



Universidad del Mar
Campus Puerto Escondido

**Estudio químico y evaluación de la actividad
antitopoisomerasa y antimicrobiana de**

Alloispermum integrifolium

(DC.) H. Rob

T E S I S

Que para obtener el Título Profesional de
Licenciada en Biología

P r e s e n t a

MIRIAM ROJAS ORIZONTE

Directora

Dra. Beatriz Hernández Carlos

Puerto Escondido, Oaxaca, abril del 2017

RESUMEN

En el estado de Oaxaca, sin duda alguna existe una gran cantidad de especies vegetales que faltan por estudiar química y biológicamente; ya que estas pueden presentar compuestos contra enfermedades degenerativas como el cáncer y las enfermedades infecciosas. El objetivo de la presente investigación fue obtener compuestos puros y evaluar la posible actividad biológica del extracto metanólico y fracciones de la parte aérea de *Alloispermum integrifolium*. La parte aérea se secó a temperatura ambiente y se puso a macerar con metanol para posteriormente filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida. El procedimiento seguido para la obtención de las fracciones se planteó a manera de obtener fracciones de diferente polaridad y por lo tanto con menor complejidad de acuerdo a la solubilidad del extracto con acetato de etilo. Se obtuvieron cuatro fracciones de interés (*AiFverde*, *Aiclorofila*, *AiFamarilla* y *Aipp*), las cuales fueron evaluadas para determinar la actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*, empleando los métodos de difusión en agar y de dilución en tubo para calcular la concentración mínima inhibitoria, como control positivo se utilizó el cloranfenicol y dimetilsulfóxido como control negativo. La mejor fracción candidata a seguir evaluando es la *AiFverde* ya que presentó valores de concentración mínima inhibitoria más bajos, contra las cepas *S. epidermidis* 2.786 (mg/mL), *P. vulgaris* 2.786 (mg/mL), *P. mirabilis* 1.393 (mg/mL), *K. pneumoniae* 2.786 (mg/mL).

Para determinar la actividad antitopoisomerasa se emplearon las mismas fracciones y se evaluó la inhibición/crecimiento de la expansión clonal, utilizando las cepas JN394 y JN362a de *Saccharomyces cerevisiae*. Como control negativo se utilizó el dimetilsulfóxido, mientras que para el control positivo se emplearon la camptotecina como inhibidor de la topoisomerasa I y el etoposido como inhibidor de la topoisomerasa II. Los resultados indican que todas las fracciones pueden ser candidatas para aislar compuestos activos con actividad antitopoisomerasa.

La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó por análisis de los espectros de RMN de ^{13}C , identificandose el β -sitosterol y estigmasterol.

DEDICATORIA



A mis padres **Nicolás** e **Isabel** ya que gracias a su apoyo, pude lograrlo. A mis hermanos, **Yadira**, **LLamel**, **Adrián**, **Abigail**, **Daniela** y **Evelyn** son el motor que me impulsa a seguir. Los admiro y amo muchísimo, por eso y mucho más les dedico el presente trabajo.



...pero para un biólogo los metabolitos secundarios son compuestos puros,
perfectos, poderosos con gran complejidad estructural, un regalo de la
naturaleza y un secreto de la vida interminable por descubrir.

AGRADECIMIENTOS

No me alcanzarían las hojas para escribir mis agradecimientos a cada persona que directa o indirectamente influyó para realizar y culminar este trabajo.

Porque no ha sido por mi esfuerzo o inteligencia lograr esta meta, sino por tu gracia, te agradezco infinitamente a ti **Dios**, ya que siempre estás conmigo.

A mis **padres** por su confianza y apoyo que me dan día a día, porque a través de sus consejos me inspiran a ser mejor persona a no conformarme con lo que tengo, sino ir por más hasta alcanzar el éxito. A mis **hermanos** porque me han demostrado que todo absolutamente todo lo podemos lograr, solo es cuestión de esforzarnos un poco más, todos son un gran ejemplo para mí desde la mayor hasta la pequeña, los amo. A todos mis **amigos** que me han ayudado a seguir y a ver los obstáculos como retos para vencerlos, como olvidar aquellas palabras de esos amigos con los que inicie la carrera: ***¡regresarás a casa hasta que tengas el título solo hasta entonces, no antes, así que enfócate!***. A la **Dra. Laura, Lidia y Claudia** amigas del alma que siempre están allí apoyándome, a mis **compañeros** de la universidad que por cinco años fueron apoyo en muchas áreas, a **Leslie** por su ayuda en los experimentos y fotografías, a mis buenos amigos y conocidos, infinitamente gracias. Respectivamente a:

A la Dra. **Beatriz Hernández Carlos**, por su confianza, dedicación, orientación y apoyo para la realización de este trabajo e impulsarme a ver más allá, a ir por más, es un gran ejemplo de persona a seguir, siempre estaré agradecida por todo, gracias muchas gracias.

Al Dr. **Marco Vinicio Ramírez Mares**, por sus consejos y enseñanzas para realizar este trabajo, muchas gracias. A los revisores de esta Tesis: M.C. **Mónica Alicia Calderón Oropeza**, Dr. **Luis David Maldonado Bonilla** y Dr. **José Luis Villarruel Ordaz**, por su contribución a este trabajo.

A todos mis **maestros** que conocí durante mi estancia en la UMAR, por su participación en mi formación universitaria, por hacerme ver parte de mi potencial a través de cada prueba que se presentaba.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ABREVIATURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Clasificación e importancia de los metabolitos secundarios.....	3
2. Fitoquímica de la familia Asteraceae.....	4
2.1 Material botánico.....	5
3. El cáncer.....	7
3.1 Agentes anticancerígenos derivados de especies vegetales.....	8
3.2 Topoisomerasas	11
3.3 Inhibidores de las topoisomerasas	14
3.4 Métodos para el estudio de la actividad citotóxica <i>in vitro</i>	18
4. Enfermedades infecciosas.....	20
4.1 Agentes microbianos importantes desde el punto de vista clínico.	20
4.2 Antibióticos	21
4.3 Mecanismos de resistencia	22
4.5 Metabolitos con actividad antimicrobiana.....	23
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	25
1. Objetivo general.....	25
2. Objetivos específicos	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	25
1. Recolección del material vegetal	25
2. Obtención del extracto metanólico	25
3. Fraccionamiento del extracto metanólico	26
4. Separación de compuestos	27
5. Elucidación estructural.....	28
6. Bioensayos	29

6.1 Tratamientos y controles	29
6.2 Actividad antimicrobiana	29
6.3 Actividad antitopoisomerasa	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
1. Obtención del extracto y de las fracciones	37
2. Purificación de compuestos	37
2.1 Caracterización del β -sitosterol	39
2.2 Caracterización del estigmasterol	42
3. Evaluación de la actividad antimicrobiana	45
4. Evaluación de la actividad antitopoisomerasa	48
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. PERSPECTIVA	52
IX. BIBLIOGRAFÍA	53
X. ANEXOS	65

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de etilo
Aiclorofilas	Precipitado de <i>AiFverde</i>
Aiextracto	Extracto crudo
AiFamarilla	Fracción soluble en MeOH
AiFverde	Fracción soluble en Acetato de etilo
Aipp	Precipitado de <i>AiFamarilla</i>
CC	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CTP	Camptotecina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
ETP	Etopósido
Hx	Hexano
MeOH	Metanol
MH	Mueller-Hinton
CMI	Concentración mínima inhibitoria
MS	Metabolitos secundarios
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UFC	Unidades formadoras de colonia
YPD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa
YPDA	Medio sólido de YPD con Bacto agar al 1.75 %

I. INTRODUCCIÓN

México es un país rico en biodiversidad que ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en diversidad florística. Centrándonos en Oaxaca, el estado de mayor diversidad vegetal, con más de 10,000 especies (Villaseñor, 2016) nos proporciona un gran terreno para estudiar nuestra flora de manera química y biológicamente. La enorme diversidad biológica y cultural presente en el estado ha generado un amplio conocimiento de la medicina tradicional, esta propiedad medicinal de las plantas que está determinada por un grupo de pequeñas y variadas moléculas de baja masa molecular a las cuales se les conoce como metabolitos secundarios (MS) y las plantas tienen potencial bioquímico para producir una enorme variedad de metabolitos, por lo que existe la posibilidad del descubrimiento de MS con potencial para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas.

Dentro de las muchas enfermedades que la humanidad enfrenta actualmente, está el cáncer, el cual se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por división celular incontrolable, desordenada y excesiva, provocando anormalidades en el funcionamiento del organismo (Monsalve-Abaca, 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial, por lo que la búsqueda de tratamientos para contrarrestarlo es uno de los campos de la investigación de mayor importancia e interés actual, lo que ha dado lugar a una gran variedad de fármacos quimioterapéuticos con diferentes mecanismos de acción. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos químicos traen efectos secundarios, como citotóxicos, lo cual es un gran problema, por lo tanto existe una urgente necesidad de generar nuevos fármacos naturales por lo que el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios es imprescindible para la generación de nuevos fármacos con potencial anticancerígeno. Varios estudios han evidenciado que la inhibición de la actividad de la topoisomerasa puede ser usada como blanco terapéutico en la búsqueda de compuesto anticancerígenos (Husain *et al.*, 1994; Monsalve-Abaca, 2012), ya que las células tumorales tienen un elevado nivel de replicación, por consecuencia presentan una alta actividad enzimática por parte de las topoisomerasas, por lo que bloquear esta actividad permite evitar su proliferación. Así mismo, existe la necesidad de descubrir nuevos compuestos antimicrobianos debido al aumento de la incidencia de nuevas y reemergentes enfermedades infecciosas y desarrollo

de resistencia a los antibióticos. Estudios de urocultivo hechos en personas hospitalizadas han mostrado que *Escherichia coli* y otras especies de los géneros *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, se encuentran entre las cepas de mayor relevancia clínica (Orrego *et al.*, 2007; Breña *et al.*, 2009; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010; Van den Bergh *et al.*, 2016).

Por otro lado, la familia Asteraceae, posee una gran cantidad de estudios fitoquímicos, en donde se han reportado una amplia gama de actividades biológicas; a pesar de esto, aún es insuficiente el conocimiento que se tiene de ciertas especies con gran potencial y que aún faltan por estudiarse. Una de estas especies es *Alloispermum integrifolium*, comúnmente conocida como hoja de pescado o la prodigiosa, que crece como maleza a lo largo de las carreteras. Se encuentra catalogada como planta antidiabética mexicana (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Jarald *et al.*, 2008) y en algunas comunidades de Oaxaca la utilizan como medicinal, comestible y saborizante (Luna-José y Rendón-Aguilar, 2008; Sosa *et al.*, 2013).

Como primera aproximación para evaluar el potencial anticancerígeno de *Alloispermum integrifolium*, se evaluó la actividad antitopoisomerasa del extracto y fracciones de la parte aérea en cepas mutantes de *Saccharomyes cerevisiae* (JN394 y JN362a) afectadas en la permeabilidad de la membrana y reparación de ADN. Para evaluar la posible actividad antimicrobiana de esta planta, se realizó el método de difusión en agar y dilución en tubo con las cepas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Proteus vulgaris* (ATCC 49132), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883).

Con este trabajo se contribuirá a la química de *Alloispermum integrifolium* y se proporcionará validez científica al conocimiento empírico que se tiene de esta especie, para determinar su actividad biológica como antitopoisomerasa y antimicrobiana *in vitro*, donde pueden estar presentes MS novedosos, de importancia biológica y con gran impacto farmacológico.