios 2 de ellos (C3 y C5) con un Rf de 0.5366 y 0.6098 respectivamente. El espectro infrarrojo de cada uno de estos dos compuestos mostró similitudes entre sí, se observaron bandas que indican presencia de vibraciones de tensión de O-H, C=O, C-O y Csp³-H, lo que nos indica que se puede tratar de isómeros del mismo compuesto además de que estas bandas son características de fragmentos moleculares de tipo carbohidrato.

La inhibición de TNF- α *in vitro* de los diferentes extractos y fracciones de *Calea urticifolia* (Mill.) DC está sujeta a la polaridad del extracto con la que se obtenga, así como a la fracción orgánica estudiada y a su composición química.

INDICE DE CONTENIDO

	Pp
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. HIPÓTESIS	5
4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo general	5
4.2 Objetivos específicos	5
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	6
5.1 Experimento 1: Estudio fitoquímico preliminar de extractos acuosos y orgánicos de <i>Calea urticifolia</i> (Mill.)DC.	7
Resumen	7
1. Introducción	7
2. Metodología	8
2.1 Recolección del material vegetal	8
2.2 Preparación del material vegetal	9
2.2.1 Maceración	9
2.2.2 Infusión	9
2.2.3 Decocción	9
2.3 Análisis fitoquímico preliminar cualitativo de los extractos	10
3. Resultados y discusión	10

3.1 Preparación del material vegetal	10
3.2 Estudio fitoquímico preliminar	11
4. Conclusiones	13
5. Referencias bibliográficas	14
5.2 Experimento 2: Valoración del efecto antiinflamatorio de extractos y fracciones orgánicas de <i>Calea urticifolia</i> (Mill.) DC.	20
Resumen	20
1. Introducción	20
2. Metodología	22
2.1 Recolección del material vegetal	22
2.2 Preparación del material vegetal	22
2.3 Preparación de extractos	22
2.3.1 Extracto etanólico	22
2.3.2 Preparación de los extractos por percolación	24
2.4 Bioensayo del efecto antiinflamatorio	26
2.4.1 Obtención de células mononucleares	26
2.4.2 Agente inflamatorio <i>in vitro</i>	26
2.4.3 Tratamientos	27
2.5 Evaluación de la secreción de la citocina proinflamatoria: TNF- α	28
2.6 Análisis de resultados	28
3. Resultados y discusión	29

3.1 Preparación de extractos	29
3.2 Determinación de la concentración de TNF- α del agente antiinflamatorio <i>in vitro</i>	31
3.3 Determinación de la concentración de TNF- α <i>in vitro</i> de los diferentes tratamientos	32
3.3.1 Fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico	32
3.3.2 Extractos obtenidos por percolación	33
3.3.3 Fraccionamiento de los extractos hexánico y diclorometano obtenidos mediante percolación	35
4. Conclusiones	38
5. Referencias bibliográficas	39
5.3 Experimento 3: Caracterización química de las fracciones bioactivas de <i>Calea urticifolia</i> (Mill.) DC.	42
Resumen	42
1. Introducción	42
2. Metodología	44
2.1 Procesamiento de las fracciones bioactivas	44
2.2 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a masas	45
2.3 Identificación de lactonas sesquiterpénicas en fracciones activas	45
2.3.1 Determinación de solventes para purificación de extractos	45
2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	46
2.3.3 Purificación	46

2.3.4 Concentración y secado de los productos puros	47
2.3.5 Determinación de R _f de los productos puros mayoritarios	47
2.4 Espectroscopía infrarrojo	47
3. Resultados y discusión	47
3.1 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a masas	47
3.2 Identificación de lactonas sesquiterpénicas	50
3.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	51
3.4 Purificación	51
3.5 Espectroscopía infrarrojo	53
4. Conclusiones	53
5. Referencias bibliográficas	54
ANEXO I. Sitio de recolección de <i>Calea urticifolia</i> (Mill.) DC.	58
ANEXO II. Reacciones del estudio fitoquímico preliminar	59
ANEXO III. Hoja técnica kit ELISA TNF- α humana.	65

1. INTRODUCCIÓN

En México, las plantas curativas o medicinales son un recurso de uso terapéutico por excelencia y actualmente son empleadas de manera complementaria dentro de los programas de salud (Sector Salud y el Instituto Mexicano del Seguro Social -IMSS), lo que permite asociar el conocimiento tradicional con el científico, siendo esta relación importante en la conservación de la biodiversidad global y en el uso sustentable de los recursos naturales (Canales, 2006).

Esta incorporación de la medicina tradicional a los programas de salud, es consecuencia del reconocimiento de su valía, que en la actualidad se respalda en la validación de los efectos terapéuticos y el reconocimiento químico de los componentes naturales responsables, y que son considerados base de la medicina contemporánea. Esto ha generado el creciente interés de estudios orientados a reconocer la efectividad de las plantas utilizadas por los grupos indígenas (Bermúdez *et al.*, 2005; Llorach *et al.*, 2007; Merino, 2011).

En el año 2007 se define el programa Nacional de Salud 2007-2012, refiere “Promover el estudio y validación científica de las medicinas tradicionales y complementarias” con la finalidad de fortalecer los servicios de salud a través de la incorporación formal de la medicina tradicional en el sistema de salud (UNAM, 2009). A través de: diseñar y operar una política de enseñanza de medicina tradicional y complementaria en el Sistema Nacional de Salud, incorporar en las demandas del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social la investigación en medicinas tradicionales y complementarias (UNAM, 2009).

Calea urticifolia (Mill.) DC., especie de interés de esta investigación, es una planta conocida tradicionalmente como negrito por la etnia *xí'bi* de la región de La Palma comunidad del municipio de Rayón, en el estado de San Luis Potosí. Estudios recientes a través de una investigación etnobotánica demostró que esta planta es utilizada de manera tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades

como: dolor de estómago, de cabeza y en general, inflamación, gastritis, diabetes mellitus, hipertensión, diarrea, empacho, bilis, vómito (Guzmán, 2010).

Dentro de los aspectos farmacológicos validados se destacan sus efectos: antifúngico (Gamboa-Angulo *et al.*, 2005), inhibitorios de la diferenciación preadipocitaria (Matsuura *et al.*, 2005), citotóxico en células de cáncer de colon y leucemia (Yamada *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005; Ohguchi *et al.*, 2009), antioxidante (Umemura *et al.*, 2008), para tratamiento de úlcera gástrica y bactericida (Borges del Castillo *et al.* 1981; Matsuura *et al.*, 2005).

Guzmán y colaboradores (2010), identificaron la capacidad antiinflamatoria del extracto etanólico de la *C. urticifolia* sobre la inflamación aguda mediada por la estimulación del sistema inmune por carragenina y el proceso inflamatorio crónico de bajo grado asociado al tejido adiposo (TA) tras una alimentación rica en grasas *in vivo*. Los resultados demostraron la capacidad antiinflamatoria del extracto vegetal, a través de la inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como la estimulación de la secreción de adiponectina, adipocina responsable de contrarrestar el efecto proinflamatorio sobre el TA.

Este hallazgo indudablemente, corroboró el efecto medicinal antiinflamatorio atribuido tradicionalmente a *C. urticifolia* por la etnia *xí'oi*, sin embargo, la relevancia del estudio radica en la capacidad del compuesto etanólico en interferir en la inflamación mediada por el sistema inmune y sobre el TA, es esta última de gran importancia, debido a que este tipo de proceso inflamatorio crónico de bajo grado, está asociado con la resistencia a la insulina, la cual es responsable a largo plazo de la generación de enfermedades crónico degenerativas como la arterosclerosis, hipertensión y diabetes mellitus (DM).

Tales enfermedades señaladas como principal causa de muerte en nuestro país y consideradas como un serio problema de salud pública (Guzmán, 2010; INEGI, 2010).

Por otra parte, existen evidencias sobre la caracterización química de los compuestos aislados de *C. urticifolia*, entre los cuales destacan sesquiterpenlactonas dentro de los que se encuentran algunos germacranólidos:

5 heliangólidos y 3 nuevos obtenidos de raíz (Bohlmann, F. & Jakupovic, J, 1979); caleína D, 2,3-epoxi-caleina D, juanislamina (Borges del Castillo *et al.*, 1980) y 2,3-epoxi-juanislamina (Borges del Castillo *et al.*, 1981); 3,10-epoxi-9-(3-metilbutanoil)-8-(2-metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11(13)-trien-2,6 -ólido; 3,10-epoxi-9-(3-metil-2- butenoil)-8-(2- metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11(13)-trien-12,6-ólido;3,10-epoxi- 9-angeloil-8-(2-metilpropenoil)-15-idroxi-1-oxo-germacra-2,4,11(13)-trien-12,6-noil)-15-hidroxi-1-oxo germacra 2,4,11(13)-trien-12,6-olido, cinco heliangólidos, ocho isoeugenoles derivados y un fluoroglicinol derivativo (Bohlmann & Jakupovic, 1979); caleolactona A, caleolactona B y 2,3-epoxicaleolactona A (Herz & Kumar, 1980).

Tales sesquiterpenlactonas han sido valoradas experimentalmente en su actividad biológica, entre las que destacan su capacidad citotóxica en células carcinogénicas U937 (Yamada *et al.*, 2004), y sobre su inferencia en la diferenciación adipocitaria en células 3T3-L1 (Matsuura *et al.*, 2005).

De acuerdo con lo anterior, se tiene interés en identificar y caracterizar químicamente la molécula responsable del efecto antiinflamatorio de *C. urticifolia*, con base en una matriz polar que asemeja las condiciones de extracción en la medicina tradicional, de esta manera se contribuye al conocimiento químico y farmacológico de esta especie, así como a encaminar las investigaciones futuras a la generación de fitomedicamentos de carácter preventivo.

2. JUSTIFICACIÓN

Recientes investigaciones han revelado que la inflamación crónica de bajo grado, es otro componente del síndrome de resistencia a la insulina. Tal hecho dirige que una respuesta inmunológica e inflamación sistémica mediada por el TA puede

subyacer al desarrollo del síndrome metabólico y como consecuencia a la DM. En México existe una amplia diversidad de plantas utilizadas para el control de la hiperglucemia; sin embargo, sólo algunas de ellas han sido evaluadas farmacológicamente con la finalidad de corroborar el conocimiento tradicional indígena, asegurar su uso y reconocer fuentes naturales potenciales para el tratamiento de la DM (Guzmán, 2010). Los resultados que arrojan estos estudios, se han dirigido hacia la reducción de la concentración de glucosa en sangre, sin embargo a pesar de la valía de estos estudios, adolecen de estrategias farmacológicas encaminadas a la prevención de la generación de la enfermedad; la cual inicia a través de la producción de una resistencia a la insulina por las células (Lozano, 2002; Krakof *et al.* 2003; Domínguez *et al.*, 2005; Tellez, 2005; ADA, 2007).

Tal resistencia corresponde a una anomalía celular compleja que implica a varios órganos, especialmente al tejido adiposo, al hígado y al músculo esquelético, y que predispone a varios defectos metabólicos (Martínez, *et al.*, 2003).

Los fármacos convencionales antiinflamatorios no esteroideos (AINE) generalmente ocasionan alivio en periodos de tiempo significativos, pero desafortunadamente no han tenido éxito contra desórdenes de inflamación crónica, la que ha sido relacionada con enfermedades como cáncer, DM, Alzheimer, artritis reumatoide, alteraciones pulmonares, cardiovasculares, y autoinmunes (Bharat, *et al.*, 2006).

Debido a esto, se considera relevante evaluar la potencialidad de las especies medicinales para el tratamiento de estas enfermedades y generar la iniciativa del desarrollo de antiinflamatorios seguros y eficaces (Debabrata, *et al.*, 2001; Kim, *et al.*, 2004). De acuerdo con lo anterior, la inhibición del proceso inflamatorio, así como sus componentes activadores como las citocinas proinflamatorias podrían contribuir a los mecanismos preventivos y/o regulatorios de la resistencia a la insulina y prevenir o retrasar la aparición de las enfermedades relacionadas con este síndrome. Por lo tanto, esta propuesta de trabajo da continuidad a la

evaluación farmacológica de *C. urticifolia* específicamente en la caracterización de la fracción química responsable de su efecto antiinflamatorio, con la finalidad de profundizar el conocimiento y uso de la especie, así como contribuir con la conservación de la misma, debido a que también forma parte de la reserva de los hábitats naturales donde se distribuye de manera silvestre.

3. HIPÓTESIS

Fracciones orgánicas del extracto etanólico de *C. urticifolia*, presentaran efecto inhibitorio de la secreción de la citocina proinflamatoria TNF- α *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiinflamatorio de la fracciones orgánicas del extracto etanólico de *C. urticifolia*., a través de la cuantificación de la citocina proinflamatoria TNF- α *in vitro* y determinar la fracción bioactiva para su caracterización química.

4.2 Objetivos específicos

- Investigar los compuestos químicos contenidos en diferentes extractos de la planta mediante el estudio fitoquímico preliminar.
- Obtener las fracciones orgánicas a través de cromatografía en columna.
- Evaluar farmacológicamente el efecto antiinflamatorio de las fracciones orgánicas *in vitro*.
- Caracterización química del extracto orgánico con mayor efecto terapéutico, a través de técnicas de identificación espectroscópica infrarrojo y espectrometría de masas.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se dividió en tres experimentos, los cuales serán descritos a continuación en formato artículo:

Experimento 1. **ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE EXTRACTOS ACUOSOS Y ORGÁNICOS DE *Calea urticifolia* (MILL.) DC.**

Experimento 2. **VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES ORGÁNICAS DE *Calea urticifolia* (MILL.) DC.**

Experimento 3. **CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA FRACCIÓN BIOACTIVA DE *Calea urticifolia* (MILL.) DC.**

5.1 EXPERIMENTO 1

ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE EXTRACTOS ACUOSOS Y ORGÁNICOS DE *Calea urticifolia* (MILL.) DC.

RESUMEN

Calea urticifolia (Mill.) DC es una planta que pertenece a la familia *Asteraceae* y que es utilizada de manera tradicional por la etnia *xí'oi* de la región de La Palma en San Luis Potosí por su acción antiinflamatoria, efecto terapéutico que sugiere estar relacionado con la composición química de sus metabolitos secundarios. Por lo anterior, se identificó a través de un análisis fitoquímico preliminar los componentes químicos presentes en extractos orgánicos de diferente polaridad (hexano, diclorometano, etanol y metanol) de la planta. Los resultados mostraron la presencia de grasas, carbohidratos, flavonoides, saponinas, heterósidos cardiotónicos, taninos, alcaloides, terpenos y lactonas sesquiterpénicas. La presencia de algunos de ellos sugiere que pudieran estar asociados a los efectos terapéuticos como agente antiinflamatorio.

1. INTRODUCCIÓN

En México, las plantas curativas son un recurso de uso terapéutico por excelencia y que puede constituir un elementos fundamental para implementar nuevos programas de salud que permitan relacionar el conocimiento tradicional con el científico (Canales, 2006).

En la actualidad, se ha incrementado el uso de la medicina tradicional como alternativa para mejorar el estado de salud, como por ejemplo, se ha generado una importante investigación en la búsqueda de nuevos y seguros agentes antiinflamatorios basados en la medicina tradicional, ya que este conocimiento empírico que es transmitido de generación en generación ha permitido el desarrollo de sustancias químicas que son la base para la generación de fármacos (Bermúdez, 2005).

Para la República Mexicana, del total de su existencia de especies vegetales, se considera que el 50% posee propiedades medicinales, constituyendo un medio valioso en los sistemas de salud (Guzmán 2010).

Calea urticifolia es un arbusto que pertenece a la familia Asteraceae, es utilizada de manera tradicional por la etnia *xí'oi* de la región de La Palma en el estado de San Luis Potosí, para el tratamiento de diversos padecimientos, como lo son: diabetes mellitus, gastritis y problemas digestivos e inflamatorios (Guzmán, 2010).

Guzmán y colaboradores (2010) demostraron del extracto etanólico de la planta la capacidad inhibitoria en la secreción de citocinas proinflamatorias asociadas con inflamación aguda y crónica *in vivo*. Este resultado sugiere que el extracto etanólico de la planta presenta componentes químicos capaces de inducir el efecto terapéutico. Con respecto a su composición fitoquímica, a nuestro conocimiento no existe evidencia de antecedentes previos que permitan identificar los metabolitos secundarios presentes en la especie y que dé indicio de la asociación de su efecto antiinflamatorio, que nos permita dirigir una elucidación y caracterización química de los compuestos responsables. Por ello, este trabajo tiene como objetivo identificar cualitativamente a través de un estudio fitoquímico los metabolitos que presenta la planta.

2. METODOLOGÍA

2.1 Recolección del material vegetal

C. urticifolia, se recolectó en la comunidad de Potrero del Carnero en el municipio de Rayón de San Luis Potosí, teniéndose dos puntos de muestreo, en sus alrededores a 21°52'29.8" N y 099°27'08.4" W a 903 msnm y dentro de ella a 21°52'27.6"N y 099°27'00.6"W a 901 m de altitud. Anexo 1: Mapa de ubicación del sitio de recolección.

2.2 Preparación del material vegetal

Una vez obtenido el material vegetal se colocaron los ejemplares en papel absorbente por un periodo de 48 h, para separar las hojas de la planta; posteriormente, éstas se secaron durante 15 días al abrigo de la luz a una temperatura de 22°C.

Se fraccionó la planta y se pulverizaron las hojas, en un molino eléctrico (Osterizer Pulsematic), se sometieron a cuatro extracciones independientes por maceración orgánica utilizando como solventes: hexano, diclorometano, etanol y metanol en relación 1:4 p/v.; así como dos extracciones acuosas: infusión y decocción.

2.2.1 Maceración.

Se llevaron a cabo 4 maceraciones de diferente polaridad, con los solventes hexano, diclorometano, etanol y metanol, a una proporción 1:4 p/v, las cuales fueron colocadas de manera independiente en frascos color ámbar durante 10 días, resguardados de la luz a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se filtró para posteriormente concentrar por evaporación del disolvente.

2.2.2 Infusión.

Se puso a hervir sobre una placa calefactora 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, se tomaron 10 g de las hojas pulverizadas de *C. urticifolia*, se adicionó al agua y se retiró del calor inmediatamente que se adicionó. Se dejó enfriar para posteriormente filtrar con papel filtro Whatman no. 2 y se colocó en refrigeración a 4°C, para su conservación.

2.2.3 Decocción.

Se colocó 10 g de las hojas pulverizadas de *Calea urticifolia* (Mill.) DC. en un matraz Erlenmeyer, se adicionó 100 mL de agua destilada, se dejó hervir durante 10 minutos sobre la placa calefactora, una vez transcurrido el tiempo, se retiró del calor, se dejó enfriar y se filtró con papel filtro Whatman no. 2. Una vez filtrado, se dispuso a refrigeración a 4°C.

2.3 Análisis fitoquímico preliminar cualitativo de los extractos.

Dicho análisis se llevó a cabo mediante reacciones de coloración y precipitación para detectar la presencia de: carbohidratos, flavonoides y compuestos relacionados, taninos, heterósidos antraquinónicos, saponinas, glucósidos cardiotónicos, heterosidos cianogenéticos, lactonas sesquiterpénicas y alcaloides.

Los métodos realizados para la identificación de cada uno de los grupos químicos se muestran en el **anexo 2**. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Preparación del material vegetal

El rendimiento de los extractos por cada 100 g de planta fueron 1.92 g para hexano, 2.42 g para diclorometano, 3.46 g en el caso del etanol y 8.84 g para metanol. La tabla 1 muestra el rendimiento y el número de metabolitos encontrados en cada uno de los solventes de extracción ordenados por polaridad creciente. Se observó un incremento en el rendimiento de extracción de acuerdo a la polaridad de los solventes utilizados, siendo mayor para el caso de los solventes polares y mucho menor para los no polares (metanol>etanol>diclorometano>hexano), indicativo de que *C. urticifolia* puede tener mayor cantidad de componentes polares.

Tabla 1. Rendimiento por 100 g de planta y número de metabolitos encontrados en cada uno de los solventes ordenados por polaridad creciente.

Solvente	Rendimiento (g)	Número de metabolitos detectados
Hexano	1.92	5
Diclorometano	2.42	4
Etanol	3.46	7
Metanol	8.84	7

3.2 Estudio fitoquímico preliminar

El estudio fitoquímico preliminar de las hojas de *C. urticifolia* mostró la presencia de grasas, carbohidratos, heterósidos cardiotónicos, taninos, alcaloides, triterpenos, flavonoides, saponinas y lactonas sesquiterpénicas. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados por extracto orgánico y acuoso del estudio fitoquímico preliminar de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill.) DC.

Metabolitos	*Orgánicos				**Acuosos	
	E	M	D	H	I	D
Lípidos	+	+	+	+		
Carbohidratos	+	+	+	+	++	++
Flavonoides	+	+	-	-	+	+
Flavonoles	-	-	-	+		
Flavonas	-	+	-	-		
Taninos	+	+	-	+	+	+
Catequinas	-	+/-	-	-	+	++
Triterpenos y saponinas triterpénicas	+	+	-	-		
Saponinas triterpénicas	+	-	+	+		
Heterósidos cardiotónicos	-	-	+	+		
Heterósidos con grupos metílicos libres	+	-	-	-		

Orgánicos: E = Etanol, M=Metanol, D=Diclorometano, H=Hexano

** Acuosos: I=Infusión, D= Decocción.

□ Indica pruebas no realizadas en esa polaridad **(+) Presencia (-) Ausencia**. El número de (+) mayor concentrado.

Tabla 3. Resultados de pruebas realizadas en extractos generales del estudio fitoquímico preliminar de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill.) DC.

Prueba	Resultado
Alcaloides	+
Heterósidos antraquinónicos	-
Saponinas	+
Heterósidos cianogénicos	-
Antocianinas (flavonoides)	+
Lactonas sesquiterpénicas	+

De acuerdo con los resultados obtenidos se han reportado diferentes tipos de metabolitos secundarios que presentan actividad antiinflamatoria mediante modelos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, por ejemplo, los terpenos y sus compuestos relacionados (tales como las saponinas triterpénicas) han mostrado disminución de la producción de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en monocitos estimulados con LPS con mecanismos que involucran un proceso inhibitorio de la activación de NF- κ B (Huang, *et al.*, 1988; Fujiwara, *et al.*, 1998; Changa, *et al.*, 1999; Thao & Lipsky, 2000; Silvester *et al.*, 2001; An, *et al.*, 2002; Brinker, *et al.*, 2007; Thuong, 2009). Algunas saponinas triterpénicas pentacíclicas inhiben la inducción de la producción de óxido nítrico al igual que disminuyen la producción de TNF- α en células microgliales estimuladas con LPS (Wu, *et al.*, 2007).

En relación con lo anterior los resultados mostrados en este estudio, se registró la presencia de los compuestos anteriormente citados en todos los extractos orgánicos evaluados (Tabla 1).

Los flavonoides son otro grupo de metabolitos secundarios que presentan actividad antiinflamatoria, algunos presentan una disminución en la activación de TNF- α

inducido y NF- κ B, así como inhibitorios de la producción de NO y expresión de iNOS (Gerritsen, *et al.*, 1995; Manna *et al.*, 1999; Xagorari, *et al.*, 2001). Estos flavonoides se encontraron presentes en los extractos etanólico y metanólico, siendo el extracto metanólico el que presenta flavonoides y flavonas.

Por otra parte, el estudio fitoquímico de *C. urticifolia* mostró la presencia de lípidos en todos los extractos orgánicos. Arita y colaboradores (2005) demostraron que particularmente los ácidos grasos esenciales omega-3 ayudan a suprimir la producción de compuestos inflamatorios; además se describe que algunos lípidos saturados e insaturados de más de 14 carbonos presentaron actividad antiinflamatoria en rata mediante inducción del proceso inflamatorio por carragenina (Pérez, *et al.*, 2013). Otros lípidos tales como ácido oleico, linoleico, linolénico y erúxico han mostrado ser inhibitorios de prostaglandinas y supresores de producción de IL-2 en modelos *in vitro* (Guarrera, 2005).

Los taninos poseen también una acción antiinflamatoria al inhibir las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β . (Vázquez, *et al.*, 1996; León, *et al.*, 1999; Habeeb *et al.*, 2007). Estos compuestos estuvieron presentes en casi todos los extractos, acuosos y orgánicos, excepto en el extracto obtenido con diclorometano.

Las lactonas sesquiterpénicas han sido evaluadas como antiinflamatorias, encontrándose el efecto debido a la inhibición del factor NF- κ B (Lyss, *et al.*, 1998; Orofino, *et al.*, 2012; Walshe-Roussel, *et al.*, 2013); la planta de estudio presentó estos compuestos en la prueba general llevada a cabo.

4. CONCLUSIONES

La planta *Calea urticifolia* (Mill.) DC. posee diferentes metabolitos, tales como: terpenos y compuestos relacionados, flavonoides, lípidos, taninos y lactonas sesquiterpénicas que sugiere que son los responsables de la actividad antiinflamatoria, por lo que es una especie potencial de estudio para reconocimiento de los compuestos causantes de dicho efecto.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA, American Diabetes Association and National Institute of Diabetes. Disponible en línea: <http://www.diabetes.org/>
- An S. J.; Pae, H.O.; Oh, G. S.; Choi, B. M.; Jeong S.; Jang S. I.; Oh, H.; Know, T. O.; Song, C. E.; Chung H. T. 2002. Inhibition of TNF-alpha, IL-1 beta, and IL-6 productions and NF-kappa B Activation in Lipopolysaccharide-Activated RAW 264.7 Macrophages by Catalposide, an Iridoid Glycoside Isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol* 2: 1173-1181.
- Arita, M.; Bianchini F., Alibeti J.; Sher A.; Chiang N.; Hong S.; Yang R.; Petasis N.A, Serhan C. N. 2005. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med* 201: 713-722.
- Bermúdez, A.; M.A. Oliveira M.; D. Velázquez. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. Ago 30 (008): 453-459.
- Bharat, B.; S. Aggarwal; S. Shishodia; K. Santo; M. K. Pandey; G. Senthil. 2006. Inflammation and cáncer: How is the link?'. *Biochem Pharmacol*, 72:1605-1621.
- Bermúdez, A., Oliveira Miranda, M. A., Velázquez, D., 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, agosto, Caracas, Venezuela. 30 (008): 453 – 459.
- Brinker A. M.; Ma J.; Lipsky P.E.; I. Raskin. 2007. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae) *Phytochemistry* 68: 732-766.
- Bohlmann, F. & Jakupovic, J. 1979. Neue germacranolide aus *Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 18:119-123.

- Borges del Castillo, J. (*et al.*) 1980. Salvadorian compounds. I. Calein D and 2,3-epoxycalin D, two germacranolides from *Calea urticifolia*. *Anales de Química. Serie C: Química Orgánica y Bioquímica* 77 (1): 90-92
- Borges del Castillo, J. (*et al.*) 1981. Salvadorian compositae. II. Juanislamin and 2,3-epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. *J. Nat. Prod.* 44(3): 348-350.
- Canales, M. M. (*et al.*).2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75: 21-43.
- Changa D. M.: S. Y. Kuob; J.H. Laib; M. L. Changb. 1999. Effects of anti-rheumatic herbalmedicines on cellular adhesion molecules. *Ann Rheum Dis* 58:366-371.
- Debabrata, M.; S. Nissen; E. Topol. 2001. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 22/29, 286:954-959.
- Domínguez, R. C. A. 2007. Adiponectina: el tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. *Rev. Endocrinol Nut* 15(3):149-155.
- Fujiwara A.; T. Mori; A. Lida; S. Ueda; Y. Hano; T. Nomura; H. Tokuda; H. Nishino 1998. Antitumor promoting naphthoquinones from *Catalpa ovata*. *J. Nat Prod* 61:629-632.
- Gamboa-Angulo, M. M.; J. Cristóbal-Aljo; I. L- Medina-Baizabal; F. Chi-romero; R.Méndez-González; P. Simá-Polanco; F. May-Pat. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatán Península, México. *World J Microbiol Biotechnol.*24: 1955-1959.
- Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, Perry CA. 1995. Flavonoids Inhibit Cytokine-induced Endothelial Cell Adhesion Protein Gene Expression. *Am J Pathol*147: 278 -292
- Guarrera PM. 2005. Tradicional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium) *Fitoterapia* 76:1

- Habeeb F, Stables G, Bradbury F, Nong S, Cameron P, Plevin R, Ferro VA. 2007. The inner gel component of *Aloe vera* suppresses bacterial-induced pro-inflammatory cytokines from human immune cells. *Methods* 42: 388 -393.
- Herz, W. & Kumar, N. 1980. Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *c. urticifolia*. *Phytochemistry* (19): 593-597.
- Hugués H., B., Rodríguez García., J. C., Rodríguez González, J. C., Marrero, R., M. T., 2002. Animales de 16 experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Cubana de Endocrinología*, 13(2): 163 – 172.
- Huang FC; Chang WK; Moriarty KJ, Zhang DC, Chang M; He W, Yu KT; Zilberstein A. 1988 Novel cytokine release inhibitors. Part I: triterpenes. *Biorg Med Chem Lett* 8:1883-1886.
- Guzmán, G. P. 2010. Exploración, aprovechamiento y validación experimental de plantas con efecto antiinflamatorio de la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P, México.
- INEGI (2010). Censo de población y vivienda. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
- Kim, H.P.; K. H. Son; H.W. Chang; S. S Kang. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol Sci*, 96:229-245.
- Krakof, J.; Funahashi, T.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G.; Tanaka, S.; Matsuzawa, Y.; Kobes, S.; Tataranni, P. A.; Hanson, R. L.; Knowler, W. C.; Lindsay, R. S. (2003). Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. *Diabetes Care*. 26: 1745 – 1751.
- León JE, Rosales VP, Rosales R, Pavón V. 1999. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante del ungüento rectal de *Aloe vera* L. (sábila). *Rev Cub Plant Med*: 106 -109.

- Lorach, C.; C. Chen; E. González; A. Hernández; Y. Rodríguez. 2007. Uso de plantas medicinales en adultos que acuden a una unidad de atención primaria de Panamá. Arch Med Fam Gen. 4(1):15-18.
- Lozano C., O., 2002. Adipocitoquinas. Revista de Endocrinología y Nutrición, 10(3): 147-150.
- Lyss G.; A. Knorre; TJ Schdmidt, HL Pahl; I. Merfort. 1998. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. J. Biol Chem. 273 (50): 33408-16.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. 1999. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. J Immunology 163: 6800-6809
- Martínez C. MJ.; Martínez L. MT.; Serrano R. M. 2003. Síndrome de resistencia a la insulina y síndrome metabólico: similitudes y diferencias. Síndrome metabólico: concepto, fisiopatología y epidemiología. Cardiovascular Risk Factors, 12 (2): 89-95.
- Matsuura, N.; M. Yamada; H. Suzuki; N. Hasegawa; C. Kurosaka; M. Ubukata; T. Tanaka; M. Linuma. 2005. Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 cells. Biosci Biotechnol Biochem 69(12): 2470-2474.
- Merino-Sánchez, C. 2011. Monografía de plantas antiinflamatorias de la etnia *xí'oi* de la región de La Palma, San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P, México
- Nakagawa, Y.; M. linuma; N. Matsuura; K. Yi., M. Naoi; T. Nakayama; Y. Nozawa; Y. Akao. 2005. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, aracanolate, in HL60 cells: a crucial roles of apoptosis-inducing factor. J.Pharmacol Sci. 97:242-252.

- Ohguchi, K.; M. Ito; K. Yokoyama; M. Iinuma; T. Itoh; Y. Nozawa; Y. Akao. 2009. Effects of sesquiterpene lactones on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. *Bio Pharm Bull.* Feb; 32 (2): 308-310.
- Orofino K., M.R.; S. Grootjans; M. W. Bianvatti; P. Vandenabeele; K. D'Herde. 2012 Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anti-Cancer Drugs* Pp. 1-14.
- Pérez G., S.; M. A. Zavala S.; M. M. González C.; N. C. Cárdenas O.; M. A. Ramos L. 2011. Bioactivity of *Carica papaya* (Caricaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecules* 16: 7502-7509.
- Silvester J, Liacini A, Li W, Dehnade F, Zafarullah M. 2001. *Tripterygium wilfordii* Hook F extract suppresses proinflammatory cytokine-induced expression of Matrix metalloproteinase genes in articular chondrocytes by inhibiting activating protein-1 and nuclear factor-kB activities. *Mol Pharmacol* 59: 1196 -1205
- Tao X, Lipsky PE. 2000. The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook.f. *Rheum Dis Clin North Am* 26: 29 -50.
- Téllez M., J. 2005. Adiponectina y disfunción endotelial. *Rev. Salud Pub. Nut.* Edición especial N° 16. Disponible en línea: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-16-2005/documentos/12.html>
- Thuong PT, Dao TT, Pham THM, Nguyen PH, Le TVT, Lee KY, Oh WK. 2009. Crotonkinensins A and B, diterpenoids from the vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis*. *J Nat Prod* 72: 2040-2042.
- Umemura, K.; T. Itoh; N. Hamada; Y. Fujita; Y. Akao; Y. Nozawa; N. Matsuura; M. Iinuma; M. Ito. 2008. Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H₂O₂-induced Nrf2/ARE activation. *Biochem Biophys Res Comm.* 368:948-954.

- UNAM. 2009. Interculturalidad en salud, experiencia y aportes para el fortalecimiento de los servicios de salud. UNAM, Dirección General de Proveeduría (Eds.)7
- Vázquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. 1996. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *J Ethnopharmacol*55: 69-77
- Walshe R., B.; C. Choueiri; A. Saleem; M. Asim; F. Caal; V. Cal; M. Otarola R.; T. Pesek; T. Durst; J. Thor A. 2013 Potent anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass, a Q'eqchi' Maya traditional medicine. *Phytochemistry* 92: 122-127.
- Wu CF, Bi XL, Yang JY, Zhan JY, Dong YX, Wang JH, Wang JM, Zhang R, Li X. 2007. Differential effects of ginsenosides on NO and TNF-production by LPS-activated N9 microglia. *Int Immunopharmacol* 7: 313 -320.
- Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. 2001. Luteolin inhibits and endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*296: 181 -187.
- Yamada, M.; Matsuura, N.; Susuki, H. ; Kurosaka, C.; Hasegawa, N.; Ubukata, M.; Tanaka, T.; Linuma, M. 2004. Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 65:3107-3111.

5.2 EXPERIMENTO 2.

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES ORGÁNICAS DE *Calea urticifolia* (MILL.) DC.

RESUMEN

El presente trabajo valoró el efecto antiinflamatorio *in vitro* de *Calea urticifolia* (Mill.) DC en fracciones orgánicas derivadas del extracto etanólico obtenido por maceración, y de los extractos orgánicos, por percolación hasta agotamiento (hexano, diclorometano y etanol) e infusión, a través de la determinación de la secreción de TNF- α por ELISA. Los resultados mostraron que las fracciones derivadas del extracto etanólico presentan efecto antiinflamatorio de manera dosis-dependiente. Por otra parte, de las fracciones obtenidas por percolación, dos fracciones orgánicas del extracto hexánico (9 y 10) y dos fracciones del extracto obtenido con diclorometano (8 y 9) muestran plausibilidad biológica en relación al efecto antiinflamatorio del fármaco prototipo Indometacina al presentar se una inhibición de TNF- α .

Tales resultados demuestran la capacidad antiinflamatoria de la especie a diferente grado de polaridad de extracción de sus componentes químicos, por consecuencia facilitará la identificación y caracterización de los compuestos activos.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas por los grupos étnicos como una práctica terapéutica ancestral, siendo en México un recurso de uso terapéutico por excelencia. En la actualidad, la medicina tradicional representa un sistema complementario dentro de los programas de salud, de tal manera que se permite asociar este conocimiento tradicional con el científico, siendo importante para la interculturalidad en salud y poniéndose en contexto la conservación de la biodiversidad de los recursos naturales (Canales, 2006).

Calea urticifolia (Mill) DC., pertenece a la familia *Asteraceae* y dicha especie vegetal ha sido valorada experimentalmente, comprobándose su actividad antifúngica (Gamboa-Angulo *et al.*, 2005), inhibitoria de la diferenciación preadipocitaria (Matsuura, *et al.*, 2005), citotóxica en células de cáncer de colon y sanguíneas (Yamada *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005; Ohguchi *et al.*, 2009), contra úlcera gástrica y bactericida (Umemura *et al.*, 2008) y la capacidad antiinflamatoria aguda y crónica de bajo grado (Guzmán, *et al.*, 2010).

El proceso inflamatorio se caracteriza por ser una respuesta del sistema inmunológico de un organismo ante el daño ocasionado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor cuya naturaleza sea biológica, química física o mecánica (García, 2008). La consecuencia de su estimulación dependiendo del tipo de inflamación (aguda o crónica), se inicia con efectos sobre el flujo sanguíneo incrementándolo, así como permeabilidad vascular, acumulación de fluido, leucocitos y mediadores inflamatorios como las citocinas, que en el trascurso del padecimiento crónico se deriva a una respuesta inmune humoral y celular (Feghali & Wright, 1997).

El reconocimiento del antígeno, inicia la respuesta inflamatoria, lo que permite la generación de células mononucleares (neutrófilos, macrófagos y células natural killer (NK)). Los macrófagos se caracterizan, una vez que se activa el antígeno, por presentar una gran capacidad fagocítica y por ser generadores de citocinas proinflamatorias como Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1- β (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6) (Kenneth & Jamali, 2005).

Las citocinas proinflamatorias son péptidos que presentan funciones mediadoras con actividad fisiológica y que son producidas por casi todas las células de nuestro organismo (Tilg *et al.*, 2006) TNF- α es la primera citocina en liberarse tras el reto impuesto (González, *et al.*, 2012). TNF- α es producida principalmente por macrófagos y puede activar monocitos, macrófagos y neutrófilos, así como inducir producción de proteínas de fase aguda por intermedio de la IL-6 (González, *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación es valorar la capacidad antiinflamatoria de las fracciones orgánicas tanto del extracto etanólico y de la percolación de la planta completa a diferentes grados de polaridad, con la finalidad de identificar los posibles extractos y/o fracciones potenciales que puedan dirigir la identificación y caracterización química de los agentes bioactivos de la especie mediante bioensayos basados en la inhibición del proceso inflamatorio (TNF- α) en células mononucleares humanas estimuladas con lipopolisacárido (LPS).

2. METODOLOGÍA

2.1 Recolección del material vegetal

C. urticifolia se recolectó en la comunidad de Potrero del Carnero en el municipio de Rayón de San Luis Potosí, teniéndose dos puntos de muestreo, en sus alrededores a 21°52'29.8" N y 099°27'08.4" W a 903 msnm y dentro de ella a 21°52'27.6"N y 099°27'00.6"W a 901 m de altitud, Anexo 1.

2.2 Preparación del material vegetal

Una vez obtenido el material vegetal se colocó en papel absorbente por un periodo de 48 h para separar las hojas de la planta; posteriormente, éstas se secaron durante 15 días al abrigo de la luz a una temperatura de 22°C.

2.3 Preparación de extractos

2.3.1 Extracto etanólico

Se fraccionó la planta y se seleccionaron las hojas de acuerdo a su apariencia, siendo pulverizadas de manera independiente, en un molino eléctrico (Osterizer Pulsematic); se sometió 100 g de planta a una extracción por maceración orgánica utilizando etanol absoluto como solvente en relación 1:4 p/v, por un período de 10 días con agitación periódica. Una vez transcurrido el periodo señalado, se filtró en cápsulas de porcelana, las cuales fueron llevadas a peso constante, y se eliminó

el solvente a temperatura ambiente. El concentrado del extracto se guardó en tubos eppendorff estériles al abrigo de la luz a 4°C.

2.3.1.1 Preparación de las fracciones químicas del extracto etanólico

Preparación del extracto para la separación

Se disolvió el extracto etanólico en la menor cantidad posible de su fase de extracción, se adicionó la menor cantidad de sílice para que se adsorbiera y se llevó al rotavapor (BÜCHI RE 111) a 30°C con agitación hasta sequedad, obteniéndose el polvo del extracto original.

Preparación y corrimiento de la columna cromatográfica

En una columna de percolación se adicionó sílice con ayuda de una mezcla de hexano-acetato de etilo al 3%, compactando con una bomba de presión con la finalidad de preparar la columna cromatográfica. Una vez hecho lo anterior, se pasó sucesivamente la mezcla inicial de solvente para empacar correctamente la columna y se adicionó el polvo obtenido del extracto.

El corrimiento de la columna se inició incorporando como fase móvil diferentes solventes de polaridad ascendente de hexano-acetato de etilo al 3%, hexano-acetato de etilo al 10%, hexano-acetato de etilo al 30%, hexano-acetato de etilo al 50%, acetato de etilo y etanol, de manera independiente sobre la columna con el objetivo de obtener las fracciones.

Las fracciones se recolectaron en diferentes matraces y se llevó a cabo cromatografía en capa fina de cada una, para agrupar aquellas fracciones que tenían los mismos compuestos.

Concentración y secado de las fracciones

La concentración de las fracciones se llevó a cabo a través de un rotavapor (BÜCHI RE 111) a una temperatura de 40°C, hasta un volumen aproximado de 1 mL para posteriormente trasvasar a los viales, los cuales fueron sometidos al

proceso de secado para eliminar los residuos de solvente con ayuda de una estufa de vacío (Vaccum Drying Oven PROLAB DZF-6030A), durante 4 horas.

2.3.2 Preparación de los extractos por percolación

El material vegetal seco fue triturado en un molino eléctrico (Osterizer Pulsematic) y se pesó 100 g de planta molida, la cual se colocó en una columna de percolación de 6 cm de diámetro.

A la columna se le adicionó fase móvil de diferente polaridad de manera independiente, pasando inicialmente 1 L de hexano (Merck), se dejó macerar durante 12 horas para recuperar el macerado y realizar un lavado con el solvente, este procedimiento se repitió por segunda ocasión, una vez que se enjuagó, se dejó salir hasta agotamiento el hexano para ahora introducir en la columna diclorometano y una vez transcurrido el procedimiento anterior, se introdujo a esta columna etanol, finalmente, tras agotar el etanol al segundo día, (técnica por agotamiento); con un periodo de secado entre recambio de solvente. El residuo final de planta obtenido tras el paso de los tres solventes fue sometido a una extracción acuosa en 1L de agua mediante infusión. Los extractos orgánicos obtenidos fueron concentrados mediante destilación a presión reducida, se dejó evaporar el solvente y posteriormente se secaron en una estufa al vacío durante 4 horas a 40 °C reducida (Vaccum Drying Oven PROLAB DZF-6030A) para eliminar los respectivos residuos de solventes. El extracto etanólico fue sometido a un proceso de liofilización tras su proceso de secado, la infusión se almacenó a -20°C tomándose previamente una alícuota de 3 mL, la cual fue sometida a un proceso de liofilización.

2.3.2.1 Fraccionamiento de los extractos obtenidos por percolación

Preparación del extracto para la separación

Se disolvieron 3.1 g de extracto hexánico en la menor cantidad de acetona y 2.1 g de extracto diclorometánico en la menor cantidad de etanol, se le adicionó la menor

cantidad de sílice para que se adsorbiera y se llevó al rotavapor a 30°C con agitación hasta sequedad, obteniéndose el polvo del extracto original.

La cantidad de extracto sometida al fraccionamiento dependió del rendimiento de cada uno de los extractos.

Preparación y corrimiento de la columna cromatográfica

Se preparó una columna cromatográfica utilizando una columna de percolación de 6 cm de diámetro, se le adicionó sílice con ayuda de una bomba de presión. Una vez hecho lo anterior, se pasó sucesivamente la mezcla inicial de solvente para empacar correctamente la columna y se incorporó el polvo obtenido del extracto. Posteriormente se dejó fluir la fase móvil de solventes puros y mezclas de ellos de polaridad ascendente hexano 100%, hexano-acetato de etilo al 5%, hexano-acetato de etilo al 10%, hexano-acetato de etilo al 20%, hexano-acetato de etilo 30%, hexano-acetato de etilo 40%, hexano-acetato de etilo 50%, acetato de etilo 100%, etanol 100%.

Las fracciones se recolectaron en diferentes matraces y se llevó a cabo cromatografía en capa fina de cada una con la finalidad de agrupar aquellas que tenían los mismos compuestos; la polaridad de la fase móvil, fue cambiándose dependiendo de cada fracción.

Concentración y secado de las fracciones

Se llevó a cabo la concentración de las fracciones obtenidas con la ayuda de un rotavapor (BÜCHI RE 111) a una temperatura de 40°C, hasta un volumen aproximado de 1 mL, posteriormente se trasvasó a los viales correspondientes. El proceso de secado se realizó a través de una estufa de vacío (Vaccum Drying Oven PROLAB DZF-6030A) a una temperatura de 40 °C, durante 4 horas.

2.4 Bioensayo del efecto antiinflamatorio

2.4.1 Obtención de células mononucleares

Se utilizó cultivos de células mononucleares humanas de cinco individuos sanos. Se les extrajo mediante punción venosa 30 mL de sangre periférica, utilizando heparina como anticoagulante. La sangre se estratificó en Lymphoprep TM cuidadosamente bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar clase II (LABCONCO®) en una proporción 1:2 con respecto a la sangre, se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 20 min, para posteriormente remover la monocapa de células mononucleares, la cual se transfirió a un tubo con 2 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) para centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó por decantación el medio y se dejó el botón de células para resuspenderlo en 1 mL de medio RPMI-1640 (Gibco).

Se determinó la viabilidad de células mediante el método de exclusión con azul de tripano, el cual tiñe solamente las células no viables; para lo que se tomó 970 μ L de PBS 1X, con 10 μ L de azul de tripano al 0.4 % , 20 μ L de la dilución se colocó en una cámara de Neubauer y se realizó la cuenta celular. Una vez obtenido el número de células viables se ajustó a 1×10^6 células/mL. Con dicha suspensión celular se realizaron los cultivos celulares que se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% en placas de fondo plano de 24 pozos (Nunc) durante 24 horas con los diferentes tratamientos (Arredondo, 2008).

2.4.2 Agente inflamatorio *in vitro*

Se empleó lipopolisacárido (LPS Sigma-Aldrich® L4516) el cual induce la transcripción de una serie de genes involucrados en reacciones inflamatorias por activación de una gran cantidad de factores de transcripción, particularmente del factor de transcripción NF- κ B y que a su vez activa la síntesis de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Dobrovolskaia & Vogue, 2002).

Para determinar la capacidad inflamatoria del LPS, a través de la concentración de TNF- α , se determinó una curva dependiente de la concentración (0, 10, 100, 1000,

10000 ng/mL) en células mononucleares humanas por el método de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a una longitud de onda 405 nm (Multiskan Ascent).

2.4.3 Tratamientos

Se evaluaron 9 fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de 4 extractos de diferente polaridad (hexano, diclorometano, etanol y agua), y adicionalmente se determinó el efecto antiinflamatorio de las 12 fracciones obtenidas del extracto hexánico y 11 fracciones obtenidas del extracto de diclorometano.

Para la evaluación de las 9 fracciones, así como de los 4 extractos de diferente polaridad, se utilizaron cuatro concentraciones diferentes de fracción/extracto disueltos en dimetilsulfóxido al 1% (DMSO 1%) a una máxima concentración de 1%, que fueron: 88, 8.8, 0.88 y 0.088 µg/mL, control de células sin estímulo, control de LPS (1 µg/mL), control de indometacina (5 µg/mL) la cual va actuar inhibiendo a las enzimas ciclooxigenas 1 y 2 (COX1 y COX2) y que son responsables de la síntesis de prostaglandinas, control DMSO 1%. Cabe destacar que para la evaluación de las 12 fracciones del extracto hexánico y de las 11 fracciones del extracto diclorometánico sólo se probaron las dosis de 88 y 8.8 µg/mL, los controles fueron los mismos.

Todos los pozos, excepto el control de células y el control de DMSO 1% fueron estimulados con LPS (Sigma-Aldrich ®) en una concentración de 1 µg/mL. El control de DMSO fue utilizado a esta concentración debido a que las fracciones fueron disueltas en este disolvente.

Se adicionaron 100 µL de cada una de las concentraciones a los pozos de cultivo en condiciones de esterilidad (para lo cual se pasó por una membrana de 0.22 µm de poro). Una vez colocados los tratamientos, se procedió a incubar durante 24 hrs, transcurrido este tiempo, se pasó la totalidad del cultivo en tubos eppendorf para centrifugar posteriormente a 1500 rpm durante 15 min y obtener el sobrenadante, para su posterior congelación a -20°C hasta su análisis.

2.5 Evaluación de la secreción de la citocina pro-inflamatoria: TNF- α

Para la determinación de TNF- α , se determinó a través de la técnica de ELISA para el cual se siguió el siguiente procedimiento: se cubrió la microplaca de 96 pozos (Nunc) con 100 μ L el anticuerpo primario o de captura purificado (1-5 μ g/mL- Peprotech) en solución de unión (suero fetal bovino al 10% Gibco BRL) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al terminar este periodo de incubación, se lavó la placa con PBS/Tween (Sigma-Aldrich ®) y se adicionó 200 μ L de solución bloqueadora (suero fetal bovino al 10% Gibco BRL) incubando a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez transcurrido dicho tiempo, se lavó nuevamente la placa con PBS/Tween (Sigma-Aldrich ®) y se añadió 50 μ L de sobrenadante o de estándar de proteína por pozo (Peprotech) y se incubó a 4°C toda la noche. Transcurrido el tiempo, se lavaron las placas con PBS/Tween, se agregó 100 μ L de anticuerpo secundario o de detección (0.5-2 μ g/mL- Peprotech) que se disolvió en solución bloqueadora a cada pozo, se cubrió la placa e incubó a temperatura ambiente por 2 hrs. Se lavó las placas con PBS/Tween (Sigma-Aldrich ®) trascurrido este tiempo y se añadió 100 μ L de avidina-peroxidasa (5 μ g/mL) incubando por 30 min a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, se agregó 100 μ L de ABTS (2-2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6 ácido sulfónico)/H₂O₂ por pozo, inmediatamente después de agregar el sustrato, se determinó la densidad óptica mediante un lector de microplacas para ELISA (Multiskan Ascent), a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados se compararon contra una curva patrón para la determinación de la concentración de la citocina presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se llevó acabo 3 experimentos independientes con 3 repeticiones por tratamiento.

2.6 Análisis de resultados

Con los datos obtenidos de concentración de TNF- α se llevó a cabo un análisis de normalidad, de varianza y un posterior análisis *post hoc* de comparación de medias

de Tukey, considerando como valor de significancia un $p < 0.05$ con el paquete estadístico SAS.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Preparación de extractos

El rendimiento de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de las fracciones del extracto etanólico obtenido por maceración.

No. de fracción	Solventes con la que fue obtenida	Rendimiento (mg)
1	Hexano-acetato de etilo 3%	40.5
2	Hexano-acetato de etilo 3%	11.1
3	Hexano-acetato de etilo 10%	133.6
4	Hexano-acetato de etilo 10%	179.6
5	Hexano-acetato de etilo 10% + hexano-acetato de etilo 30%	290.5
6	Hexano-acetato de etilo 30%	204.2
7	Hexano acetato de etilo 30% + Hexano-acetato de etilo 50%	181.7
8	Acetato de etilo 100%	43.5
9	Etanol 100%	769.0

De los 100 g de planta sometidos a una percolación por agotamiento, se obtuvo el siguiente rendimiento: 3.6 g para el extracto hexánico, 2.46 g para el extracto obtenido con diclorometano y 25.9 g para el extracto acuoso liofilizado.

Del extracto hexánico se obtuvo un total de 12 fracciones (Tabla 2). Puede observarse cómo el rendimiento de las fracciones obtenidas tanto para el extracto

obtenido con hexano y diclorometano es mayor cantidad en las polaridades hexano-acetato de etilo 5%, así como en las polaridades correspondientes a hexano-acetato de etilo 30%, 40%,50% y acetato de etilo al 100%.

Tabla 2. Rendimiento de las fracciones del extracto hexánico obtenido mediante percolación.

No. de fracción	Solventes con la que fue obtenida	Rendimiento (mg)
1	Hexano 100%	83.3
2	Hexano 100% y Hexano-acetato de etilo 5%	63.2
3	Hexano-acetato de etilo 5% + Hexano-acetato de etilo 10%	1204.2
4	Hexano-acetato de etilo 10% + Hexano-acetato de etilo 20%	163.5
5	Hexano-acetato de etilo 20%	35.4
6	Hexano-acetato de etilo 30%	34.7
7	Hexano-acetato de etilo 30%	83.0
8	Hexano-acetato de etilo 30%	98.4
9	Hexano acetato de etilo 30% + Hexano acetato de etilo40%	367.8
10	Hexano acetato de etilo 50% + Acetato de etilo 100% + Etanol 100%	361.7
11	Etanol 100%	7.5
12	Etanol 100%	29.2

Del extracto obtenido con diclorometano, se obtuvieron un total de 11 fracciones, cuyo rendimiento y solventes con las que fue obtenida cada una de ellas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento de las fracciones del extracto obtenido con diclorometano por percolación.

No. de fracción	Solventes con la que fue obtenida	Rendimiento (mg)
1	Hexano 100%	17.6
2	Hexano 100% + Hexano-acetato de etilo 5%	3.6
3	Hexano-acetato de etilo 5%	146.1
4	Hexano-acetato de etilo 5%	34.6
5	Hexano-acetato de etilo 5% + Hexano-acetato de etilo 10%+ Hexano-acetato de etilo 20%	86.9
6	Hexano-acetato de etilo 20% + Hexano-acetato de etilo 30%	189.9
7	Hexano acetato de etilo 30%	30.1
8	Hexano acetato de etilo 30% + Hexano-acetato de etilo 40%	302.6
9	Hexano acetato de etilo 40% + Hexano acetato de etilo 50% + Hexano-acetato de etilo 70% +Acetato de etilo 100%	662.0
10	Acetato de etilo 100% + Etanol 100%	270.2
11	Etanol 100%	72.3

3.2 Determinación de la concentración de TNF- α del agente inflamatorio *in vitro*

De acuerdo con los resultados de la evaluación concentración dependiente del proceso inflamatorio del LPS, se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el control de células no estimuladas, mostrando un incremento de la concentración de TNF- α de 1937 pg/mL, representando un 100% de estimulación, por otra parte no se observó diferencias significativas entre las diferentes concentraciones evaluadas (Figura 1), lo que sugiere que podría estar

activando el LPS a nivel ligando-receptor (Marina, *et al.*, 2008). Por lo anterior se seleccionó la concentración de 1µg/mL como referencia (Weinstein *et al.* 1991; Treviño, *et al.*, 2011) para continuar el bioensayo de los extractos y fracciones de la especie vegetal.

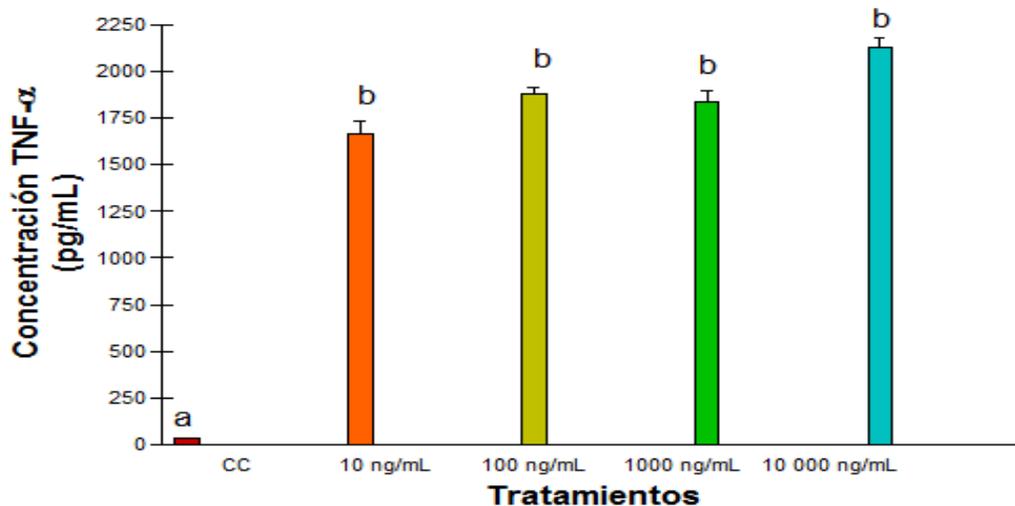


Figura 1. Secreción de TNF- α tras estimulación con LPS. Las barras representan la media \pm SE ($p < 0.05$). Las letras indican diferencia significativa entre los grupos de tratamientos. CC=Control de células no estimuladas.

3.3 Determinación de la concentración de TNF- α *in vitro* de los diferentes tratamientos

3.3.1 Fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico

Las 9 fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico presentaron efecto inhibitorio de TNF- α dosis dependiente respecto al grupo de células tratadas con LPS ($p < 0.05$), siendo esta inhibición estadísticamente igual a la presentada por el grupo de células tratada con indometacina fármaco prototipo. En las nueve fracciones obtenidas pudo observarse que la tendencia general del efecto inhibitorio de TNF- α fue el siguiente: a dosis de 88 µg/mL se presentó un efecto inhibitorio mayor (50%) que el inducido con la dosis de 0.088 µg/mL (Figura 2).

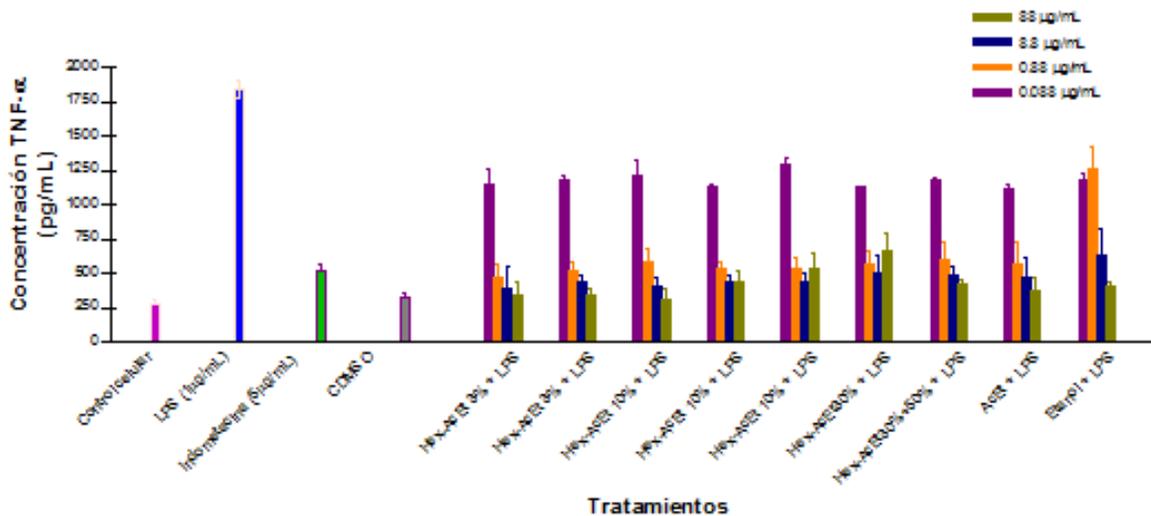


Figura 2. Secreción de TNF- α con los tratamientos de las fracciones del extracto etanólico. Las barras representan la media \pm SE ($p < 0.05$). Las letras minúsculas indican diferencia significativa entre los grupos de tratamientos. LPS=Lipopolisacárido, CDMSO=Control DMSO 1%, Hex=Hexano, AcEt=Acetato de etilo.

La inhibición de TNF- α de las nueve fracciones en las dosis de 0.088, 0.88, 8.8 y 88 μ g/mL fue estadísticamente igual a la presentada por la indometacina lo que sugiere que dicho efecto es independiente del solvente con el que fue extraída cada una de las fracciones a pesar de la afinidad que cada solvente tiene hacia cierto tipo de compuestos químicos contenidos en la planta.

3.3.2 Extractos obtenidos por percolación.

Con respecto a la evaluación biológica de los extractos de polaridad diferente obtenidos por percolación, los extractos obtenidos con hexano, diclorometano y etanol presentaron una inhibición significativa de la secreción de TNF- α con respecto al grupo de células tratadas con LPS, sin ser diferentes entre ellos y siendo estadísticamente iguales al grupo de células tratadas con indometacina ($p < 0.05$) Figura 3.

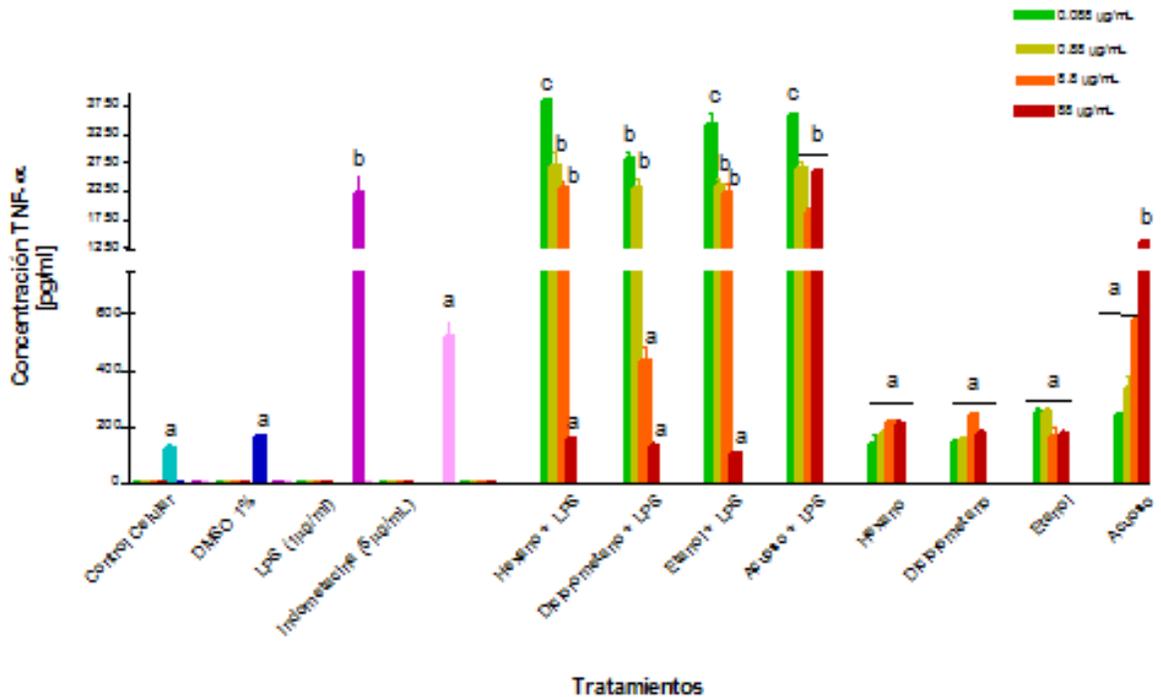


Figura 3. Secreción de TNF- α con los tratamientos de los extractos obtenidos por percolación. Los barras representan las media \pm SE ($p < 0.05$). Las letras minúsculas indican diferencia significativa entre los grupos de tratamientos. DMSO 1%=Dimetilsulfóxido 1%, LPS=Lipopolisacárido.

Las células tratadas con los extractos obtenidos con hexano y diclorometano no presentaron diferencia significativa entre sí en su efecto inhibitorio de TNF- α , pero si presentaron una inhibición en comparación con el grupo tratado con LPS, siendo estadísticamente igual al grupo tratado con indometacina en su dosis de 0.088 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto hexánico; y en las dosis de 0.088 $\mu\text{g/mL}$ y 0.88 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de diclorometano ($p < 0.05$).

La evaluación del efecto inhibitorio de TNF- α en los extractos obtenidas mediante percolación arrojó nuevamente que la planta posee un efecto inhibitorio, las dosis y fracciones que tuvieron un efecto estadísticamente igual al del control celular, control de DMSO 1% y control indometacina, fueron las dosis de 88 $\mu\text{g/mL}$, 8.8 $\mu\text{g/mL}$ y 0.88 $\mu\text{g/mL}$ del extracto hexánico; y las dosis de 88 $\mu\text{g/mL}$ y 8.8 $\mu\text{g/mL}$ del

extracto diclorometánico. La dosis de 88 µg/mL del extracto acuoso liofilizado no mostró efecto en la inhibición de producción de TNF-α.

El extracto hexánico mostró en la mayoría de las dosis evaluadas efecto inhibitorio de TNF-α, lo cual podría deberse a la presencia de flavonoles, lípidos, lactonas sesquiterpénicas, saponinas triterpénicas y taninos encontrados en el estudio fitoquímico preliminar (Experimento 1).

Debido a esto se decidió fraccionar a ambos extractos para llevar a cabo nuevamente la evaluación biológica de cada una de las fracciones obtenidas.

3.3.3 Fraccionamiento de los extractos hexánico y diclorometano obtenidos mediante percolación.

Debido a que se obtuvo una mayor cantidad de dosis activas en los extractos obtenidos con hexano y diclorometano, estos fueron sometidos a un fraccionamiento, que fue nuevamente probado en su actividad antiinflamatoria, en este experimento fueron probadas sólo las dosis de 88 µg/mL y 8.8 µg/mL en las 12 fracciones obtenidas con el hexano y en las 11 fracciones obtenidas con el diclorometano (Tabla 2 y 3; Figuras 4 y 5).

Puede observarse que las polaridades correspondientes a hexano-acetato de etilo 30%, 40%, 50% y acetato de etilo al 100% presentaron un efecto inhibitorio mayor que las fracciones obtenidas a otras polaridades ($p < 0.05$), infiriendo en base a esto que se obtiene una mayor cantidad de metabolitos y que el efecto antiinflamatorio pudiera deberse a la acción sinérgica de los componentes presentes en dichas fracciones o a que el metabolito más activo se encuentre en mayor cantidad.

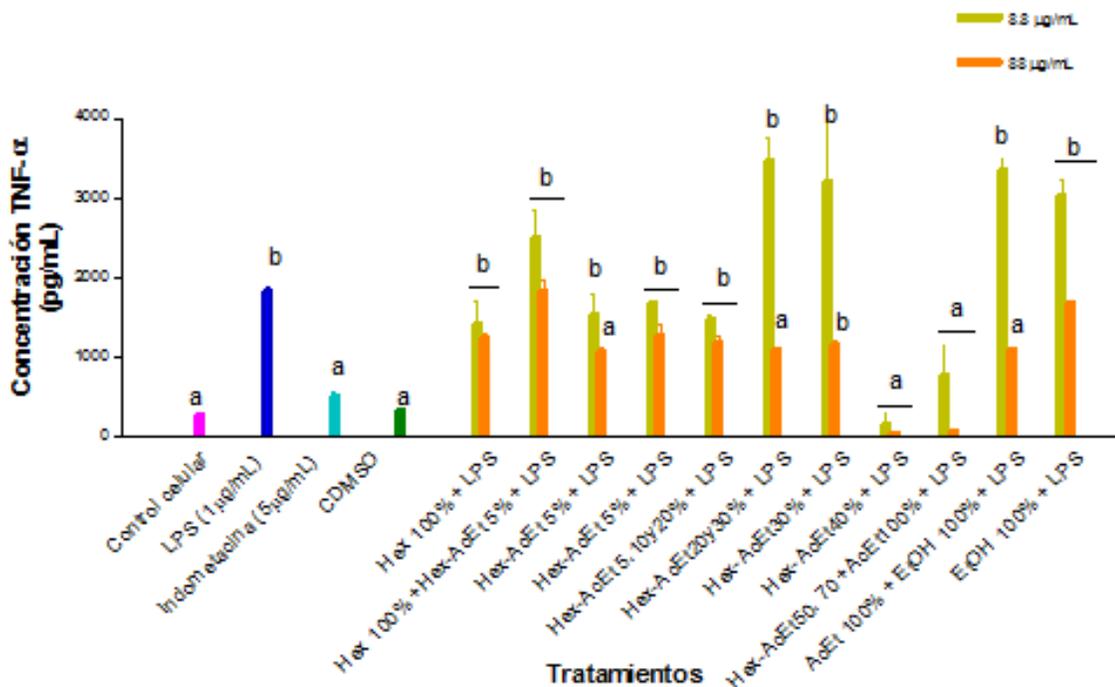


Figura 5. Secreción de TNF- α con los tratamientos correspondientes a las fracciones del extracto diclorometánico obtenidos por percolación. Las barras representan las medias \pm SE ($p < 0.05$). Las letras minúsculas indican diferencia significativa entre los grupos de tratamientos. DMSO 1%=Dimetilsulfóxido 1%, LPS=Lipopolisacárido.

La dosis de 88 μ g/mL de las fracciones 3, 6, 8, 9 y 10 del extracto obtenido mediante percolación con diclorometano (Tabla 3), así como la dosis de 8.8 μ g/mL de las fracciones 8 y 9 (Tabla 3) tuvieron un efecto inhibitorio estadísticamente igual al control antiinflamatorio (indometacina) ($p < 0.05$) y que numéricamente tuvieron una mayor inhibición de TNF- α .

La indometacina es un antiinflamatorio no esteroideo inhibitorio no selectivo de la COX (DrugBank), lo que puede sugerir que el mecanismo de acción de las fracciones de *C. urticifolia* pueda ser similar, debido a que activa el factor de transcripción NF- κ B y por lo tanto la producción de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α (Castro, *et al.*, 2009).

El efecto de la indometacina se ve en una dosis de 5 ug/mL, la cual es 56 veces mayor a la dosis más baja utilizada con la planta y que tiene el mismo efecto, por lo que se podría decir que esta planta tiene un efecto más potente en relación a la indometacina.

Dentro de las propiedades que han sido evaluadas en *C. urticifolia* destaca su actividad antioxidante, debido a la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Umemura, *et al.*, 2008) relacionado con la activación de la vía Nrf2/ARE, la cual está relacionada con procesos de índole inflamatorio (Pan, *et al.*, 2011) ya que existe una relación en la influencia de Nrf2 y la activación de NFκ-B y expresión de citocinas proinflamatorias, teniendo así que los mecanismos de respuesta al estrés Nrf2/ARE juegan un rol como punto control en el estrés oxidativo inducido en disfunciones celulares que incluyen la inflamación (Singh, 2010), lo anterior sugiere que el proceso antiinflamatorio de la planta pudiera estar asociado con lo anterior y de esta manera inhibir la producción de citocinas proinflamatorias.

4. CONCLUSIONES

Las dosis de 0.088, 0.88, 8.8 y 88 µg/mL de las 9 fracciones obtenidas del extracto etanólico macerado presentaron un efecto inhibitorio de la producción de TNF-α.

Las dosis de 0.088, 0.88, 8.8 y 88 µg/mL del extracto hexánico, así como las dosis de 8.8 y 88 µg/mL del extracto diclorometánico tuvieron un efecto inhibitorio de TNF-α comparado con el grupo de células tratadas con LPS, siendo dicho efecto igual al presentado con indometacina fármaco prototipo antiinflamatorio.

Del fraccionamiento del extracto hexánico la dosis de 88 µg/mL de las fracciones 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 10, y la dosis de 8.8 µg/mL de las fracciones 5, 9 y 10 presentaron un efecto inhibitorio de TNF-α igual al presentado por la indometacina siendo este efecto mayor que dicho control en las fracciones 9 y 10 de este extracto.

La dosis de 88 µg/mL de las fracciones 3, 6, 8, 9 y 10 del extracto obtenido mediante percolación con diclorometano, así como la dosis de 8.8 µg/mL de las fracciones 8 y 9 tuvieron un efecto inhibitorio estadísticamente igual al control antiinflamatorio (indometacina) ($p < 0.05$) y que numéricamente tuvieron una mayor inhibición de TNF.

De lo anterior, se proponen las fracciones 8 y 9 del extracto obtenido por percolación con diclorometano, así como 9 y 10 del extracto obtenido por percolación con hexano para su caracterización química y posterior purificación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arredondo Z., D. 2008. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Heliopsis longipes* S.F. Blake. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Químico Farmacobiólogo. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P., México.
- Canales, M. M. (*et al.*).2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75: 21-43.
- Castro, P.; H. Nasser; A. Abrahão; L. Cardilo dos Reis; I. Riça; S. S. Valença; D. C. Rezende; L.E. M. Quintas; M. C. Marinho C.; L. C. Porto; V. L. G. Koatz. 2009 Aspirin and indomethacin reduce lung inflammation of mice exposed to cigarette smoke. *Biochemical Pharmacology*. (77) 6:1029-1039.
- Dobrovolskaia, M. A.; S. N. Vogue. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and infection*. 4(9): 903-914
- Drug Bank. Open Data Drug & Drug Target Database. Consultado en diciembre 2013. última actualización febrero 2013. Disponible en línea: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00328>

- Feghali CA, Wright TM. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2:12–26.
- Gamboa-Angulo, M. M.; J. Cristóbla-Aljo; I. L- Medina-Baizabal; F. Chi-romero; R.Méndez-González; P. Simá-Polanco; F. May-Pat. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatán Península, México. *World J Microbiol Biotechnol.*24: 1955-1959.
- García, B., P.; 2008 Inflamación. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís Nat. (Esp)* 102 (1): 91-159
- González A., R.; Z. Zamora R.; Y. Alonso. S/A Citocinas inflamatorias, sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico.
- Guzmán, G. P. 2010. Exploración, aprovechamiento y validación experimental de plantas con efecto antiinflamatorio de la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P, México.
- Kenneth, M.; F. Jamali. 2005. Drug disease interactions: role of inflammatory mediators in disease and variability in drug response. *J. Pharm Pharmaceut Sci.* 8:602-625.
- Marina, A. F.; S. Tchapchet; S. Keck; G. Fejer; M. Huber; N. Schütze, B. Beutler; C. Galanos. 2008. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: Benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology.* 213(3-4):193-203.
- Matsuura, N.; M. Yamada; H. Suzuki; N. Hasegawa; C. Kurosaka; M. Ubukata; T. Tanaka; M. Linuma. 2005. Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(12): 2470-2474.
- Nakagawa, Y.; M. linuma; N. Matsuura; K. Yi., M. Naoi; T. Nakayama; Y. Nozawa; Y. Akao. 2005. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene

lactone, arcanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol Sci.* 97:242-252.

- Pan, H.; H. Wang; L. Zhu; L. Mao; L. Qiao; X. Su. 2011. Depletion of Nrf2 Enhances Inflammation Induced by Oxyhemoglobin in Cultured Mice Astrocytes. *Neurochem Res* 36: 2434-2441.
- Singh S.; S. Vrishni; B. K. Singh; I. Rahman; P. Kakkar. 2010. Nrf2-ARE stress response mechanism: A control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radical Research Special.* 44(11): 1267-1288.
- Terrazas, C. A.; F. Sánchez M.; A. M. Mejía D.; L. M. Amezcua G.; L. I. Terrazas; R. Bojalil; L. Gómez G. 2011. Cestode Antigens Induce a Tolerogenic-Like Phenotype and Inhibit LPS Inflammatory Responses in Human Dendritic Cells. *Int. J. Biol Sci.* 7 (9): 1391-1400.
- Tilg, H.; A. Kaser; A. R. Moschen. 2006. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int,* 26:1029-1039.
- Umemura, K.; T. Itoh; N. Hamada; Y. Fujita; Y. Akao; Y. Nozawa; N. Matsuura; M. Linuma; M. Ito. 2008. Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H₂O₂-induced Nrf2/ARE activation. *Biochem Biophys Res Comm.* 368:948-954.
- Weinstein, S.L.; M. R. Gold; A. L. De Franco. 1991. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88(10): 4148-4152.
- Yamada, M.; Matsuura, N.; Susuki, H. ; Kurosaka, C.; Hasegawa, N.; Ubukata, M.; Tanaka, T.; Linuma, M. 2004. Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 65:3107-3111.

5.3 EXPERIMENTO 3

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES BIOACTIVAS DE *Calea urticifolia* (MILL.) DC.

RESUMEN

Calea urticifolia (Mill.) DC es una planta de uso medicinal en la Región de la Palma en el Municipio de Rayón S.L.P. Del estudio biodirigido de *C. urticifolia* se encontró que algunas fracciones obtenidas de los extracto hexánico y diclorometánico tienen capacidad de inhibir TNF- α en estudios de inflamación aguda *in vitro*, semejante al fármaco prototipo antiinflamatorio indometacina. Tales hallazgos sugiere que los extractos son potenciales para continuar la investigación sobre identificar la sustancia bioactiva antiinflamatoria, por ello el objetivo de este trabajo fue identificar los compuestos químicos presentes en las fracciones activas, así como la identificación presuntiva de los compuestos purificados de dichas fracciones mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas e IR. Los resultados por cromatografía de gases-espectrometría de masas demuestran que las fracciones activas poseen sustancias con efecto antiinflamatorio, entre las cuales están los ácidos: palmítico, linoleico y α -linolénico; así como fitol y oftalato de isooctilo.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales en nuestro país son un recurso que se utiliza por excelencia para el tratamiento de diversos padecimientos y que son empleadas de manera complementaria dentro de los programas de salud (Canales, 2006. IMSS, 2010). Lo que ha generado el interés de la validación de los efectos terapéuticos y el reconocimiento de los componentes químicos causantes de los mismos (Bermúdez *et al.*, 2005; Llorach *et al.*, 2007; Merino, 2011).

Calea urticifolia (Mill.) DC., especie de interés de esta investigación, es una planta conocida tradicionalmente como negrito por la etnia *xí'oi* de la región de La Palma

comunidad del municipio de Rayón, en el estado de San Luis Potosí y es empleada de manera tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades como: dolor de estómago, de cabeza y en general, inflamación, gastritis, diabetes mellitus, hipertensión, diarrea, empacho, bilis, vómito (Guzmán, 2010; Ortiz, 2011).

Guzmán y colaboradores (2010), identificaron la capacidad antiinflamatoria del extracto etanólico de *C. urticifolia* (Mill.) DC. sobre la inflamación aguda mediada por la estimulación del sistema inmune por carragenina y además por el proceso inflamatorio de bajo grado asociado al tejido adiposo (TA) tras una alimentación rica en grasas *in vivo*. Los resultados demostraron la capacidad antiinflamatoria del extracto vegetal, a través de la inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como la estimulación de la secreción de adiponectina, adipocina responsable de contrarrestar el efecto proinflamatorio sobre el TA. En esta tesis se ha valorado su efecto sobre la inhibición de TNF- α de manera *in vitro* de diferentes fracciones obtenidas de extractos orgánicos de la planta por percolación, de los cuales las fracciones obtenidas con hexano y diclorometano, presentaron mayor capacidad antiinflamatoria en el bioensayo *in vitro* incluso superior al fármacos antiinflamatorios prototipo como la indometacina (Experimento 2).

Químicamente existen evidencias sobre la caracterización de los compuestos aislados de extractos orgánicos de *Calea urticifolia* (Mill.) DC., entre los cuales destacan sesquiterpenlactonas que incluye algunos germacranólidos: 5 heliangólidos y 3 nuevos tipos de germacranólidos obtenidos de la raíz (Bohlmann, F. & Jakupovic, J., 1979); caleína D, 2,3-epoxi-caleína D, juanislamina (Borges del Castillo *et al.*, 1980) y 2,3-epoxi-juanislamina (Borges del Castillo *et al.*, 1981); 3,10-epoxi-9-(3-metilbutanoil)-8-(2-metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11 (13)-trien-12,6-ólido; 3,10-epoxi-9-(3-metil-2-butenoil)-8-(2-metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo – germacra -2,4,11 (13)-trien-12,6-ólido; 3,10-epoxi-9-angeloil-8-(2-metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo -germacra-2,4,11(13)-trien-12,6-noil) – 15 -hidroxi- 1-oxo- germacra-2,4,11(13)-trien-12,6-ólido; cinco heliangólidos, ocho derivados de isoeugenoles y un derivativo de fluoroglicinol (Bohlmann &

Jakupovic, 1979); caleolactona A, caleolactona B y 2,3-epoxicaleolactona A (Herz & Kumar, 1980) y que han sido valoradas en su actividad biológica relacionada a su capacidad citotóxica en células carcinogénicas U937 (Yamada *et al.*, 2004), y sobre su inferencia en la diferenciación adipocitaria en células 3T3-L1 (Matsuura *et al.*, 2005).

Aunque la fitoquímica de *C. urticifolia* ha sido estudiada de manera profunda, el efecto antiinflamatorio de sus compuestos químicos no ha sido valorado, a pesar de que la presencia de lactonas sesquiterpénicas de manera general, actúan inhibiendo la vía Nrf2/ARE que está relacionada con la activación del factor nuclear NF-κB que a su vez activa la producción de citocinas proinflamatorias (Bork, *et al.*, 1996), lo que probablemente sugiere que podrían ser las responsable del efecto antiinflamatorio.

De acuerdo con lo anterior, y considerando el fraccionamiento hexánico y diclorometano con un mayor efecto inhibitorio de la inflamación, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar químicamente las sustancias químicas presentes en las fracciones y que pudieran estar participando en el efecto terapéutico inhibitorio mencionado.

2. METODOLOGÍA

2.1 Procesamiento de las fracciones bioactivas

Con la finalidad de identificar los compuestos químicos presentes en las fracciones bioactivas con capacidad antiinflamatoria, se realizó una derivatización de las fracciones mediante silanización con la finalidad de disminuir las interacciones vía puentes de hidrógeno y facilitar su análisis por cromatografía de gases. Para ello se pesaron 10 mg de cada una de las fracciones activas 9 y 10 del extracto hexánico, así como las 8 y 9 del extracto diclorometánico (Experimento 2-Percolación), a estas se les adicionó 2 mL de isooctano, posteriormente 100 µL de reactivo derivatizante Bis-(trimetilsilil trifluoroacetamida) y se colocó en un sistema

de microondas (CEM Discover System) a 100 °C, 150 W de potencia y 290 psi de presión, durante 13 min.

2.2 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a masas.

Se tomó 1 µL de la muestra silanizada a aproximadamente 40 °C, la cual se inyectó en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N Network con una columna no polar DB5HT Agilent Technologies acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5973 Network.

2.3 Identificación de lactonas sesquiterpénicas en fracciones activas.

Por otra parte, de manera paralela se determinó la identificación de lactonas sesquiterpénicas en las fracciones de estudio, para ello se llevó a cabo una serie de cromatografías en capa fina sobre cromatofolios de gel de sílice para la identificación selectiva de lactonas sesquiterpénicas, utilizando como fase móvil éter etílico: cloroformo 1:4 v/v y como agente revelador una solución de H₂SO₄ al 50%. Las placas se sometieron a calentamiento para la identificación del compuesto.

2.3.1 Determinación de solventes para purificación de extractos.

Se llevaron a cabo una serie de pruebas en cromatofolio de gel de sílice con diferentes proporciones de fase móvil hexano-acetato de etilo 10%, hexano-acetato de etilo 15%, hexano-acetato de etilo 20%, hexano-acetato de etilo 25%, hexano-acetato de etilo 30%, hexano-acetato de etilo 35%, hexano-acetato de etilo 40%, hexano-acetato de etilo 45% y hexano-acetato de etilo 50%, usando como revelador ácido fosfomolibdico al generar manchas de color café oscuro al calentar los cromatofolios.

2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

A través de un HPLC Waters 600 Controller, Waters 2996 Photodiode Array Detector, Water 600 Pump y Waters In-Line Degasser AF, se determinó el solvente a utilizar para llevar cabo la purificación en columnas, utilizando una columna C18 5 μm reversed-phase, 4.6 x 150 mm a un flujo de 1 mL/min probando las siguientes fases móviles: acetonitrilo 100%, metanol 100%, acetonitrilo:metanol 50:50 y acetato de etilo:hexano 50:50, se inyectó 50 μL de cada una de las fracciones hexánicas y diclorometánicas a una concentración de 1mg/mL, así como del solvente puro en el que se llevó a cabo la disolución de cada fracción, detectándose en un barrido de 200-400 nm.

2.3.3. Purificación

Se preparó una columna cromatográfica con sílice C18-fase reversa marca Fluka, empacada con acetonitrilo. Posteriormente, las fracciones identificadas como H=hexano y D=diclorometano, se pesó, 202.8 mg de fracción 10 H, 210.1 mg de fracción 9H; 226.7 mg de fracción 9D, 188.9 mg de fracción 8D y se disolvieron en la menor cantidad de solvente de manera independiente, se adicionó directamente a la columna y se pasó acetonitrilo constantemente, cambiando polaridad y pasando posteriormente hexano y finalmente metanol hasta obtener las respectivas fracciones, a las se les hizo una cromatografía en capa fina para determinar su pureza.

Posteriormente, las fracciones purificadas mediante fase reversa fueron sometidas a otra separación en columna, utilizando sílica gel 60 (Merck) y una serie de fase móvil hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones: 5:95, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70, acetato de etilo 100% y metanol 100%, hasta obtener una serie de fracciones y a las cuales se les hizo cromatografía en capa fina, para identificar si era o no pertinente llevar a cabo otra cromatografía en columna para eliminar remanentes.

2.3.4 Concentración y secado de los productos puros

Se llevó a cabo con la ayuda de un rotavapor (BÜCHI RE 111) a una temperatura de 40°C, concentrando hasta un volumen aproximado de 1 mL de cada fracción para después trasvasar a los viales correspondientes. Posteriormente se realizó el proceso de secado a cada una de los productos concentrados con ayuda de una estufa de vacío (Vaccum Drying Oven PROLAB DZF-6030A) a una temperatura de 40 °C, durante 10 horas para asegurar la eliminación de todo el solvente que pudiera interferir con análisis posteriores.

2.3.5 Determinación de Rf de los productos puros mayoritarios

Se disolvió una pequeña cantidad de los productos puros secos que presentaron una mayor cantidad de extracción y se llevó a cabo una cromatografía en capa fina en placas de sílice fase normal, con una fase móvil de hexano:acetato de etilo 90:10. Se dejó correr una hasta una distancia de 0.5 cm antes de llegar al final del cromatofolio, se dejó secar y nuevamente se pasó por dicho sistema de solventes. Las placas se observaron bajo una lámpara de luz UV y se marcaron los compuestos observados para su posterior medición. Se obtuvo el Rf de la razón de la distancia recorrida por el compuesto en relación con la recorrida por el solvente.

2.4 Espectroscopía Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Nicolet (470 FT-IR), preparando las muestras obtenidas, en pastillas de bromuro de potasio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a masas.

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se muestran los compuestos químicos detectados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tras la silanización.

Tabla 1. Compuestos químicos detectados de la fracción 10 del extracto hexánico obtenido por percolación.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia relativa (%)
Ácido palmítico	13.243	0.636
Ácido oftálico	23.604	0.298
Oftalato de diisooctilo	25.703	25.036

Tabla 2. Compuestos químicos detectados de la fracción 9 del extracto hexánico obtenido por percolación.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia relativa (%)
Ácido málico	2.119	0.069
Ácido palmítico	13.260	0.753
Ácido linoleico	17.459	0.623
Ácido linolénico	17.673	7.604
Fitol	20.270	0.396
Oftalato de diisooctilo	25.618	3.95

Tabla 3. Compuestos químicos detectados de la fracción 8 del extracto de diclorometano obtenido por percolación.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia relativa (%)
Acetato de fitol	7.689	2.135
Transfitol	8.666	0.474
Ácido palmítico	13.268	3.089
Ácido linoleico	17.451	1.999
Ácido α -linolénico	17.631	4.977
Oftalato de diisooctilo	25.609	5.962
Oftalato de didecanilo	32.482	0.466

Tabla 4. Compuestos químicos detectados de la fracción 9 del extracto de diclorometano obtenido por percolación.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia relativa (%)
Acetato de fitol	7.672	1.070
Ácido palmítico	13.226	0.904
Oftalato de diisooctilo	25.695	37.469

Los resultados anteriores demuestran la presencia de ácidos grasos como: ácido palmítico, linoleico, α -linolénico, así como la presencia de fitol compuestos que se han reportado en estudios previos como responsables de actividad antiinflamatoria, inclusive, el ácido linoleico muestra mayor efectividad inhibitoria en relación con la indometacina (Bauer, *et al.*, 1996).

Los ácidos grasos poliinsaturados han mostrado actividad antiinflamatoria tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Melnik, 1993; Broelli *et al.*, 1994; Chenoy, *et al.*, 1994; Bauer, *et al.*, 1996; Arita, *et al.*, 2005; Guarrera, 2005; Pérez, *et al.*, 2013).

El fitol ha sido reportado como un compuesto que atenúa la respuesta inflamatoria al inhibir la migración de neutrófilos que es particularmente causada por la reducción de IL1-B y TNF- α , así como estrés oxidativo, relacionado con la vía Nrf2/ARE e inhibición de NF-kB (Silva, *et al.*, 2013).

Por otra parte, se encontraron diferentes oftalatos en los extractos al encontrarse en mayor abundancia en relación con los otros compuestos (0.4 – 37%), los cuales se ha demostrado que podrían interferir en la inmunidad contra infecciones, así como promover la desviación de la respuesta Th2 mediada por anticuerpos, suprimiendo la expresión de la vía IFN- α /IFN- β que da lugar a la diferenciación a linfocitos Th1 asociados en la secreción de citocinas proinflamatorias y modulando la habilidad para estimular respuestas de las células T (Nishioka, *et al.*, 2012; Kuo,

et al., 2013; Tanaka, *et al.*, 2013). Lo anterior nos sugiere que actúa de manera agonista a la inhibición de la inflamación favoreciendo su efecto antiinflamatorio.

Tal hallazgo corrobora y fundamenta la actividad antiinflamatoria de *C. urticifolia*; sin embargo es fundamental establecer las pruebas de toxicidad de estos compuestos dosis dependiente, debido a que existen estudios que demuestran que los oftalatos traen como consecuencias efectos como: carcinogénesis (Ito, *et al.*, 2007) toxicidad reproductiva en ratones (Foster, 1980; Tomita, *et al.*, 1986; Heindel *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2013;) además de ser generadores de asma (Jaakkola & Knight, 2008; Bornehag & Nanberg, 2010) y autismo (Ventric, *et al.*, 2013).

3.2 Identificación de lactonas sesquiterpénicas

Cabe destacar que al momento de realizar la CG/EM, varios compuestos no fueron identificados, debido a que no había registro en la biblioteca utilizada para su comparación, por esta razón se llevó a cabo la determinación en las fracciones activas mediante capa fina de lactonas sesquiterpénicas, ya que algunos espectros de masas obtenidos arrojaban estructuras y pesos moleculares similares a estas. Los resultados cromatográficos mostraron la presencia de una mancha roja para la fracción 9 y 10 de hexano, una mancha verde para la fracción 8 de diclorometano y una mancha negra para la fracción 9 de diclorometano, lo cual es indicativo de presencia de lactonas sesquiterpénicas, ya que la presencia de manchas rojas, negras y/o verdes indica una reacción positiva hacia la presencia de éstas (Domínguez, 1979).

Las capas finas obtenidas mediante revelado con ácido fosmolíbico a las diferentes proporciones de mezcla hexano:acetato de etilo, permitían ver un barrido de compuestos, sin poder detectar manchas claras separadas, debido a esto se optó por llevar a cabo la separación por HPLC con columna C18 de fase reversa, ya que este tipo de columna permite una mejor separación de compuestos, considerando la presencia de lactonas sesquiterpénicas en dichas

fracciones de *C.urticifolia* (Yamada, *et al.*, 2004; Matsuura, *et al.*, 2005; Nakagawa, *et al.*, 2005).

3.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las pruebas llevadas a cabo con el HPLC mostraron una mejor elución de los compuestos, utilizando como fase móvil acetonitrilo 100%, a un flujo de 1 mL/min, y una λ de 213 nm; obteniéndose la elución al minuto 2, 2.5 y 5.5 respectivamente.

3.4 Purificación

La fracción 9 del extracto hexánico se obtuvo un total de 8 fracciones, siendo la fracción 3 obtenida en acetonitrilo 100% la que se seleccionó para la segunda fase móvil obteniéndose 5 fracciones, siendo la 3, la obtenida con una mezcla de hexano:acetato de etilo 50:50, la pura (C6).

De la fracción 10 del extracto hexánico se obtuvieron 6 fracciones siendo la fracción 2 obtenida en acetonitrilo 100% la seleccionada para siguiente fase, en la que se tuvo como resultado 12 fracciones siendo 4, 6 y 7 las puras (C7,C8 y C9), obtenidas a las polaridades de hexano:acetato de etilo 90:10, 85:10,80:20, 70:30y 60:40.

La fracción 9 del extracto de diclorometano arrojó un total de 11 fracciones, siendo la fracción 6 obtenida en las polaridades acetonitrilo 100% la seleccionada para la fase 2 de la cual se obtuvieron 7 fracciones, siendo la fracción 2 la obtenida en la polaridad hexano:acetato de etilo 50:50 la fracción pura (Compuesto 1 (C1)).

Para la primera fase de la fracción 8 del extracto de diclorometano arrojó un total de 9 fracciones, siendo la fracción 3 obtenida en las polaridades acetonitrilo 100% pura (C2); y la fracción 2 obtenida también en acetonitrilo 100% la seleccionada para la fase 2 de la cual se obtuvieron 7 fracciones, siendo la fracción 2 la obtenida en la polaridad hexano:acetato de etilo 90:10 y 85:15 las fracciones seleccionadas

para una tercer fase obteniéndose 5 fracciones, siendo la segunda, la pura, obtenida de hexano:acetato de etilo 90:10, 85:15 y 80:20 (C5) . De la segunda purificación la la fracción 5 obtenida con acetonitrilo 100% y hexano 100% fue pura (C3) y la fracción 6 obtenida con metanol al 100% fue pura (C4). La tabla 5 muestra la cantidad de los compuestos puros obtenidos a partir de las fracciones 9 y 10 de hexano - 8 y 9 de diclorometano.

Tabla 5. Compuestos puros obtenidos a partir de las fracciones 9 y 10 de hexano, así como 8 y 9 de diclorometano.

Compuesto	Cantidad obtenida (mg)
C1	5.4
C2	3.4
C3	13.7
C4	0.9
C5	33.8
C6	4.8
C7	2.2
C8	6.6
C9	4.3

Los compuestos 3 y 5 fueron los mayoritarios, su respectivo Rf fueron los siguientes: 0.5366 y 0.6098. Su aspecto es un semisólido amarillo en diferentes tonalidades para cada uno de ellos.

De las 9 fracciones puras obtenidas, solamente 2 se obtuvieron en cantidades necesarias para llevar a cabo otras técnicas espectroscópicas, se lograron obtener 13.7 mg del compuesto 3 y 33.8 mg del compuesto 5.

3.5 Espectroscopía Infrarrojo

El espectro infrarrojo arrojó bandas características ancha, de intensidad fuerte, característica de grupos OH, de tensión O-H ($3200-3600\text{ cm}^{-1}$), a 2900 cm^{-1} se observa una banda de intensidad baja característica de vibraciones de tensión C sp^3 -H así como de grupos carbonilo por las bandas finas de intensidad media que indica vibraciones de tensión C=O observadas entre 1720 y 1760 cm^{-1} (que pueden pertenecer a un ácido carboxílico, por la presencia de otras bandas características, o a algún anhídrido de ácido carboxílico), y bandas finas de intensidad media correspondientes a vibraciones de tensión C-O entre 1150 y 1200 cm^{-1} , así como de bandas de tensión simétricas C sp^3 -H de CH_3 . El conjunto de grupos funcionales sugieren compuestos con fragmentos moleculares de tipo carbohidrato.

Las características físicas de los compuestos 3 y 5 podrían indicar una similitud de compuesto, aunque el valor de R_f descarta que sean el mismo y posteriormente el espectro infrarrojo, a pesar de arrojar espectros muy similares, no son idénticos, por lo que se trata de dos compuestos similares, probablemente isómeros.

Los datos espectroscópicos arrojados por el infrarrojo para el C3 son la presencia de bandas en el IR (λ , cm^{-1}): 3435, 2961, 2917, 2843, 1761, 1729, 1630, 1604, 1317, 1291, 1156, 1030, 665, 552 y 466.

Los datos espectroscópicos arrojados por el infrarrojo para el C5 son la presencia de bandas en el IR (λ , cm^{-1}): 3426, 2961, 2922, 2843, 1769, 1726, 1630, 1378, 1271, 1270, 1156, 1013, 665, 626, 465 y 439.

4. CONCLUSIONES

Los resultados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) demuestran que las fracciones activas poseen sustancias con efecto antiinflamatorio, entre las cuales están los ácidos: palmítico, linoleico y α -linolénico; además se identificó el fitol y oftalato de isooctilo. Para corroborar la identificación de los compuestos por CG-EM se requiere un método más como puede ser la comparación por tiempos de retención o por los índices de regresión lineal.

De las fracciones 9 y 10 de hexano - 8 y 9 de diclorometano se obtuvieron 9 compuestos puros. La elucidación de los productos puros estará en curso por las técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear, análisis elemental y masas.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arita, M.; Bianchini F., Alibeti J.; Sher A.; Chiang N.; Hong S.; Yang R.; Petasis N.A, Serhan C. N. 2005. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med* 201: 713-722.
- Bauer, R.; A. Pröbstle; H. Lotter; W. Wagner R.; U. Matthiesen. 1996. Cyclooxygenase inhibitory constituents from *Houttuynia cordata*. *Phytomedicine*. 2(4) 305-308.
- Bermúdez, A.; M.A. Oliveira M.; D. Velázquez. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. Ago 30 (008): 453-459.
- Bohlmann, F. & Jakupovic, J. 1979. Neue germacranolide aus *Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 18:119-123.
- Broelli, S.; H. Bresser; L. Belsan. 1994. Externe Therapie mit gamma-Linolensäure-Ergebnis einer Doppelblindstudie. *Z. Hautkr* 69:523-4
- Borges del Castillo, J. (*et al.*) 1980. Salvadorian compounds. I. Calein D and 2,3-epoxycalin D, two germacranolides from *Calea urticifolia*. *Anales de Química. Serie C: Química Orgánica y Bioquímica* 77 (1): 90-92
- Borges del Castillo, J. (*et al.*) 1981. Salvadorian compositae. II. Juanislamin and 2,3-epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. *J. Nat. Prod.* 44(3): 348-350.
- Bornehag, C. G.; E. Nanberg. 2010. Phthalate exposure and asthma in children. *International Journal of Andrology*. 33(2) 333-345.

- Canales, M. M. (*et al.*).2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75: 21-43.
- Chenoy R.; S. Hussain, Y. Tayob; P. M. O'Brien; M. Y. Moss; P. F. Morse. 1994. Effect of oral gamma-linolenic acid from evening primrose oil on menopausal flushing. *Brit Med. J.* 308:501-3
- Domínguez, X. A. (1979) Métodos de investigación fitoquímica. Limusa: México.
- Foster, P. M. D.; L. V. Thomas, M. W. Cook; S. D. Gangolli. 1980. Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 54(3):392-398.
- Guarrera PM. 2005. Tradicional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium) *Fitoterapia* 76:1
- Guzmán, G. P. 2010. Exploración, aprovechamiento y validación experimental de plantas con efecto antiinflamatorio de la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P, México.
- Heindel R. J. & R. E. Chapin. 1989. Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation by mono(2-ethylhexyl) phthalate in primary rat sertoli cell cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 97(2) 377-385.
- Herz, W. & Kumar, N. 1980. Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *c. urticifolia*. *Phytochemistry* (19): 593-597.
- Ito, Y.; O. Yamanoshita; N. Asaeda; Y. Tagawa; C. Lee; T. Aoyama; G. Ichihara; K. Furuhashi; M. Kamijima; F. J. González; T. Nakajima. 2007. Di(2-ethylhexyl) phthalate Induces Hepatic Tumorigenesis through a Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -independent Pathway. *Journal of Occupational Health.* 49(3):172-182.
- Jaakkola, J. J. K. & Knight T. L. 2008. The Role of Exposure to Phthalates from Polyvinyl Chloride Products in the Development of Asthma and Allergies: A

Systematic Review and Meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 116(7) 845-853.

- Kuo C. H.; C. C. Hsieh; H. F. Kuo; M.Y. Huang; L. C. Chen; S. K. Huang; C. H. Hung. 2013. Phthalates suppress type I interferon in human plasmacytoid dendritic cells via epigenetic regulation. *Allergy* 68(7):870-9.
- Li, J.; Q. Su; K. Y. Li; C. F. Sun; W. B. Zhang. 2013. Rapid analysis of phthalates in beverage and alcoholic samples by multi-walled carbon nanotubes/silica reinforced hollow fibre-solid phase microextraction. *Food Chemistry* 141(4):3714-3720.
- Lorach, C.; C. Chen; E. González; A. Hernández; Y. Rodríguez. 2007. Uso de plantas medicinales en adultos que acuden a una unidad de atención primaria de Panamá. *Arch Med Fam Gen.* 4 (1): 15-18.
- Matsuura, N.; M. Yamada; H. Suzuki; N. Hasegawa; C. Kurosaka; M. Ubukata; T. Tanaka; M. Inuma. 2005. Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69 (12):2470-2474.
- Melnik, B.. 1993. Prophylaxe und Therapie der Neurodermitis mit Gammalinolensäure. *Allergologie* 16:454-8.
- Merino-Sánchez, C. 2011. Monografía de plantas antiinflamatorias de la etnia xi'oi de la región de La Palma, San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P, México
- Nakagawa, Y.; M. Inuma; N. Matsuura; K. Yi., M. Naoi; T. Nakayama; Y. Nozawa; Y. Akao. 2005. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arcanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol Sci.* 97:242-252.
- Nishioka, J.; C. Iwahara; M. Kawasaki; F. Yoshizaki; H. Nakayama; K. Takamori; H. Ogawa; K. Iwabuchi. 2012. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces

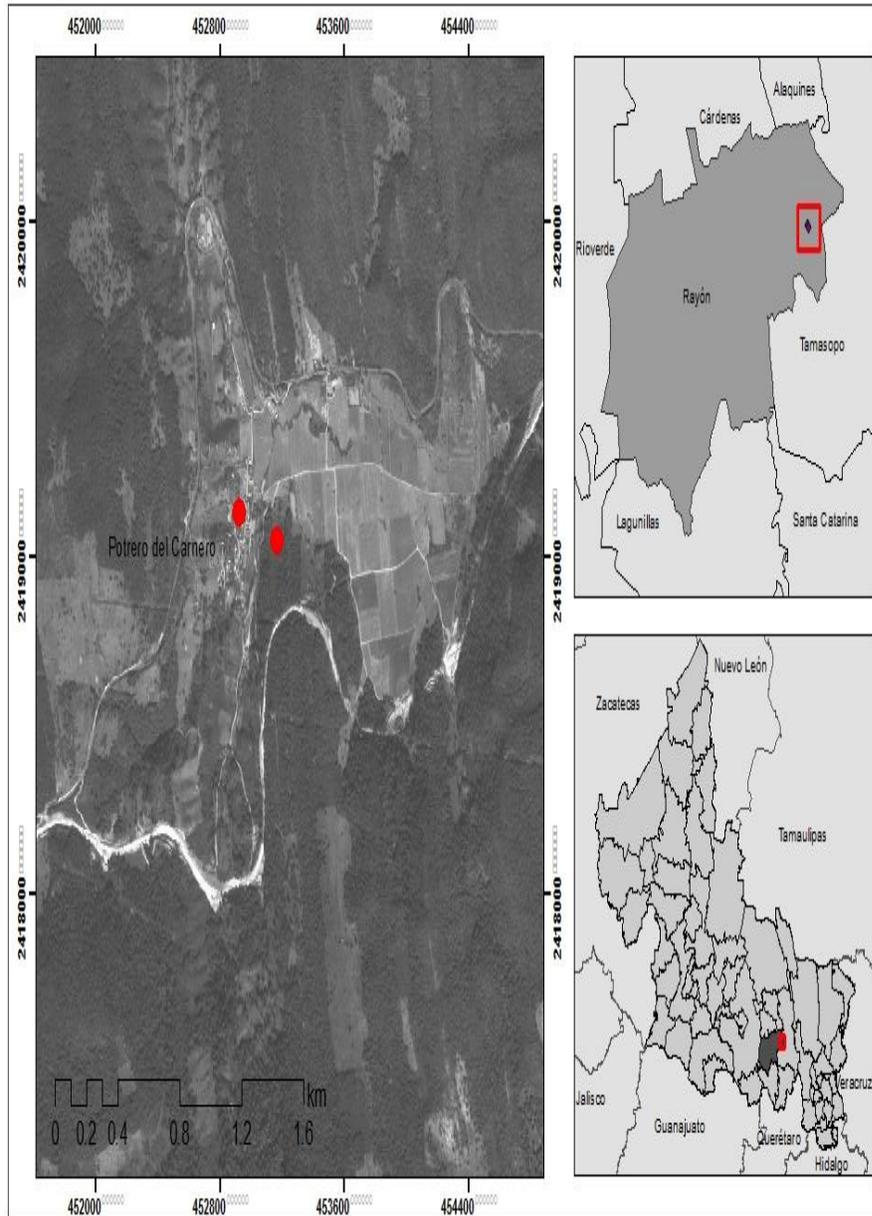
production of inflammatory molecules in human macrophages. *Inflamm Res*. 61(1):69-78.

- Ortiz S., M.C. 2011 Evaluación del extracto eranólico de *Calea urticifolia* (Mill.) Dc. Sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P. México.
- Pérez G., C.; R. Serrano V.; M. González C.; M. A. Zavala S.; S. Pérez G. 2013 A. Anti-Inflammatory Activity and Composition of *Senecio salignus* Kunth. *BioMed Research International*. Disponible en línea: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/814693>.
- Silva, R. O.; F. B.Suosa; S. R. Damasceno; N. S. Carvalho; V. G. Silva; F. R. Oliveira; D. P. Sousa; K. S. Aragao; A. L. Barbosa; R. M. Freitas; J. V. Medeiros. 2013. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol*. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24102680>.
- Tanaka, M.; K. Inoue; T. Momoi; H. Takano. 2013. *In vivo* immunoamplifying effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on cytokine response. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 35(1): 147-150.
- Tomita, I.; Y. Nakamura; Y. Yagi; K. Tutikawa. 1986. Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEPH) in mice. *Environ Health Perspect*. 65:249-254.
- Ventrice, P.; D. Ventrice; E. Russo; G. De Sarro. 2013. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36(1):88-96.
- Yamada, M.; Matsuura, N.; Susuki, H. ; Kurosaka, C.; Hasegawa, N.; Ubukata, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M. 2004. Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 65:3107-3111.

ANEXO I

SITIO DE RECOLECCIÓN DE *Calea urticifolia* (Mill.) DC.

LOCALIZACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO



ANEXO II

REACCIONES DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO

1.- Reacción general de lípidos.-0.5mL de extractos orgánicos en diferentes tubos y se añadió gotas de Sudán III, prueba positiva desarrollo color rojo intenso.

2.- Carbohidratos: Pruebas en tubo, con extractos orgánicos y acuosos y calentamientos a baño maría.

***Reacción de Antrona.**-A 0.5mL de extracto se añadió por la pared 0.5mL de solución de Antrona/ H_2SO_4 , observar si hay aparición de un anillo púrpura en la interfase.

***Reacción de Molish.**-0.5mL de extracto añadir 0.5mL de reactivo de Molish, resbalar por paredes H_2SO_4 con, observar si existe aparición de un anillo púrpura en la interfase.

***Reacción de Fehling.**-1mL de extracto añadir 1mL de reactivos A y B, calentar a ebullición 8 min, se observa si existe la formación de óxido cuproso como precipitado rojo ladrillo

***Reacción de ácido múscico.**-1mL de extracto orgánico y añadir 1mL de HNO_3 , mezclar y reposar 24 horas, observar si hay formación de cristales solubles.

***Reacción de Seliwanoff.**-0.5mL de extracto añadir 0.5mL de reactivo de carbazol y 1ml de HCl 25% calentar 10min, se observa si hay color rojo cereza.

***Confirmación de cetosas.**-0.5mL de extracto añadir 0.5mL de HCl con, calentar a ebullición, poner una tira de papel filtro humedecido con gotas de $C_2H_4O_2$ y anilina en el tubo, observar la apariencia de una mancha color rojo naranja en el papel filtro.

*** Identificación de Pentosas.**-2mL de reactivo de Bial, calentar a ebullición y luego agregar 0.5mL de extracto. Aparición de color azul verdoso.

3.- Flavonoides: Pruebas en tubo, con extractos orgánicos y calentamientos a baño maría.

***Identificación de Flavonoides.**-Colocar droga vegetal en caja de petri, añadir 0.5mL de $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{con}}$. Reposar de 5-15min. Aparición de color amarillo, naranja, rojo o azul.

***Caracterización de Heterósidos Flavónicos.**-0.5mL de extracto, añadir 0.5mL de NaOH, KOH o NH_4OH 10%. Aparición de color amarillo, tonos rojos, color purpura rojizo, café anaranjado o azul.

***Caracterización de Heterósidos Flavónicos.**-0.5mL de extracto, añadir 0.5mL de FeCl_3 5%, se observa coloración verdosa

***Reacción de Shinoda o Cianidina.**-0.5mL de extracto, añadir 0.1mg de Mg y 3gotas de HCl con. Aparición de color anaranjado, roja, roja-azulosa, violeta, verde o azul.

0.5mL de extracto, añadir 0.1mg de Zn metálico y 3gotas de HCl con. Aparición de color violeta.

***Reacción de Marini-Bettolo.**-0.5mL de extracto, añadir 0.5mL de reactivo de Marini-Bettolo Aparición de coloración roja, naranja, precipitado rojo oscuro o violeta o precipitado amarillo o naranja.

***Reacción con H_2SO_4 .**-0.5mL de extracto, adicionar 3 gotas de $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{con}}$. resbalado por la pared. Aparición de coloraciones amarillas, anaranjadas, guinda, rojo guinda o azuloso.

***Reacción de Dimroth.**-0.5mL de extracto, añadir 0.5mL de reactivo de Dimroth. Aparición de coloración de naranja a rojo. 0.5mL de extracto, añadir 0.5mL de solución de H_2BO_3 10% y 0.5mL de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ y 0.5mL de acetona. Aparición de coloración amarilla.

***Reacción para Leucoantocianidinas.**-0.5mL de extractos, agregar 3 gotas de HCl en propanol 2N y calentar. Aparición de color rojo, violeta o café amarillento.

***Identificación de Antocianinas.**-Droga vegetal molida, añadir 3mL de HCl 20%, calentar 10min., enfriar, filtrar, al filtrado agregar gotas de ácido pícrico 1%. Formación de precipitado amarillo.

4.-Taninos: Pruebas en tubo, con extractos orgánicos y acuosos, calentamientos a baño maría.

***Ensayo de gelatina.**-0.5mL de extractos en diferentes tubos, añadir 3gotas de gelatina 1% en NaCl 10%. Formación de precipitado.

***Reacción de FeCl₃.**-0.5mL de extractos, añadir 3gotas de NaCl 1% y 3 gotas de FeCl₃ 5%. Aparición de color azul-negro o grisáceo.

***Ensayo de Stiasny.**-0.5mL de extractos en diferentes tubos, añadir 0.5mL de Reactivo de Stiasny, calentar 30min. Precipitación de grumos floculentos.

***Prueba de Oxidación de Taninos Catéquicos.**-0.5mL de extractos en diferentes tubos, añadir 0.5mL de HCl_{con.}, calentar a ebullición por 5min. Aparición de coloración roja.

***Ensayo de la catequina.**-Humedecer astilla de madera con extracto, secar, empapar con HCl_{con.}, secar, calentar cerca de placa calefactora. Aparición de coloración rosa o roja.

***Ensayo del ácido Clorogénico.**-0.5mL de extractos en diferentes tubos, añadir 0.5mL de NH₄OH 10%, agitar y reposar. Aparición de coloración verde.

5.-Quinonas: Pruebas en tubo, calentamientos a baño maría. *Extracto Etéreo Directo (EED)* 10mL de extracto de decocción extraer por partición con 10mL de éter etílico. *Extracto Hidrólisis Oxidativa (EHO)* 1g de muestra vegetal molida agregar 5mL FeCl₃5% y 5mL HCl 10%, hervir 10min, enfriar, filtrar y extraer por partición con 10mL de éter.

***Reacción general.**-A 0.5mL de EED añadir 0.5mL de NH₄OH_{con} o 0.5mL de H₂SO_{4con}. Aparición de color rojo a púrpura

***Ensayo de Borntrager para antraquinonas libres.**-0.5mL de EED agregar 0.5mL de NaOH 10%, agitar y reposar. Aparición en fase acuosa color rosa, rojo, violeta o amarillenta con fluorescencia verde. Si no hay cambio de coloración o es amarillenta agregar H₂O₂ 6%. Aparición de color rojo.

***Ensayo para Antraquinonas con grupos ácidos libres.**-1mL de EED agregar 0.5mL de NaHCO₃10%, agitar. Aparición de color rosa, rojo o violeta.

***Ensayo para antranoles libres.**-1mL de EED agregar 2 gotas de HNO₃con., reposar 5-30minutos, añadir 0.5mL de NH₄OHcon., resbalar por la pared. Aparición de color violeta.

***Ensayo de Borntrager para heterósidos antraquinónicos.**-1mL de EHO agregue 1mL de KOH 10%, agitar. Aparición de color rosa, rojo o violeta en fase acuosa

6.-Saponinas: Pruebas en tubo con extractos orgánicos y calentamientos a baño maría. *Extracción de Saponinas(ES)* Droga vegetal molida agregar solución salina isotónica tibia y filtrar.

Prueba de Espuma.-Agitar ES de 3-5min y observar formación de espuma por más de 15min y altura superior a 8mm.

***Prueba de Acción Hemolítica.**-1mL de ES, añadir suspensión de sangre desfibrinada 5% en disolución salina al 0.85%, mezclar, centrifugar un 1min a 1500rpm y reposar. Aparición de color rojo que no desaparece con el reposo.

***Prueba de Libermann-Burchard (LB).**-1mL de extracto orgánico con 1mL de reactivo de LB. Aparición de coloración rosa-púrpura o azul-verde.

***Prueba de Rosenheim.**-1mL de extracto orgánico con 1mL de reactivo de Rosenheim. Aparición de coloración violeta-azul.

***Reacción de Rosenthaler.**-1mL de extracto orgánico con 3 gotas de vainillina 1% en etanol y 3 gotas de H₂SO₄con. Aparición de color violeta.

7.-Heterósidos Cardiotónicos: Pruebas realizadas en tubo con extractos etanólico y metanólico, los calentamientos son a baño maría.

***Prueba de Baljet.**-Colocar 1mL de extracto con gotas de reactivo de Baljet. Aparición de coloración naranja o rojo oscuro.

***Reacción de Kedde.**-Mezclar 1mL de extracto con 3gotas de metanol y 3 de cloroformo, verter en papel filtro, secar y añadir 1gota del reactivo de Kedde. Aparición de coloración violeta o azul.

***Prueba de Raymond.**-Mezclar 0.5mL de extracto con reactivo de Raymond. Aparición de coloración violeta o azul.

***Prueba de Lieberman-Buchard (LB).**-Mezclar 0.5mL de extracto con 1mL de reactivo LB. Aparición de anillo azul-verdoso.

***Ensayo de Keller-Kiliani.**-Mezclar 0.5mL de extracto con 0.5mL de Reactivo de Keller Kiliani, después agregar 0.5mL de H₂SO₄con. Aparición de anillo color azul.

***Prueba de Xantidrol-9.**-Mezclar 0.5mL de extracto con mezcla de 0.5mL del reactivo de Xantidrol, añadir 2gotas de HCl_{con}, no agitar, calentar 5-10min. Aparición de coloración roja.

8. Heterósidos Cianogenéticos: Colocar porción de droga molida en un tubo, añadir 5mL de agua y 10 gotas de Xilol, colocar tira de papel impregnada con picrato de sodio, sellar tubo y calentar 50°. Aparición de coloración roja en tira.

9. Lactonas sesquiterpénicas: Se llevó a cabo para su identificación una cromatografía en placa fina, utilizando como adsorbente sílica gel, usando como sistema de disolventes: éter etílico-cloroformo 1-4 v /v y el agente cromogénico fue ácido sulfúrico 50%, se calentó una vez rociado y se observó bajo luz UV.

10. Alcaloides:

***Extracción A.**-Muestra vegetal pulverizada con 5mL de HCl 3% acuoso, calentar a baño maría 10 minutos.

***Extracción B.**- Muestra vegetal pulverizada con 5mL de HCl 5%.-etanólico, calentar a baño maría 5 minutos.

***Reacciones de precipitación.**-En placa excavada colocar 3gotas de extracción A, B, Decocción e Infusión y añadirles 3 gotas de: Dragendorff, Meyer, Hager, Wagner, Sonnenchein, Sheibler, Ac. Silicotungstico, Lloyd, Erdmann y Ácido Tánico, mezclar por rotación, observar formación precipitado o floculado y cambio de color.

***Reacción de identificación de alcaloides indólicos.**-A 1mL de extracción A, B, Decocción e Infusión, añadir 0.5mL de reactivo de URK y 0.5mL de H₂SO₄ 65%. Aparición de coloración azul.

ANEXO III

HOJA TÉCNICA KIT ELISA TNF- α HUMANO

Human TNF- α p

ELISA Development Kit

900-K25 Lot#0112025

Expiration one year from date of receipt

Description: Human TNF- α ELISA development kit contains the key components required for the quantitative measurement of natural and/or recombinant hTNF- α in a sandwich ELISA format within the range of 16–2000pg/ml. Using the ELISA protocol described below, the recommended microplates, reagents and solutions, the components supplied in this kit are sufficient to assay

hTNF- α in approximately 1000 ELISA plate wells.

RECONSTITUTION & STORAGE

Capture Antibody: 100 μ g of antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1.0ml sterile water for a concentration of 100 μ g/ml.

Detection Antibody: 50 μ g of biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α + 2.5mg D-mannitol.

Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 0.5ml sterile water for a concentration of 100 μ g/ml.

Human TNF- α Standard: 1 μ g of recombinant hTNF- α + 2.2mg BSA + 11.0mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1ml sterile water for a concentration of 1 μ g/ml.

Note: The reconstituted components are stable for 2 weeks when stored at 2-8°C. Components that have been reconstituted and aliquoted can be stored at -20°C for up to 6 months.

Avidin-HRP Conjugate: 60 μ l vial. Upon receipt, avidin-HRP conjugate should be aliquoted into ten 6 μ l vials and stored at \leq -20°C. Aliquots stored frozen at \leq -20°C are

stable for up to 2 years form date of receipt. Avoid more than one freeze-thaw cycle. **Avidin should be used in conjunction with ABTS only.**

RECOMMENDED MATERIALS (or purchase PeptoTech's ELISA Buffer Kit: Cat. # 900-K00)

ELISA microplates (Nunc MaxiSorp Prod. # 439454, or Corning Prod # 3590);

Tween-20 (Sigma Cat. # P-7949);

BSA (Sigma Cat # A-7030);

ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma Cat. # A3219);

Dulbecco's PBS [10x] (Gibco BRL Cat. # 14200-075).

RECOMMENDED SOLUTIONS

All solutions should be at ambient temperature prior to use.

PBS: dilute 10xPBS to 1xPBS, pH 7.20 in sterile water.

Wash Buffer: 0.05% Tween-20 in PBS
Block Buffer: 1% BSA in PBS *

Diluent: 0.05% Tween-20, 0.1% BSA in PBS *
*** Sterile filter and store at 4°C for up to 1 week.**

PLATE PREPARATION

1.- Dilute capture antibody with PBS to a concentration of 1.0 μ g/ml. Immediately, add 100 μ l to each ELISA plate well. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.

2.- Aspirate the wells to remove liquid and wash the plate 4 times using 300 μ l of wash buffer per well. After the last wash invert plate to remove residual buffer and blot on paper towel.

3.- Add 300µl block buffer to each well. Incubate for at least 1 hour at room temperature.

4.- Aspirate and wash plate 4 times.

ELISA PROTOCOL

Standard/Sample: Dilute standard from 2ng/ml to zero in diluent. Immediately add 100µl of standard or sample to each well in triplicate. Incubate at room temperature for at least 2 hours.

Detection: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute detection antibody in diluent to a concentration of 0.50µg/ml. Add 100µl per well. Incubate at room temperature for 2 hours.

Avidin Peroxidase: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute one 5.5µl aliquot of Avidin Peroxidase 1:2000 in diluent for total volume of 11ml. Add 100µl per well. Incubate 45 minutes at room temperature.

ABTS Liquid Substrate:

(ABTS Substrate should be at ambient temperature prior to use)
Aspirate and wash plate 4 times. Add 100µl of substrate solution to each well. Incubate at room temperature for color development. Monitor color development with an ELISA plate reader at 405 nm with wavelength correction set at 650 nm.

NOTE: Reliable standard curves are obtained when either O.D. readings do not exceed 0.2 units for the zero standard concentrations, or 1.2 units for the highest standard concentration. The plate should be monitored at 5-minute intervals for approximately 45 minutes.

CROSS REACTIVITY

When tested at 50ng/ml the following antigens did not exhibit significant cross reactivity:

Human: 4-1BBL, 4-1BBR, CD40L, BAFF, sFasL, sRANKL, TNF-β, sTNF-R1, sTNF-R2, sTRAIL,

sTRAIL-R1, TWEAK, TWEAKR, VEGF

Murine: CD40L, sRANKL, TNF-α

Rat: TNF-α

