



Universidad del Mar
Campus Puerto Escondido

**“Actividad biológica de especies vegetales del estado de Oaxaca:
Sicyos bulbosus (Cucurbitaceae), *Encyclia michuacana*
(Orchidaceae) y *Acalypha cuspidata* (Euphorbiaceae)”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
MAYRA HERRERA MARTÍNEZ

DIRECTOR:
DR. J. MARCO VINICIO RAMÍREZ MARES

PUERTO ESCONDIDO, OAXACA

JUNIO DE 2010

Puerto Escondido, Oaxaca, a junio de 2010

DR. JOSE LUIS VILLARRUEL ORDAZ
JEFE DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL MAR
CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

P R E S E N T E

Después de haber analizado y evaluado la tesis “Actividad biológica de especies vegetales del estado de Oaxaca: *Sicyos bulbosus* (Cucurbitaceae), *Encyclia michuacana* (Orchidaceae) y *Acalypha cuspidata* (Euphorbiaceae)” que presenta la Pasante de la Licenciatura en Biología con especialidad en Biotecnología, Mayra Herrera Martínez.

Por este conducto, le comunicamos que la tesis cumple con los requisitos académicos para que la citada Tesista presente el correspondiente examen profesional.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.

A t e n t a m e n t e

M. en C. Mónica M. Galicia Jiménez
Sinodal Secretario

Dr. J. Marco Vinicio Ramírez Mares
Sinodal Vocal

Dr. Héctor Santiago Romero
Sinodal Suplente

Dr. José Luis Villarruel Ordaz
Sinodal Suplente

Dra. Beatriz Hernández Carlos
Sinodal Presidente

RESUMEN

La medicina tradicional constituye una fuente importante de información acerca de nuevos agentes activos medicinales, algunos de ellos, útiles en la prevención y tratamiento del cáncer. Con base en reportes etnobotánicos y químicos que exhiben su potencial como agentes terapéuticos, se evaluaron las propiedades antioxidante, antimicrobiana, anticiclooxigenasa y antitopoisomerasa de especies vegetales del estado de Oaxaca: *Sicyos bulbosus*, *Encyclia michuacana* y *Acalypha cuspidata*. Para ello, se realizó una extracción metanólica del tubérculo de *S. bulbosus*, del bulbo de *E. michuacana* y de la parte aérea de *A. cuspidata*; posteriormente, cada uno de los extractos fue fraccionado por métodos cromatográficos; para *S. bulbosus* fue posible obtener los compuestos puros. Se determinó la actividad antioxidante, por el método del DPPH; la actividad antibacteriana y antifúngica, por el método de difusión en disco y el método de dilución en tubo; la actividad anticiclooxigenasa, por el bioensayo colorimétrico usando el Kit Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay; y la actividad antitopoisomerasa, usando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente (JN394, JN362a, JN394t₁, JN394t₂₋₁ y JN394t₂₋₅).

Los tratamientos (extractos, fracciones y compuestos puros) con mayor eficiencia antirradicalaria, en relación al ácido ascórbico, fueron las fracciones de *A. cuspidata* AaA18 (29.1%), AaA17 (27.13%), AaA19 (27.01%) y la fracción de *E. michuacana* EbA3 (22.77%). En el ensayo antimicrobiano, la fracción EbA3 presentó actividad en amplio espectro de microorganismos; las fracciones AaA5 y AaA6 presentaron actividad antibacteriana similar a los presentados por antimicrobianos clínicos sobre las cepas *Staphylococcus epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae*; se realizó un fraccionamiento biodirigido de AaA5-6, obteniéndose fracciones con actividad antimicrobiana de amplio espectro. En el ensayo anticiclooxigenasa, el extracto de *S. bulbosus* Ste (IC₅₀=1.49 mg/mL) presentó inhibición selectiva sobre COX2. Por otro lado, los tratamientos Ste, Ste1, Ste3, AaA8, AaA5-6_D, AaA5-6_B, AaA5-6_B1 y AaA5-6_C presentaron actividad antitopoisomerasa I.

Las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de *E. michuacana* y *A. cuspidata*, aunadas a las propiedades antitopoisomerasa de *A. cuspidata* indican la presencia de compuestos que podrían contribuir en la prevención y tratamiento del cáncer. Por lo anterior, es necesario continuar con esta línea de investigación para aislar los compuestos bioactivos.

Con todo el amor y cariño

Dedico este trabajo a mi familia:

Papá (José Herrera)

Mamá (Lucía Martínez)

hermanos:

Pepe (Jose Luís)

Lin (Carlos Orbelín)

Juan (Juan Lorenzo)

Pino (Wilmer Gersaí)

y Bille (Francisco Gerardo)

cuñada:

Clara

AGRADECIMIENTOS

Sin carrera no habría tenido que hacer la tesis, así que eres tú a la primera que tengo que agradecer mamá. Tengo muy claro el esfuerzo sobrehumano que hiciste para pagarme mis estudios académicos. Gracias.

Hasta hoy comprendo que un proyecto, es el resultado del trabajo en conjunto. Por ello, le agradezco a todos aquellos que participaron en esta tesis. Especialmente, al Dr. J. Marco Vinicio Ramírez Mares, por aceptarme como tesista y con ello cederme todos los beneficios derivados de ello. A la Dra. Beatriz Hernández Carlos, por todas sus enseñanzas y por la beca otorgada. Ambos han sido excelentes guías en este proyecto, gracias por TODO. A mi tío Nicolás Herrera, por brindarme alojamiento durante la realización de la tesis. A Promep (Proyecto 2IR0805) y Becanet Superior, por las becas otorgadas a la presente. Al Dr. John Nitiss por proporcionar rápidamente las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; al Herbario UNAM FES IZTA por la determinación taxonómica de los ejemplares botánicos. A mi alma Mater, la Universidad del Mar y todo lo que ella engloba, por la formación académica y facilidades otorgadas. A mis compañeros de generación, principalmente a Celi y Yadi, por apoyarme con el papeleo en Pto. Escondido. Le agradezco infinitamente a los revisores: M. en C. Mónica M. Galicia Jiménez, Dr. Héctor Santiago Romero, Dr. José Luis Villarruel y M. en C. Guillermo Sánchez de la Vega, por contribuir enormemente al mejoramiento de este escrito. Y por supuesto, a todos aquellos que conocí durante el desarrollo de la tesis, gracias por hacer de esta etapa, una extraordinaria aventura.



ÍNDICE

	Página
RESUMEN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ABREVIATURAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ECUACIONES	xv
ÍNDICE DE CUADROS	xvi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Diversidad vegetal de México	2
2.1.1 Uso tradicional de plantas	2
2.1.2 Plantas medicinales de Oaxaca	2
2.2 Metabolitos secundarios	3
2.2.1 Principios activos	4
2.3 Aislamiento de fitoquímicos	5
2.3.1 Selección de material vegetal	5
2.3.2 Extracción	5
2.3.3 Separación de compuestos	6
2.3.4 Elucidación de estructuras	6
2.3.5 Bioensayos	6
2.4 Cáncer	7
2.4.1 Radicales libres y antioxidantes	7
2.4.2 Resistencia a fármacos	9
2.4.2.1 Cepas patógenas	9
2.4.2.2 Antimicrobianos	10
2.4.2.3 Determinación de la actividad antimicrobiana	10
2.4.3 Ciclooxygenasas	11
2.4.3.1 Antiinflamatorios no esteroideos	12
2.4.3.2 Inhibidores ciclooxygenasa selectivos	13
2.4.3.3 Determinación de actividad anticiclooxygenasa	13
2.2.4 ADN topoisomerasas	14

2.2.4.1	Compuestos antitopoisomerasa	15
2.2.4.2	Modelo de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.2.4.2.1	Cepa JN394	18
2.2.4.2.2	Cepa JN362a	18
2.2.4.2.3	Cepa JN394 _{t-1}	18
2.2.4.2.4	Cepa JN394 _{t2-5}	18
2.2.4.2.5	Cepa JN394 _{t2-1}	18
2.5	Material botánico	19
2.5.1	<i>Sicyos bulbosus</i> Rodríguez-Arévalo, Lira & Dávila	19
2.5.2	<i>Encyclia michuacana</i> (Lex) Schltr.	20
2.5.3	<i>Acalypha cuspidata</i> Jacq.	22
3	JUSTIFICACIÓN	26
4	OBJETIVOS	26
4.1	Objetivo general	26
4.2	Objetivos específicos	26
5	MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1	Material biológico	27
5.2	Material vegetal	28
5.2.1	Colecta y determinación taxonómica	28
5.2.2	Obtención de extractos	28
5.3	Separación	29
5.3.1	<i>Sicyos bulbosus</i>	30
5.3.2	Compuestos puros	30
5.3.3	<i>Encyclia michuacana</i> y <i>Acalypha cuspidata</i>	31
5.4	Evaluación biológica	31
5.4.1	Preparación de los tratamientos	31
5.4.2	Ensayo antioxidante	32
5.4.2.1	Método cualitativo	32
5.4.2.2	Método cuantitativo	32
5.4.2.2.1	Máximo de absorbencia del DPPH	33
5.4.2.2.2	Curva de calibración del DPPH	33
5.4.2.2.3	Eficiencia antirradicalaria del ácido ascórbico	33
5.4.2.2.4	Obtención de la eficiencia antirradicalaria de los extractos, fracciones y compuestos puros	34

5.4.3	Ensayo antimicrobiano	35
5.4.3.1	Preparación del estándar de McFarland	35
5.4.3.2	Activación del inóculo	35
5.4.3.3	Inoculación de placas	36
5.4.3.4	Concentración mínima inhibitoria	37
5.4.3.4.1	Preparación del inóculo	37
5.4.3.4.2	Preparación de los tratamientos	38
5.4.3.4.3	Inoculación de tubos	39
5.4.3.4.4	Obtención de la concentración mínima inhibitoria	39
5.4.4	Ensayo anticiclooxigenasa	39
5.4.5	Ensayo antitopoisomerasa	40
5.4.5.1	Incubación de cepas	40
5.4.5.2	Conteo celular y ajuste de concentración	41
5.4.5.3	Aplicación de tratamientos	41
5.4.5.4	Determinación de viabilidad	41
5.4.6	Análisis estadístico	42
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1	Determinación taxonómica de especies vegetales	43
6.2	Obtención de extractos	43
6.3	Obtención de fracciones	43
6.3.1	<i>Sicyos bulbosus</i>	44
6.3.2	<i>Encyclia michuacana</i> y <i>Acalypha cuspidata</i>	46
6.4	Evaluación antioxidante	48
6.4.1	Método cualitativo	48
6.4.2	Método cuantitativo	50
6.4.2.1	Curva de calibración del DPPH	50
6.4.2.2	Eficiencia antirradicalaria del ácido ascórbico	51
6.4.2.3	Obtención de la AE de los extractos y fracciones	53
6.5	Evaluaciones antimicrobianas	56
6.5.1	Preparación del ensayo antimicrobiano	56
6.5.2	Preparación de las muestras	57
6.5.3	<i>Sicyos bulbosus</i>	57
6.5.4	<i>Encyclia michuacana</i>	59

6.5.5	<i>Acalypha cuspidata</i>	61
6.5.6	Determinación de la concentración mínima inhibitoria	63
6.5.7	Fraccionamiento biodirigido de antimicrobianos	66
6.5.8	Amplio espectro de actividad antimicrobiana	69
6.6	Evaluación anticiclooxigenasa	70
6.7	Evaluación antitopoisomerasa	72
6.7.1	<i>Sicyos bulbosus</i>	73
6.7.2	<i>Encyclia michuacana</i>	78
6.7.3	<i>Acalypha cuspidata</i>	79
7	CONCLUSIONES	84
8	REFERENCIAS	86
9	ANEXOS	104

ABREVIATURAS

[mg/mL]_m	Concentración máxima de los tratamientos (mg/mL) para obtener la concentración mínima inhibitoria
AA	Ácido ascórbico
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Eficiencia antirradicalaria
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
APS	Fase estacionaria de aminopropilo
ArA	Ácido araquidónico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ARP	Poder antirradical
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
C	Clasificación de sensibilidad
C₁₈	Fase estacionaria de octadecilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COX	Ciclooxigenasa
COX 1	Ciclooxigenasa 1
COX 2	Ciclooxigenasa 2
CPT	Camptotecina
D	Diámetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidracilo
EC₅₀	Concentración efectiva 50
ETP	Etopósido
EtOH	Etanol
g	Gramos
H₂O	Agua

Hx	Hexano
IL-1 a	Interleucina1 a
IL-1 b	Interleucina 1 b
L	Litro
MeOH	Metanol
MeOH^o	Metanol grado espectrofotométrico
m	Metros
Mv	Milivolts
n	Número
n´	Número, diferente a n
PVDF	Polivinilidenofluoruro
(PG)G₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
Rf	Factor o índice de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas del oxígeno
s	Segundos
σ	Desviación estándar
SBZ	Suboxozane
T	Tratamiento
TEC₅₀	Tiempo de estabilización a la concentración efectiva 50
TOP	Topoisomerasa
TOP I	Topoisomerasa I
TOP II	Topoisomerasa II
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNAM FES IZTA	Universidad Nacional Autónoma de México en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

INDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Recolección de plantas medicinales por indígenas de Oaxaca	3
Figura 2	Acciones de la COX1 y COX2	12
Figura 3	Estructura química de AINES no selectivos y selectivos	13
Figura 4	Mecanismo de acción de la TOP I	15
Figura 5	Mecanismo de acción de la TOP II	16
Figura 6	Estructura química de la CPT y ETP	17
Figura 7	<i>Sicyos bulbosus</i>	19
Figura 8	Estructura química del compuesto aislado de <i>S. bulbosus</i>	20
Figura 9	<i>Encyclia michuacana</i>	21
Figura 10	Compuestos aislados de <i>E. michuacana</i>	22
Figura 11	<i>Acalypha cuspidata</i>	23
Figura 12	Ejemplares enviados al Herbario UNAM FES IZTA	28
Figura 13	Material vegetal secando a temperatura ambiente y sin luz	29
Figura 14	Proceso de obtención del extracto crudo	29
Figura 15	Cromatograma del extracto de <i>S. bulbosus</i>	30
Figura 16	Criterio para mezclar fracciones colectadas por CCA	31
Figura 17	Dilución de la concentración del tratamiento para encontrar la EC ₅₀	34
Figura 18	Ajuste de turbidez del inóculo de <i>K. pneumoniae</i> con el estándar de McFarland	36
Figura 19	Placa etiquetada y halos de Inhibición formados después de la Incubación en el ensayo antimicrobiano	37
Figura 20	Diluciones en tubo para la obtención de la CMI	38
Figura 21	Apreciación de la CMI	39
Figura 22	Número de UFC crecidas en las placas, representando 5 diluciones decimales	42

Figura 23	Cromatograma de las fracciones de <i>S. bulbosus</i>	45
Figura 24	Cromatograma de los compuestos puros de <i>S. bulbosus</i>	45
Figura 25	Estructura química de los compuestos puros de <i>S. bulbosus</i>	46
Figura 26	Curva de calibración del DPPH y ecuación de la línea de tendencia	51
Figura 27	Cinética del AA y obtención de la ecuación para calcular la EC ₅₀	52
Figura 28	CCF de fracciones de <i>E. michuacana</i>	55
Figura 29	Diámetro del halo de inhibición de los tratamientos de <i>E. michuacana</i> sobre las cepas <i>S. epidermidis</i> y <i>K. pneumoniae</i>	60
Figura 30	Diámetro del halo de inhibición de los tratamientos de <i>A. cuspidata</i> sobre las cepas <i>S. epidermidis</i> y <i>K. pneumoniae</i>	63
Figura 31	CCF de fracciones de <i>A. cuspidata</i>	66
Figura 32	Porcentaje de inhibición de los tratamientos de <i>S. bulbosus</i> sobre la cepa JN394	73
Figura 33	Porcentaje de inhibición de los tratamientos de <i>S. bulbosus</i> sobre la cepa JN362a	74
Figura 34	Porcentaje de inhibición de los tratamientos de <i>S. bulbosus</i> sobre la cepa JN394t ₁	76
Figura 35	Porcentaje de inhibición de los tratamientos de <i>S. bulbosus</i> sobre la cepa JN394t ₂₋₅ a 25 °C	77
Figura 36	Porcentaje de inhibición de los tratamientos de <i>E. michuacana</i> contra la cepa JN394	78
Figura 37	Porcentaje de inhibición de Ebp y EbA3 sobre las cepas JN362a, JN394t ₁ y JN394t ₂₋₅	79
Figura 38	Porcentaje de inhibición de los extractos y fracciones de <i>A. cuspidata</i> sobre la cepa JN394	79
Figura 39	Porcentaje de inhibición de los extractos y fracciones de <i>A. cuspidata</i> sobre la cepa JN362a	80
Figura 40	Porcentaje de inhibición de AaA7 y AaA8 sobre JN394t ₁ y JN394t ₂₋₅	81

Figura 41	Porcentaje de inhibición de las fracciones de AaA5-6 sobre la cepa JN394	82
Figura 42	Porcentaje de inhibición de las fracciones AaA5-6 sobre la cepa JN362a	82
Figura 43	Porcentaje de inhibición de fracciones AaA5-6 sobre las cepas JN394t ₁ y JN394t ₂₋₅	83

ÍNDICE DE ECUACIONES

		Página
Ecuación 1	Modelo de reacción entre el DPPH y un antioxidante	8
Ecuación 2	Porcentaje de DPPH remanente	33
Ecuación 3	Cálculo de la AE	34
Ecuación 4	Porcentaje de inhibición enzimática (ciclooxigenasa)	40
Ecuación 5	Porcentaje de inhibición del tratamiento evaluado sobre la cepa de <i>S. cerevisiae</i>	42
Ecuación 6	Fórmula y obtención de la molaridad de la concentración 0.12 mg/mL del DPPH	50
Ecuación 7	Cálculo de los μg de AA necesarios para disminuir el DPPH al 50% y su respectiva concentración	52
Ecuación 8	Cálculo de la EC_{50}	52
Ecuación 9	Determinación de la eficiencia antirradicalaria del AA	53

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1	Compuestos obtenidos de especies del género <i>Acalypha</i> 24
Cuadro 2	Actividad biológica de algunas especies del género <i>Acalypha</i> 24
Cuadro 2	Actividad biológica de algunas especies del género <i>Acalypha</i> (Continuación) 25
Cuadro 3	Descripción de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> 27
Cuadro 4	Clasificación cualitativa de la actividad antioxidante 32
Cuadro 5	Rendimiento porcentual de los extractos crudos 43
Cuadro 6	Ejemplos de simbología usada para la identificación de extractos, fracciones y compuestos puros 44
Cuadro 7	Disolución de compuestos puros en DMSO 46
Cuadro 8	Cantidad obtenida de extractos y fracciones finales 47
Cuadro 9	Clasificación cualitativa de la actividad antioxidante en extractos y fracciones 48
Cuadro 10	Clasificación cualitativa de la actividad antioxidante en compuestos puros de <i>S. bulbosus</i> 49
Cuadro 11	Valores de Molaridad y Absorbencia de las soluciones del DPPH 51
Cuadro 12	Porcentaje de DPPH remanente de cada concentración de AA 52
Cuadro 13	Valores de EC ₅₀ y AE de extractos y fracciones 54
Cuadro 14	Concentración de los extractos y fracciones para el ensayo antimicrobiano 57
Cuadro 15	Halos de inhibición del extracto y fracciones de <i>S. bulbosus</i> vs cepas patógenas 58
Cuadro 16	Halos de inhibición de compuestos puros de <i>S. bulbosus</i> vs cepas patógenas 58
Cuadro 17	Halos de inhibición del extracto y fracciones de <i>E. michuacana</i> vs cepas patógenas 59

Cuadro 18	Halos de inhibición del extracto y fracciones de <i>A. cuspidata</i> vs cepas patógenas	62
Cuadro 19	CMI de los tratamientos con actividad antimicrobiana	64
Cuadro 20	Fracciones colectadas por la separación de la fracción AaA5-6	67
Cuadro 21	Actividad antimicrobiana de las fracciones de AaA5-6	68
Cuadro 22	Tratamientos con actividad antimicrobiana en amplio espectro de microorganismos	69
Cuadro 23	Porcentaje de inhibición de tratamientos frente a la COX1 y COX2	70
Cuadro 24	IC ₅₀ de tratamientos anticiclooxigenasa I o II	72
Cuadro 25	Concentración de los extractos y fracciones para el ensayo antitopoisomerasa	72