

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS METANÓLICOS Y ALCALOIDEOS DE *Nicotiana
glauca* Gram., *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum*
Dunal”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

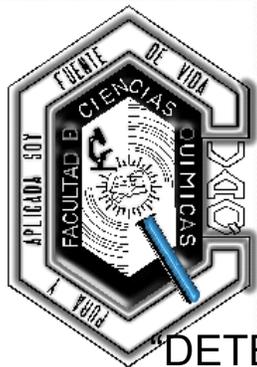
PRESENTA

MARCO ANTONIO MUÑOZ JUÁREZ

DIRIGIDA POR

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS METANÓLICOS Y ALCALOIDEOS DE *Nicotiana
glauca* Gram., *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum*
Dunal”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

MARCO ANTONIO MUÑOZ JUÁREZ

DIRIGIDA POR

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA

SINODALES

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA _____
DIRECTORA

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH _____
SINODAL

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ _____
SINODAL

M. en C. MARÍA DE LOS ÁNGELES MUÑOZ _____
SINODAL

INDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Radicales libres y su relación con enfermedades	3
II.2 Nombres comunes y descripción general de las plantas objeto de Estudio	8
II.2.1. <i>Nicotiana glauca</i> Gram.	8
II.2.2 <i>Nicotiana trigonophylla</i> Dunal	13
II.2.3 <i>Solanum rostratum</i> Dunal	15
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	
IV.1 General	19
IV.2 Específicos	19
V. METODOLOGÍA	20
V.1 Materiales y reactivos	20
V.2 Métodos	21
V.2.1 Recolección del material vegetal	21
V.2.2 Preparación de los extractos metanólicos de <i>N. glauca</i> , <i>N. trigonophylla</i> y <i>S. rostratum</i>	21
V.2.3 Preparación de los extractos alcaloideos de <i>N. glauca</i> , <i>N. trigonophylla</i> y <i>S. rostratum</i>	22
V.2.4 Determinación de la Actividad Antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos.	23
VI. RESULTADOS	26
VI.1 Recolección del material vegetal	26

VI.2 Preparación de los extractos metanólicos y alcaloideos de <i>N. glauca</i> , <i>N. trigonophylla</i> y <i>S. rostratum</i>	26
VI.3 Determinación de la Actividad Antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos de <i>N. glauca</i> , <i>N. trigonophylla</i> y <i>S. rostratum</i>	28
VII. DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Formación de radicales libres	3
2	Reducción univalente	4
3	Especies reactivas de oxígeno	5
4	Llenado de la microplaca para la determinación de la actividad antioxidante	23
5	Lugar y fecha de colecta y número de voucher de cada espécimen	25
6	Peso del material vegetal seco y de los extractos obtenidos de <i>Nicotiana glauca</i>	26
7	Peso del material vegetal seco y de los extractos obtenidos de <i>Nicotiana trigonophylla</i>	26
8	Peso del material vegetal seco y de los extractos obtenidos de <i>Solanum rostratum</i>	27
9	CE ₅₀ , E _{max} y concentración máxima efectiva para <i>Nicotiana glauca</i>	28
10	CE ₅₀ E _{max} y concentración máxima efectiva para <i>Nicotiana trigonophylla</i>	29
11	CE ₅₀ , E _{max} y concentración máxima efectiva para <i>Solanum rostratum</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Nicotiana glauca</i> Gram.	9
2	Alcaloides identificados en <i>Nicotiana glauca</i> , <i>Nicotiana trigonophylla</i> y <i>Solanum rostratum</i>	12
3	<i>Nicotiana trigonophylla</i> Dunal	14
4	<i>Solanum rostratum</i> Dunal	15
5	Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto metanólico de la corteza de <i>Nicotiana glauca</i>	29
6	Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto alcaloideo de la corteza de <i>Nicotiana glauca</i>	30
7	Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto metanólico de la raíz de <i>Nicotiana trigonophylla</i>	31
8	Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto alcaloideo del tallo de <i>Nicotiana trigonophylla</i>	31
9	Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto metanólico de la raíz de <i>Solanum rostratum</i>	32
10	Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto alcaloideo de la hoja de <i>Solanum rostratum</i>	33
11	Comparación de la actividad anti-radical de los extractos metanólicos de <i>Nicotiana glauca</i> , <i>Nicotiana trigonophylla</i> y <i>Solanum rostratum</i>	35
12	Comparación de la actividad anti-radical de los extractos alcaloideos de <i>Nicotiana glauca</i> , <i>Nicotiana trigonophylla</i> y <i>Solanum rostratum</i>	36
13	Comparación de la actividad anti-radical de los extractos metanólicos y alcaloideos de <i>Nicotiana glauca</i> , <i>Nicotiana trigonophylla</i> y <i>Solanum rostratum</i>	36

RESUMEN

Nicotiana glauca Gram., *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum* Dunal pertenecientes a la familia de las Solanaceae son plantas reconocidas en el estado de Querétaro por su uso en la terapia contra la inflamación. El efecto terapéutico depende evidentemente de la naturaleza y abundancia de los constituyentes químicos de las plantas. En el caso de la inflamación, se ha establecido que la actividad antioxidante de esos compuestos es uno de los mecanismos por los que ejercen su efecto esos metabolitos, de manera individual o en conjunto. Numerosos reportes describen la actividad antioxidante que presentan compuestos puros o extractos ricos en compuestos fenólicos o alcaloides, los cuales constituyen un gran potencial para el tratamiento de muchos padecimientos. En el presente trabajo, se determinó la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos de cada una de las partes de las plantas citadas inicialmente. A una concentración máxima efectiva de 5 mg/mL, los extractos metanólicos de las diferentes partes de *Nicotiana glauca* presentaron un porcentaje de inhibición del radical DPPH comprendida entre el 70% y 97%, siendo la flor la parte más activa, con una CE_{50} de 705.7 $\mu\text{g/mL}$. A la misma concentración, los extractos metanólicos de *N. trigonophylla* presentaron un porcentaje de inhibición del radical DPPH comprendida entre el 42% y 68% y la parte más activa fue la flor con una CE_{50} de 1526 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, los extractos de igual naturaleza que se obtuvieron de *S. rostratum*, a la misma concentración, presentaron un porcentaje de inhibición del radical DPPH comprendida entre el 81.80% y 95.85% y la parte más activa fue la raíz con una CE_{50} de 1146 $\mu\text{g/mL}$. En general, los extractos alcaloideos de cada una de las partes de estas tres plantas presentaron un bajo porcentaje de inhibición y por consiguiente la CE_{50} no pudo ser calculada a la concentración medida en este estudio.

I. INTRODUCCIÓN

La producción continua de especies reactivas de oxígeno, entre ellas radicales libres, es un proceso constante y continuo de la célula. Todas las células inevitablemente se encuentran produciendo estas moléculas con electrones desapareados, y generando también antioxidantes endógenos para contrarrestar los efectos nocivos de dichas especies reactivas. En ciertas situaciones extremas, estas defensas no son suficientes y las especies reactivas producen daño oxidativo, tanto en biomoléculas como en componentes celulares. El daño que se provoque está directamente relacionado con el desequilibrio entre ambas especies, radicales libres y antioxidantes. Sin embargo, el estrés oxidativo ocurre en seres vivos, que por mala nutrición y/o enfermedades, sufren desequilibrio entre radicales libres y antioxidantes.

El daño oxidativo se relaciona con el origen y desarrollo de ciertas enfermedades multifactoriales de carácter crónico, como la enfermedad cardiovascular, los procesos de inflamación, el cáncer, enfermedades neurodegenerativas etc. Se sabe con certeza que los constituyentes de las plantas tales como polifenoles, tocoferoles, alcaloides, taninos, carotenoides, terpenoides, y minerales son responsables de los efectos nutricionales o medicinales que ellas presentan. La manera como estos compuestos actúan sobre la salud es a través de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, antidiabética, antienvjecimiento etc.

En base a todas las investigaciones y a la tradición herbolaria, el uso de plantas como terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de muchos padecimientos por la población de escasos recursos. Es conocida la relación existente entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (que provocan estrés oxidativo) con las enfermedades inflamatorias, por lo tanto, existe una relación muy estrecha entre las plantas que tienen capacidad antioxidante y su actividad antiinflamatoria.

Las plantas *Nicotiana glauca* Gram., *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum* Dunal son usadas en las comunidades de El Encino, Aguacatlán, Pinal de Amoles, San Antonio de la Cal y Tolimán del estado de Querétaro para tratar la inflamación de cualquier parte del cuerpo o intestinal, por lo cual en el

presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante de las plantas anteriormente citadas como parte de un proyecto en el cual se estudiará la relación entre la actividad antioxidante y la actividad antiinflamatoria de 5 plantas usadas en la medicina tradicional del estado de Querétaro.

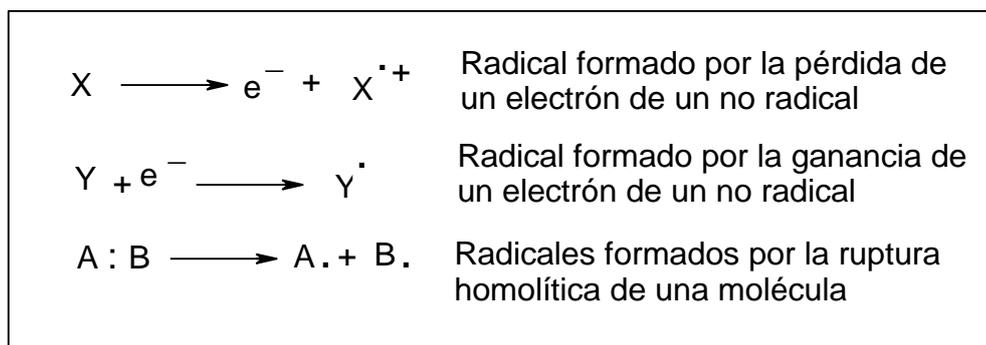
II. ANTECEDENTES

II.1 Radicales libres y su relación con enfermedades

El oxígeno molecular (O₂) es uno de los gases más importantes de la tierra, constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua del mar y al menos el 47% de la corteza terrestre. El oxígeno no solo se requiere en el proceso respiratorio sino también en el metabolismo celular; hay muchas enzimas que también lo utilizan. Además el oxígeno juega un papel esencial en la química de los radicales libres.

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, que contenga uno o más electrones desapareados (que ocupan por sí mismos un orbital molecular ó atómico), ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por ruptura homolítica de una molécula (Cuadro 1).

Cuadro 1. Formación de radicales libres.



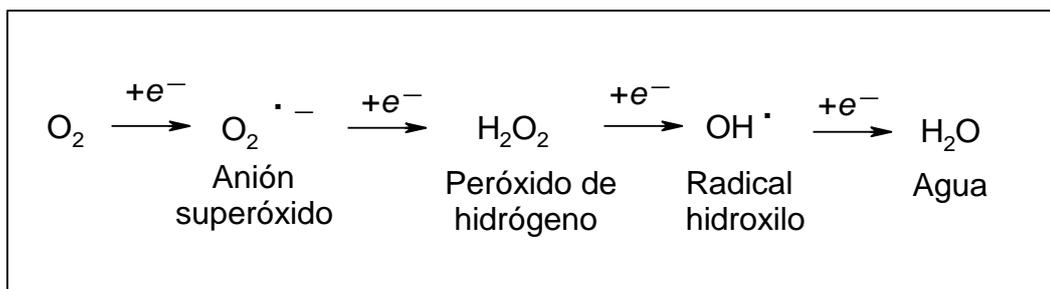
Los RL existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas y los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados de hidrógeno y carbono así como los formados por metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros.

Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aeróbicos, a altas concentraciones ó bajo ciertas condiciones a la concentración normal llega a ser tóxico. A este hecho contrastante se le conoce como la “paradoja del oxígeno”. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las especies reactivas del oxígeno (EROs).

Estas especies son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete. Las principales especies son: (a) las que se producen por la ruptura o excitación del oxígeno (oxígeno atómico, ozono y el oxígeno singulete) y (b) las parcialmente reducidas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) (Hansberg, 2002).

En el transcurso de la respiración aeróbica las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O . A la adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno se le conoce como reducción univalente (Cárdenas y Pedraza, 2006) (ver reacción en el Cuadro 2), la cual genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucran 4 electrones, produciendo tres compuestos denominados especies reactivas de oxígeno.

Cuadro 2. Reducción univalente



El H_2O_2 no es un radical pero cae en la categoría de EROs por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los RL ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición (principalmente el Fe^{2+}) para producir OH^{\cdot} (Halliwell y Gutteridge, 1999). Además del O_2 , el nitrógeno también es capaz de formar RL como dos óxidos: óxido nítrico (NO^{\cdot}) y dióxido nítrico (NO_2^{\cdot}), conformando las llamadas especies reactivas del nitrógeno (ERNs) (Dröge, 2002). A su vez, los radicales OH^{\cdot} son capaces de reaccionar con las biomoléculas, produciendo RL orgánicos menos reactivos, como los peróxidos (ROO^{\cdot}) y radicales tiol (SH^{\cdot}). Por su parte, el $O_2^{\cdot -}$ y NO^{\cdot} reaccionan entre sí para formar peroxinitrito ($ONOO^-$).

Así, la presencia de las EROs ha sido asociada al proceso de envejecimiento, a los daños ocasionados por la isquemia-reperfusión y a una amplia diversidad de

estados patológicos como la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, la hipertensión, la catarogénesis y la carcinogénesis, entre otras.

La expresión “especies reactivas de oxígeno” es un término colectivo que involucra no solo RL derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno y que además son muy reactivos como el H₂O₂ y el HClO (Cuadro 3).

En los organismos aeróbicos, la producción de EROs está controlada por los mecanismos antioxidantes de defensa.

Cuadro 3. Especies reactivas de oxígeno

Radicales	No-radicales
Superóxido O ₂ ^{•-}	Oxígeno singulete (¹ O ₂) forma ¹ Δ
Hidroxilo OH [•]	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
Peroxilo RO ₂ [•]	Ozono (O ₃)
Alcoxilo RO [•]	Anión peroxinitrito (ONOO ⁻)
Hidroperoxilo HO ₂ [•]	Ácido hipocloroso (HClO)
	Ácido hipobromoso (HBrO)

Sin embargo, este equilibrio se pierde cuando hay una excesiva producción de EROs o una deficiencia de los mecanismos antioxidantes, lo que conlleva a daños a las moléculas. Muchas de estas moléculas deben ser reparadas (tal como el ADN) o incluso reemplazadas (tal como muchos tipos de proteínas oxidadas). Así por ejemplo, algunas proteínas, importantes para el metabolismo de *E. coli*, en cuya estructura se encuentra el grupo prostético hierro–azufre (Fe-S), pueden ser dañadas por niveles de 0.1-0.2 μM de O₂^{•-} (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las EROs dañan el ácido desoxirribonucleico (ADN) al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis, y aún enfermedades hereditarias. En relación a esto, se han detectado más de 20 tipos de modificaciones estructurales de las bases. Se ha observado que en presencia de las EROs, se fragmenta el ADN y aparecen fragmentos internucleosomales (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas), ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina y con ello alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción genética.

Otro afecto adverso de las EROs es sobre los lípidos; el principal efecto es la lipoperoxidación que se produce al contacto con los lípidos de las membranas con un agente oxidante como cualquiera de las EROs. En esta reacción, el radical libre formado oxida una cadena insaturada de lípido, dando la formación de un lípido hidroperoxidado y un radical alquilo. El alquilo reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial, constituyendo una reacción que se repite. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad. La peroxidación de los lípidos genera especies como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales son considerados como citotóxicos que pueden funcionar como agentes electrofílicos capaces de interactuar con otros componentes celulares principalmente proteínas y ADN. Cabe mencionar que la lipoperoxidación es un proceso identificado en enfermedades cardiovasculares (Cárdenas y Pedraza, 2006).

Uno de los aspectos más críticos del estrés oxidativo es el daño causado a las proteínas, debido a que puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de vías metabólicas. Los efectos de las EROs sobre las proteínas son: la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. Se ha vinculado una amplia

diversidad de enfermedades con la presencia de las proteínas oxidadas como las enfermedades neurodegenerativas (Cárdenas y Pedraza, 2006).

El desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies oxidantes que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes se denomina estrés oxidativo (EOx), el cual se ha relacionado con el envejecimiento y más de 100 padecimientos ya que las especies reactivas y los radicales libres favorecen la presencia o las complicaciones de enfermedades como: aterosclerosis, diabetes mellitus, procesos inflamatorios, el proceso isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer y diversos tipo de cáncer, entre otros, constituyendo así uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes para explicar dichos procesos morbosos (Harman, 1992).

Para equilibrar la respuesta oxidante, el organismo vivo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato, incluyendo lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN (Sánchez y col., 2004). Los antioxidantes pueden ser compuestos de alto peso molecular como enzimas, polipéptidos, proteínas o compuestos de bajo peso molecular, como las vitaminas A, C y E. Cabe resaltar que algunas de estas vitaminas son obtenidas de la dieta. De la misma manera se conocen otros antioxidantes que son obtenidos también de algunos alimentos de origen vegetal, principalmente frutas y verduras, que contribuyen a prevenir el estrés oxidativo.

Se sabe con certeza que los constituyentes de las plantas tales como polifenoles, tocoferoles, alcaloides, taninos, carotenoides, terpenoides, minerales, etc (Velioglu y col., 1998), son responsables de los efectos nutricionales o medicinales que ellas presentan. La manera como estos compuestos actúan sobre la salud es a través de sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, antidiabética, antienvjecimiento, antioxidante, etc.

Existen numerosos reportes sobre esta última actividad (Soobrattee y col., 2005; Kaur y Kapoor, 2001; Wolf y Christa, 2002; Lykkesfeldt y Svendsen, 2007) donde, se ha concluido que los compuestos protegen al organismo de

enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, osteoporosis, y además presentan efectos biológicos como antihepatotóxicos, antiulcéricos, antimicrobianos y antiinflamatorios (Lee y col., 2006).

Podemos concluir que en base a todas las investigaciones y a la tradición herbolaria, el uso de plantas como terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de muchos padecimientos por la población de escasos recursos. En el estado de Querétaro, en las comunidades de El Encino, Aguacatlán, Pinal de Amoles, San Antonio de la Cal y Tolimán, las plantas *Nicotiana glauca* Gram, *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum* Dunal, son reconocidas por su uso en la terapia contra la inflamación.

Es conocida la relación existente entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (que provocan estrés oxidativo) con las enfermedades inflamatorias (Ródenas y col., 1995), por lo tanto, existe una relación muy estrecha entre las plantas que tienen capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria (García Bacallao y col., 2002).

El propósito del presente trabajo fue preparar por separado los extractos metanólicos y alcaloideos de estas plantas y determinar su actividad antioxidante. A continuación se describe brevemente cada una de las plantas objeto de estudio.

II.2 Nombres comunes y descripción general de las plantas objeto de estudio

II.2.1 *Nicotiana glauca* Gram. (Solanaceae) (Figura 1)

Sinonimia popular:

Nexticxihuitl (náhuatl), "hoja ceniza" xiutecuitlanextli (náhuatl): "yerba para curar empacho". Buena moza, cometón, Don Juan, gigante, guayacán, hierba del gigante, hoja de veneno, hoja gigante, Juan loco, marihuana cimarrona, tabaco cimarrón, mariquiana, mostaza, palo tabaco, palo virgen, tabaco de coyote, tabaquillo, trébol; Distrito Federal: xiutecuitlanextli (náhuatl); Morelos:

nexticxihuitl (náhuatl); Michoacán: tzinyacua; Oaxaca: baldag teo; Puebla: ntagi-gante, kanda xattiyani (popoloca).

Sinonimia botánica:

Siphaulax glabra Raf.; *Nicotidendron glauca* (Grah.) Griseb.



Figura 1. *Nicotiana glauca* Gram. (Tenorio, 2000)

Botánica y ecología:

El tabaco cimarrón es un arbusto pequeño que mide de 1.5 a 3m de altura y que tiene el tallo de color verde-azuloso. Las hojas tienen un soporte largo que las une al tallo y son más largas que anchas, de 5 a 17cm de largo también verde-azul. Las flores son amarillo-verdosas, en forma de trompeta y en grupos poco numerosos. Los frutos son unas cápsulas redondeadas con semillas muy pequeñas comprimidas y cafés.

Esta planta es originaria de Argentina y habita en climas cálido, semicálido y templado, desde los 200 y hasta los 2700 msnm. Es una planta silvestre que crece a las orillas de los caminos o de riachuelos y habita en terrenos de cultivo abandonados o en las calles, en ocasiones asociada a bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosques de encino y de pino.

Etnobotánica y antropología:

El dolor de cabeza de diferentes orígenes es el padecimiento que más frecuentemente se trata mediante el uso de esta planta. También se utiliza en casos de reumas, dolor de muelas, en hinchazones, para desinflamar heridas y la cara. En ocasiones, como ocurre en Sonora y Zacatecas, usan el tabaco cimarrón para aliviar afecciones respiratorias como tos, asma y enfermedad pulmonar.

Son diversas sus formas de preparación, y las hojas son las únicas partes empleadas de la planta: se ocupan sin cutícula y puestas como plantillas o untadas con aceite y colocadas como chiquiadores, o bien, calientes o maceradas en un poco de alcohol, el cual se aplica en las sienes para mitigar el dolor de cabeza. Las hojas machacadas se ponen en la muela cariada cuando hay dolor (a consecuencia de la falta de limpieza bucal). Aplicadas con un poco de alcohol o manteca, a manera de cataplasma, se usa para dolores reumáticos, o se muelen las hojas y después de ponerlas a calentar, se colocan en los senos para el dolor de mamas. Con ellas, se prepara un té que es tomado como agua de tiempo para disminuir la calentura. Para disipela, se colocan las hojas molidas en todo el cuerpo, o aplicadas en forma de emplasto, sirven contra piquetes de hormiga y granos infectados.

En algunas comunidades indígenas del norte, llaman wipana al tabaco silvestre (*Nicotiana glauca*). Sus hojas, las aplican directamente en la cabeza en caso de jaqueca. La superficie, como es pegajosa, se adhiere como emplasto.

Otras afecciones en las que se menciona útil son en problemas de dentadura, golpes, quemaduras, heridas, infecciones de la piel, granos, raspones, erisipela, piojos, garrapatas, granos enterrados, dolores, mareos e infecciones, y en casos de hemorroides.

Historia:

En el siglo XVI, Francisco Hernández relata su uso como antiabortivo, astringente y dentrífico y para tratar la apoplejía pituitaria, las caries, la parálisis de la lengua y contra el veneno. Nicolás Monardes, en el mismo siglo la cita como efectiva para heridas, llagas, dolores de cabeza, envaramientos, dolores de pecho, asma, dolor de estómago, dolor de ijada (dolor de ijar), clisteres, mal

de madre, ahito de niños, para la tenía, dolores de articulaciones, hinchazones, apostemas, dolor de muelas, sabañones (sabañón), para punturas y mordeduras de animales venenosos, llagas viejas, cansancio, “quitan sed y hambre” (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009).

En el siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural la reporta como tóxica. Eleuterio González, a finales del mismo siglo indica que “la usan contra el dolor de cabeza, como revulsivo ligero y calmante”.

Maximino Martínez, en el siglo XX la describe como anticatarral, antiodontálgica, antipodágrica, en apoplejía pituitaria, gingivitis y parálisis de la lengua. Luís Cabrera señala su uso como antiabortivo, antiparasitario, antiespasmódico, antineurálgico y para el asma (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009). Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la menciona como antiparasitaria, excitante, favorecedora del peristaltismo intestinal y analgésica.

Química:

Nicotiana glauca se caracteriza por la presencia de alcaloides, de los cuales se han identificado anabasina en todos los órganos de la planta (Figura 2). Anatabina, nicotina, nor-nicotina, N'-nor-anabasina, 2,3 bupiridina, cotinina, miosmina, nicotelina, óxido de nicotina, ácido nicotínico y 3-acetil-piridina en la planta completa (Khafagy y col., 1968, Galiana y col., 1964, de Leon y Hope, 1962, Barilari, 1958, Pyriki, 1954, Zaher y col., 2009) y amidas (Backheet y Sayed, 2002, Morel y col., 1998). En la hoja se indica la presencia del flavonoide rutína (Badgett, y col., 1949).

Farmacología:

La actividad antimicrobiana de esta planta ha sido evaluada frente a diferentes especies de bacterias, hongos y levaduras (Shabana y col., 1988). Los resultados obtenidos indicaron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* con los extractos etanólico e hidroalcohólico preparados a partir de las partes aéreas de esta planta, y que la respuesta frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus pyogenes* fue muy débil. En el resto de las especies probadas *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina*

lutea, *Aspergillus niger* y *Microsporum gypseum* se obtuvieron resultados negativos (Bhakuni y col., 1974).

Otras actividades biológicas evaluadas en esta planta han sido la actividad antiviral (Van Den Berghe y col., 1978), actividad antitumoral, y efecto abortivo (Bhakuni y col., 1976). Todas ellas resultaron negativas.

Por otra parte, se pudo comprobar actividad citotóxica en un extracto hidroalcohólico preparado a partir de las hojas y los tallos de esta planta (Bhakuni y col., 1974).

En un estudio para detectar la actividad antibiótica del extracto etanólico obtenido de las hojas sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* y el hongo *Candida albicans*, se observó ausencia de actividad (Encarnación y Keer, 1991).

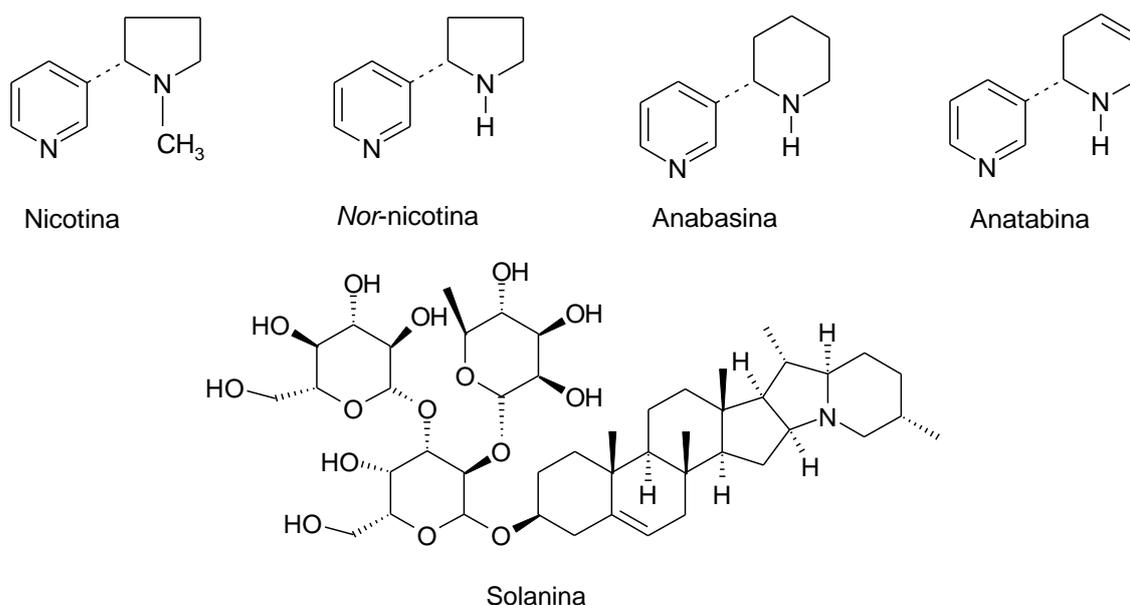


Figura 2. Alcaloides identificados en *Nicotiana glauca*, *Nicotiana trigonophylla* y *Solanum rostratum*.

Toxicidad:

Esta planta ha presentado efectos tóxicos diversos en vacas, puercos y carneros, siendo muy variados los síntomas presentados por los animales al ingerir la planta. Entre ellos se destacan: locomoción irregular, excesiva salivación, temblores, falta de coordinación y colapso.

La actividad teratogénica ha sido comprobada en vacas, puercas y cámaras preñadas, siendo los efectos más frecuentes observados la curvatura de la espina, paladar hendido, así como otras malformaciones esqueléticas (Keeler y col., 1981; Keeler y Crowe, 1985)

En el hombre, la ingestión de una decocción de hojas de la planta provocó diversos síntomas como salivación, diaforesis, dolor de cabeza, mareo, alteraciones en la visión, confusión mental, debilidad y fatiga, hipertensión y parálisis (Schep y col., 2009).

Por otra parte, se ha reportado que la ingestión directa de hojas frescas de la planta le provocó la muerte a un hombre. Al practicársele la autopsia, se diagnosticó que la muerte había sido provocada por envenenamiento con anabasina, un alcaloide presente en diferentes partes de la planta. La concentración en sangre de este alcaloide en la persona muerta fue de 1.15 mg/mL, mucho más baja que la concentración de nicotina que se ha observado en envenenamientos fatales. La ingestión de esta planta ha provocado el envenenamiento de ganado vacuno, caballos, borregos y el caso de que la ingestión de unas cuantas hojas provocó la muerte de un buey y se han descrito casos de envenenamiento de vacas preñadas y cerdos alimentados con 700 mg/kg (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009)

II.2.2 *Nicotiana trigonophylla* Dunal (Solanaceae) (Figura 3)

Sinonimia popular:

Tabaco de coyote, Tabaquillo, tabaquillo delgado, tabaco Papantla.

Sinonimia botánica:

SIIT (SIIT, 2009) y PLANTS (PLANTS, 2010) utilizan el nombre *Nicotiana obtusifolia* var. *obtusifolia* Mertens & Galeotti

Botánica y ecología:

Planta de 30 cm a 1 m de altura; a veces tiene un solo tallo. Las hojas son alargadas y los bordes, ligeramente ondulados. Las flores son tubulares, presentan un color blanco-verduzco o amarillo y están dispuestas en racimos. Los frutos son cápsulas con semillas caféas.



Figura 3. *Nicotiana trigonophylla* Dunal (Tenorio 2000)

Originaria de América boreal y occidental. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, entre los 300 y los 1900 msnm. Planta silvestre asociada a matorral xerófilo, pastizal, bosques de encino y de pino.

Etnobotánica y antropología:

En Durango, sus aplicaciones medicinales incluyen padecimientos respiratorios como tos y asma, así como malestares reumáticos, contra los cuales se aconseja emplear las hojas. En Durango la ocupan para bajar la fiebre y en Puebla como antialcohólico.

Química:

El único estudio químico que se ha realizado sobre *Nicotiana trigonophylla* indica la presencia de alcaloides en esta planta. En las hojas y raíces se encontraron anabasina, anatabina, nicotina y nor-nicotina (Fig. 2) (Saitoh y col., 1985; Bowen, 2006).

Comentarios:

Planta originaria de América de la cual no se detectaron antecedentes de uso medicinal, ni estudios químicos que corroboren su efectividad (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009).

II.2.3 *Solanum rostratum* Dunal (Solanaceae) (Figura 4)



Figura 4. *Solanum rostratum* Dunal (Tenorio, 2000)

Sinonimia popular:

Abrojo, colmillo de puerco, espina amarilla, espinaca del cerro, flor de duraznillo, hierba de la manca mula, hierba del sapo, huevo de chucho, mala mujer, manca mula, mata yegua; Morelos: ayhuixcle; Oaxaca: guiici baloo (zapoteco); Puebla: iztecuate.

Sinonimia botánica:

Nycterium rostratum (Dunal) Link; *Solanum propinquum* Mart. & Galeotti; *Solanum bejarensense* Dunal.

Botánica y ecología:

Planta anual de 70 cm de altura, provista de pelillos y con espinas lisas en toda la planta. Las hojas están divididas o partidas, provistas de espinas en las nervaduras y un poco ásperas. Las flores crecen en racimos y son amarillas. Los frutos conservan el cáliz espinoso, son globosos, manchaditos, con abundantes semillas café-negruzcas.

Es originaria de México, y está presente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 2450 m. Planta abundante de habitats diversos, crece a orilla de los ríos, caminos y cultivos, asociada a

bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino.

Etnobotánica y antropología:

Se usa principalmente para tratar afecciones de los riñones, empleando las hojas y flores hervidas junto con flores de cinco llagas (*Tagetes lunulata*) y aceitilla (*Bidens odorata*), tomada como agua de uso. Para el empacho (enlechado de niños), se hierve con chía china y chía morada (*Salvia* sp.), y se aplica en lavado intestinal. El duraznillo es además empleado en trastornos digestivos, utilizando la infusión de las hojas como purgante. Un té preparado con las flores se recomienda para el dolor de estómago. Mezclado con ramas de chía (*Salvia tiliaefolia*) y epazote de zorrillo (*Chenopodium graveolens*), tomado como agua de tiempo, sirve cuando hay diarrea.

Asimismo, se usan las flores contra la tos y la infusión de las hojas, endulzadas con miel de abeja, para la tosferina, que se describe como tos crónica. El cocimiento de las ramas aplicado en baños se recomienda como antirreumático; Este cocimiento junto con canahuala (*Polypodium aureum*), hierba del golpe (*Gaura coccinea*) y otate macho se ingiere por ocho días, cuando hay golpes externos “que no revientan”. Sin embargo, el cocimiento de las ramas, dejándolo casi hasta consumirse, se usa para combatir la carnosidad de los ojos; definida como excrescencia fibrosa o de tejido vascular desarrollado sobre la córnea transparente del ojo.

Se le menciona como muy útil para aliviar cólicos, fortalecer el cuerpo, desinfectar genitales y contra cáncer y diabetes.

Historia:

A inicios del siglo XVIII Juan de Esteyneffer hace referencia a esta planta sin indicar ningún uso medicinal. Es hasta el siglo XX que Maximino Martínez la señala como antitusígena.

Toxicidad:

Planta tóxica al ganado porque sus hojas y frutos contienen solanina (Oladosu y Case, 1979).

Química:

Un estudio realizado por Bah y colaboradores (2004) permitió el aislamiento e identificación de la metilprotodioscina (Fig. 2) que es una saponina de la familia de los furastanos, la cual es un potente agente antitumoral (Cheng y col., 2003).

Comentarios:

Solanum rostratum es una planta originaria de México de la cual no se encontraron referencias históricas de los usos, ni se han realizado estudios farmacológicos y toxicológicos que determinen con precisión las acciones biológicas de esta planta y la seguridad en su uso (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana 2009).

III. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos y alcaloideos de *Nicotiana glauca* Gram., *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum* Dunal presentan actividad antioxidante.

IV. OBJETIVOS

IV.1 GENERAL

Determinar la actividad antioxidante por el método del DPPH de los extractos metanólicos y alcaloideos de cada parte de las plantas *Nicotiana glauca* Graham, *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum* Dunal.

IV.2 ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos metanólicos y alcaloideos de cada una de las partes de las plantas *N. glauca*, *N. trigonophylla* y *S. rostratum*.
- Estandarizar las curvas para la determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos de cada una de las partes de las plantas *N. glauca*, *N. trigonophylla* y *S. rostratum*.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales y reactivos

- Balanza analítica OHAUS Analytical Plus
- Refrigerador
- Máquina para hacer hielo.
- Matraces volumétricos de 25 mL.
- Frascos de vidrio ámbar
- Viales ámbar
- Matraces bola de 25, 50, 125, 250, y 1000 mL
- Pipetas automáticas de 50, 100, 1000 μ L
- Vasos de precipitados de 50 μ L
- Probetas graduadas de 10 y 100 mL
- Matraces erlenmeyers de 250, 500 y 1000 mL
- Embudos de separación de 250, 500 y 100 mL
- Tiras de papel pH
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Hexano J. T. Baker
- Cloroformo J. T. Baker
- Metanol J. T. Baker
- Acetona J. T. Baker
- Acetato de etilo J. T. Baker
- Ácido clorhídrico Sigma Aldrich
- Hidróxido de amonio Sigma Aldrich
- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma Aldrich Chemical)
- 2,6-di-*t*-butil-4-metilfenol (Sigma Aldrich Chemical)
- Agua destilada
- Lector de ELISA Versamax Microplate reader SoftMax Pro. 2004
- Rotaevaporador r-210/215 marca Buchi Bomba de vacío con bomba de vacío V-700/710 marca Buchi

- Baño de recirculación distillation chiller B-741 marca Buchi
- Controlador de vacío V-850/855 Buchi
- Plato caliente con agitación magnética marca Corning
- Molino manual

V.2 Métodos

V.2.1 Recolección del material vegetal

Las plantas en estado maduro que se utilizaron en este estudio, se colectaron en diferentes localidades del estado de Querétaro. Un espécimen de cada planta fue depositado en el herbario de Querétaro “Dr. Jerzy Rzedowski” (QMEX) situado en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las plantas se secaron a 39 °C, posteriormente se pulverizaron finamente y se guardaron en frascos ámbar para protegerlas de la luz y la humedad a 4° C para los estudios realizados.

Las plantas objeto de estudio fueron: *N. glauca*, *N. trigonophylla* y *S. rostratum*

V.2.2 Preparación de los extractos metanólicos de *N. glauca*, *N. trigonophylla* y *S. rostratum*

Se realizó la limpieza de cada planta cuidando que cada una de las partes de la planta estuviera libre de hongos, plagas y físicamente en buen estado, se separaron cada una de las partes de la planta (raíz, tallo, hoja, flor, fruto, semilla) y se pusieron a secar en un horno de secado a 30° C. Una vez secas, se molieron con ayuda de un molino mecánico hasta obtener un polvo fino. Los polvos se guardaron en frascos ámbar debidamente etiquetados para posteriormente ser utilizados.

Se pesaron 100 g de cada parte de cada una de las plantas, se vertieron en un matraz erlenmeyer de 200 mL y se agregó la cantidad suficiente de metanol de tal manera que el material vegetal quedó completamente cubierto por el disolvente y se dejó en maceración por 48 horas. Se filtró y se colectó el metanol en un frasco ámbar. Los residuos sólidos se sometieron a cuatro extracciones adicionales.

Las fases metanólicas recolectadas se concentraron con ayuda de un rotaevaporador en baño maría a una temperatura de 45°C y a una presión de 122 mm Hg con ayuda de una bomba de vacío. Los extractos metanólicos secos de cada parte de las plantas se pesaron y guardaron en frascos ámbar a 5° C para su posterior uso.

V.2.3 Preparación de los extractos alcaloideos de *N. glauca* y *N. trigonophylla* y *S. rostratum*

De cada parte molida de cada una de las plantas se pesaron 100 g y se vertieron en un matraz erlenmeyer de 200 mL con la cantidad suficiente de hexano, con el fin de desengrasar el material vegetal durante 48 horas a una temperatura de 30°C; se filtró y el hexano se eliminó del extracto. El residuo vegetal se puso a secar nuevamente sobre papel absorbente con el fin de eliminar todo el hexano y se extrajo tres veces con una solución de metanol al 70% durante 48 horas.

Se evaporó la porción alcohólica del extracto total y a la solución acuosa resultante se le agregó ácido clorhídrico 0.1 N hasta ajustar su pH a 4.5; se agregaron 50 ml de cloroformo y la solución se agitó vigorosamente para posteriormente extraer con ayuda de un embudo de separación. Esta extracción se realizó dos veces. A la solución acuosa, se le agregó hidróxido de amonio al 70% hasta ajustar el pH a 11.5. Se le agregaron 50 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente, para luego de reposar la solución, separar las 2 fases. Esta extracción se realizó por duplicado. La fase orgánica se guardó y la fase acuosa se sometió a una nueva extracción (dos veces) con porciones de 50 mL de acetato de etilo, la fase acuosa resultante se desechó.

Las fases orgánicas así obtenidas (cloroformo y acetato de etilo) se concentraron en un rotaevaporador a una temperatura del baño de 40°C y una presión de 240 mm Hg con ayuda de una bomba de vacío hasta completa sequedad. Los extractos así obtenidos se juntaron, se guardaron, a una temperatura de 5° C, en viales ámbar debidamente pesados y etiquetados para su futura utilización

V.2.4 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos fue determinada utilizando como referencia la disolución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acuerdo al método reportado por Fukumoto y Mazza (2000). Las sustancias antioxidantes presentes en los extractos reaccionan con el DPPH, el cual es un radical centrado en el nitrógeno con una absorción característica a 517 nm, y lo convierten en 1,1-difenil-2 picrilhidrazina, debido a la habilidad donadora de hidrógeno de los antioxidantes a una velocidad muy rápida. El grado de decoloración del DPPH indica el potencial para interceptar radicales por parte del antioxidante. Por esta propiedad, el DPPH se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres. En el ensayo, se determina la concentración inicial de DPPH y la final después de añadir el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.

Para la determinación de la actividad antioxidante se preparó una solución de DPPH 150 μM en metanol al 80% para lo cual se pesaron 3.3 mg de DPPH en un matraz volumétrico de 50 ml, se adicionaron 40 ml del disolvente se agitó en el Vortex y se aforó. Esta solución se debe usar recién preparada.

Un control positivo de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) se preparó en concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 μM .

Para la obtención de las soluciones de los extractos usados en el ensayo se prepararon en metanol concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 y 5000 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los extractos metanólicos y alcaloideos.

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de cada una de las partes de las plantas objeto de estudio, en placas de 96 pozos se colocaron alícuotas de 20 μL de cada extracto, 20 μL de agua destilada como control para cada uno de los extractos, 20 μL de metanol grado reactivo como

control para la solución de Trolox, 220 µL de agua y metanol como blanco y 20 µL de Trolox como solución de referencia según se indica en el cuadro 4.

Cuadro 4. Llenado de la microplaca para la determinación de la actividad antioxidante

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O											MeOH
B	H ₂ O	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH					
C	M ₁ C ₁	M ₁ C ₁	M ₁ C ₁	M ₂ C ₁	M ₂ C ₁	M ₂ C ₁	M ₃ C ₁	M ₃ C ₁	M ₃ C ₁	TxC ₁	TxC ₁	TxC ₁
D	M ₁ C ₂	M ₁ C ₂	M ₁ C ₂	M ₂ C ₂	M ₂ C ₂	M ₂ C ₂	M ₃ C ₂	M ₃ C ₂	M ₃ C ₂	TxC ₂	TxC ₂	TxC ₂
E	M ₁ C ₃	M ₁ C ₃	M ₁ C ₃	M ₂ C ₃	M ₂ C ₃	M ₂ C ₃	M ₃ C ₃	M ₃ C ₃	M ₃ C ₃	TxC ₃	TxC ₃	TxC ₃
F	M ₁ C ₄	M ₁ C ₄	M ₁ C ₄	M ₂ C ₄	M ₂ C ₄	M ₂ C ₄	M ₃ C ₄	M ₃ C ₄	M ₃ C ₄	TxC ₄	TxC ₄	TxC ₄
G	M ₁ C ₅	M ₁ C ₅	M ₁ C ₅	M ₂ C ₅	M ₂ C ₅	M ₂ C ₅	M ₃ C ₅	M ₃ C ₅	M ₃ C ₅	TxC ₅	TxC ₅	TxC ₅
H	M ₁ C ₆	M ₁ C ₆	M ₁ C ₆	M ₂ C ₆	M ₂ C ₆	M ₂ C ₆	M ₃ C ₆	M ₃ C ₆	M ₃ C ₆	TxC ₆	TxC ₆	TxC ₆

MxCx = Muestra que se esta usando a una concentración definida

TxCx = Trolox a una concentración definida

Posteriormente, se adicionó a cada pozo (excepto a la fila A) 20 µL de DPPH para iniciar la reacción. Las reacciones fueron llevadas a cabo durante 30 min. a temperatura ambiente, en las microplacas protegidas de la luz, después de lo cual, se midió la absorbancia a 520 nm en un Lector de ELISA Versamax Microplate reader (SoftMax Pro. 2004).

Los experimentos se llevaron a cabo usando un bloque de diseño al azar. Dentro de cada bloque, cada tratamiento se aplicó 3 veces.

El porcentaje de inhibición, el cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (1):

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{A - A_1}{A} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia del blanco, y A1 es absorbancia de la muestra.

La actividad captadora de radicales fue expresada como un valor de CE₅₀ que es la concentración inhibitoria media, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de inhibir el 50 % del radical DPPH. Se graficó el

porcentaje de inhibición versus el logaritmo de la concentración y mediante el programa Prism 4.0, GraphPad; (GraphPad Software Inc. CA., U.S.A) se obtuvo el valor de IC_{50} y concentración efectiva máxima.

VI. RESULTADOS

VI.1 Recolección del material vegetal

Las fechas y sitios de colecta, así como el número de registro asignado a las plantas en el herbario Dr. Jerzy Rzedowski (QMEX) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Querétaro se encuentran expresados en el cuadro 5.

Cuadro 5. Lugar, fecha de colecta y número de voucher de cada espécimen.

Planta	Lugar de procedencia	Estado de maduración	Fecha de colecta	No. reserva en el herbario
<i>Nicotiana glauca</i>	Escolásticas, Municipio de Pedro Escobedo, Qro.	madura	7/04/2008	# 877
<i>Nicotiana trigonophylla</i>	Doviló Municipio de Cadereyta, Qro.	madura	24/06/2007	# 140
<i>Solanum rostratum</i>	Juriquilla, Municipio de Sta. Rosa Jáuregui	madura	21/09/2009	# 1

VI.2 Preparación de los extractos metanólicos de *Nicotiana glauca*, *Nicotiana trigonophylla* y *Solanum rostratum*

Cada planta limpia y seca se separó en cada una de sus partes (raíz, tallo, hoja, flor, fruto, semilla, tronco y corteza) según las características y abundancia de dichas partes, de tal suerte que se pudieran obtener los extractos que serían objeto de estudio. Los pesos del material seco, de los extractos obtenidos para cada planta y los rendimientos se expresan en los cuadros 6-8.

Cuadro 6. Peso del material vegetal seco y molido de los extractos obtenidos de *Nicotiana glauca*.

<i>Nicotiana glauca</i>							
Parte de la planta	Peso (g)	Cantidad tomada para preparar extracto metanólico (g)	Cantidad de extracto metanólico obtenido (g)	Rendimiento (%)	Cantidad tomada para preparar extracto alcaloideo (g)	Cantidad de extracto alcaloideo obtenido (g)	Rendimiento (%)
Raiz	73	43	1.77	4.12	30	0.13	0.46
Tallo	95	45	3.33	11.84	51	0.15	0.30
Hoja	163.5	82	14.7	18.00	74	0.98	1.20
Flor	33	25	3.00	12.00	29	0.34	1.03
Semilla	150	100	6.54	6.60	74	0.22	0.41
Corteza	91	49	1.20	2.44	42	0.5	1.19
Tronco	300	200	15.88	7.94	100	0.78	0.78

Cuadro 7. Peso del material vegetal seco y molido de los extractos obtenidos de *Nicotiana trigonophylla*.

<i>Nicotiana trigonophylla</i>							
Parte de la planta	Peso (g)	Cantidad tomada para preparar extracto metanólico (g)	Cantidad de extracto metanólico obtenido (g)	Rendimiento (%)	Cantidad tomada para preparar extracto alcaloideo (g)	Cantidad de extracto alcaloideo obtenido (g)	Rendimiento (%)
Raíz	110	55	3	5.45	55	0.18	0.32
Tallo	282	141	12	8.5	141	0.22	0.15
Hoja	214	107	13	12.1	107	0.21	0.19
Flor	22	15	0.30	2.0	22	0.08	0.36
Fruto	50	25	0.38	14.4	25	0.19	0.76
Semilla	65	32	0.30	9.3	33	0.10	0.30

Cuadro 8. Peso del material vegetal seco y molido de los extractos obtenidos de *Solanum rostratum*.

<i>Solanum rostratum</i>							
Parte de la planta	Peso (g)	Cantidad tomada para preparar extracto metanólico (g)	Cantidad de extracto metanólico obtenido (g)	Rendimiento (%)	Cantidad tomada para preparar extracto alcaloideo (g)	Cantidad de extracto alcaloideo obtenido (g)	Rendimiento (%)
Raíz	40.5	40.5	1.37	3.38	100	2.32	2.32
Tallo	222	100	10.7	10.7	111.8	0.582	0.52
Hoja	184	90	12.0	13.3	88.4	0.428	0.48
Flor	78.5	50	11.4	2.28	17.95	0.11	0.6
Fruto	18.5	18.5	2.7	14.5	18.5	1.32	0.7

VI.3 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos de *N. glauca*, *N. trigonophylla* y *S. rostratum*

Los resultados obtenidos sobre la reacción de cada uno de los extractos con el radical DPPH se presentan en los Cuadros 9 a 11 donde se indican los valores de la concentración efectiva al 50% (CE₅₀), el porcentaje de inhibición máximo (E_{max}) y la concentración máxima efectiva alcanzada para cada especie.

La representación que expresa el porcentaje de efecto (inhibición) en función de la concentración ensayada para cada extracto se observa en las figuras 4-9. Solo se presentan 2 figuras para cada extracto para ejemplificar diferentes efectos.

Cuadro 9. CE_{50} , E_{max} y concentración máxima efectiva a 5000 $\mu\text{g/mL}$ para *Nicotiana glauca*.

<i>Nicotiana glauca</i>				
Parte de la planta	Extracto metanólico		Extracto alcaloideo	
	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)
Raíz	1739 \pm 1.00	88.59 \pm 0.49	2371 \pm 1.04	61.00 \pm 0.16
Tallo	1243 \pm 1.01	86.38 \pm 0.15	2864 \pm 1.04	70.5 \pm 0.256
Hoja	2800 \pm 1.05	70.75 \pm 0.82	ND	34.34 \pm 0.29
Flor	705.7 \pm 1.04	97.73 \pm 0.25	ND	31.06 \pm 4.68
Semilla	1688 \pm 1.03	82.08 \pm 0.73	3229 \pm 1.06	64.2 \pm 0.088
Corteza	1152 \pm 1.00	84.82 \pm 0.48	ND	43.16 \pm 0.88
Tronco	17921.01	83.97 \pm 0.34	3632 \pm 1.38	67.21 \pm 0.14

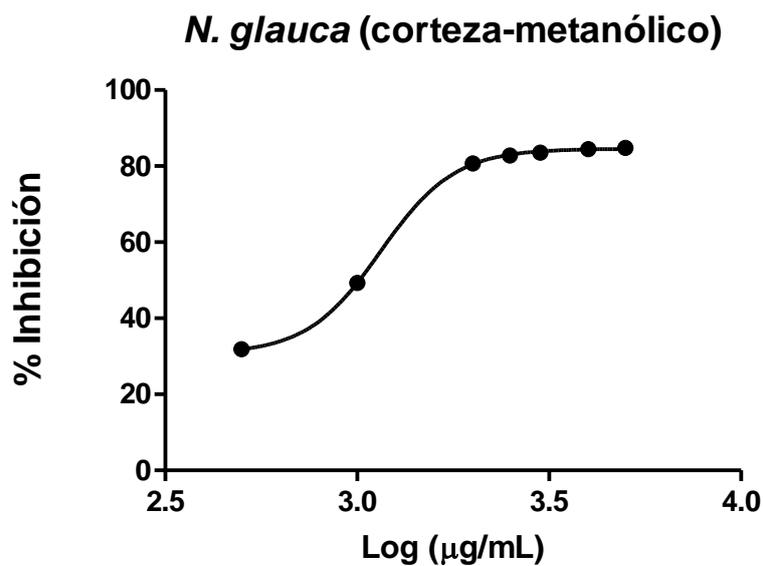


Figura 5. Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto metanólico de la corteza de *Nicotiana glauca*.

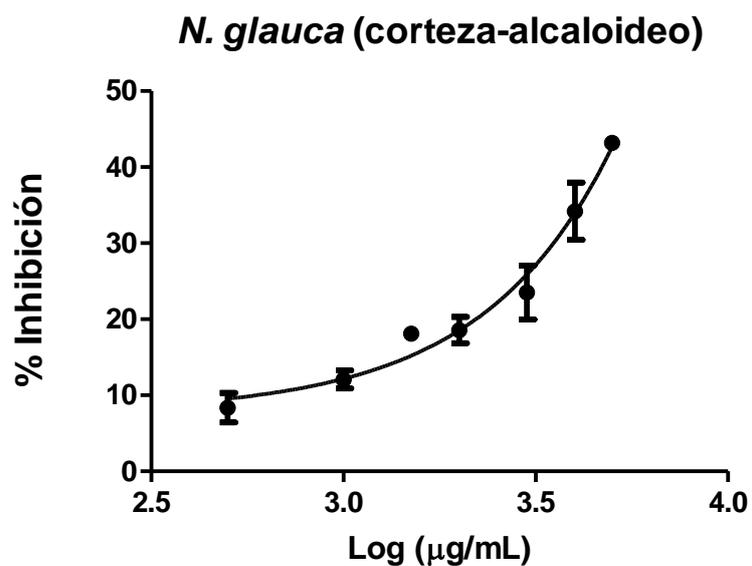


Figura 6. Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto alcaloideo de la corteza de *Nicotiana glauca*.

Cuadro 10. CE_{50} , E_{max} y concentración máxima efectiva a 5000 $\mu\text{g/mL}$ para *Nicotiana trigonophylla*.

<i>Nicotiana trigonophylla</i>				
Parte de la planta	Extracto metanólico		Extracto alcaloideo	
	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)
Raíz	5842 \pm 1.76	68.73 \pm 3.74	ND	29.16 \pm 2.72
Tallo	ND	42.00 \pm 2.56	ND	27.20 \pm 1.20
Hoja	5639 \pm 1.09	58.35 \pm 0.57	ND	11.33 \pm 3.06
Flor	1526 \pm 1.06	65.35 \pm 3.43	ND	16.7 \pm 1.99
fruto	ND	-	ND	12.45 \pm 2.39

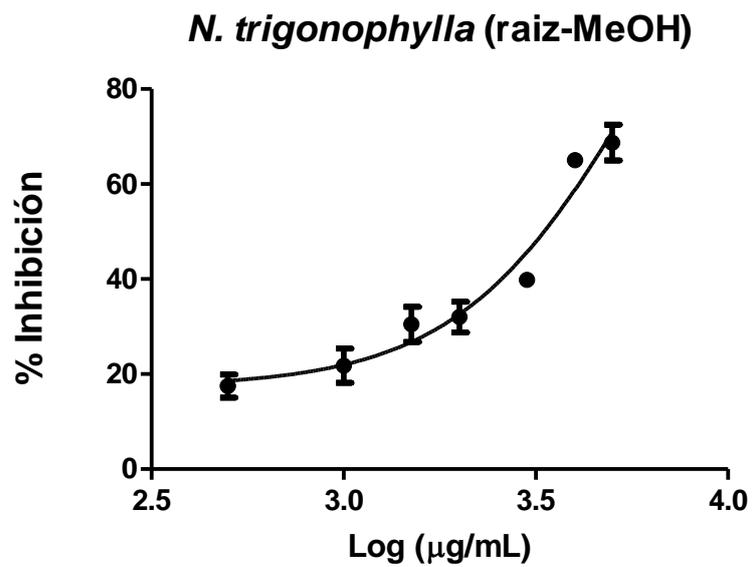


Figura 7. Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto metanólico de la raíz de *Nicotiana trigonophylla*.

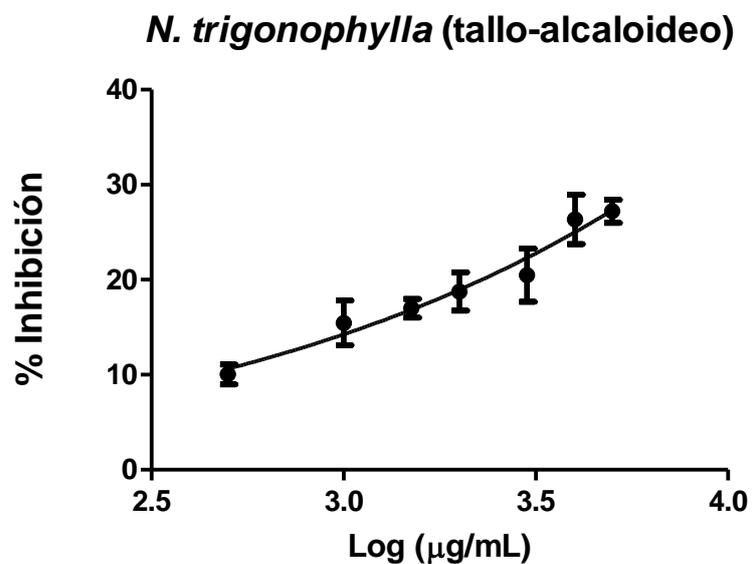


Figura 8. Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto alcaloideo del tallo de *Nicotiana trigonophylla*.

Cuadro 11. CE_{50} , E_{max} y concentración máxima efectiva a 5000 $\mu\text{g/mL}$ para *Solanum rostratum*

<i>Solanum rostratum</i>				
Parte de la planta	Extracto metanólico		Extracto alcaloideo	
	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)
Raíz	1146 \pm 1.00	95.85 \pm 1.79	ND	21.14 \pm 2.17
Tallo	3570 \pm 1.11	81.80 \pm 2.78	595.4 \pm 1.03	94.15 \pm 0.15
Hoja	1584 \pm 1.01	89.95 \pm 0.34	ND	18.00 \pm 1.09
Flor	1428 \pm 1.02	89.53 \pm 0.18	ND	18.82 \pm 1.01
fruto	1827 \pm 1.01	91.68 \pm 0.14	ND	23.14 \pm 0.52

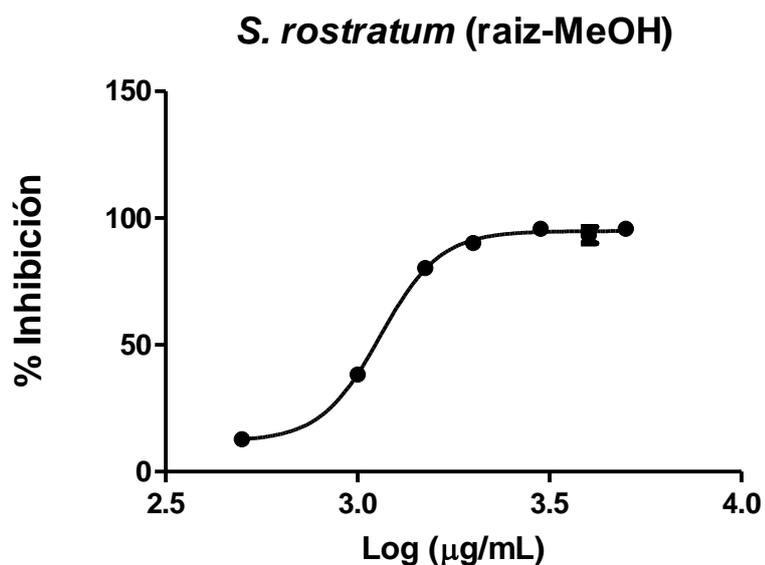


Figura 9. Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto metanólico de la raíz de *Solanum rostratum*.

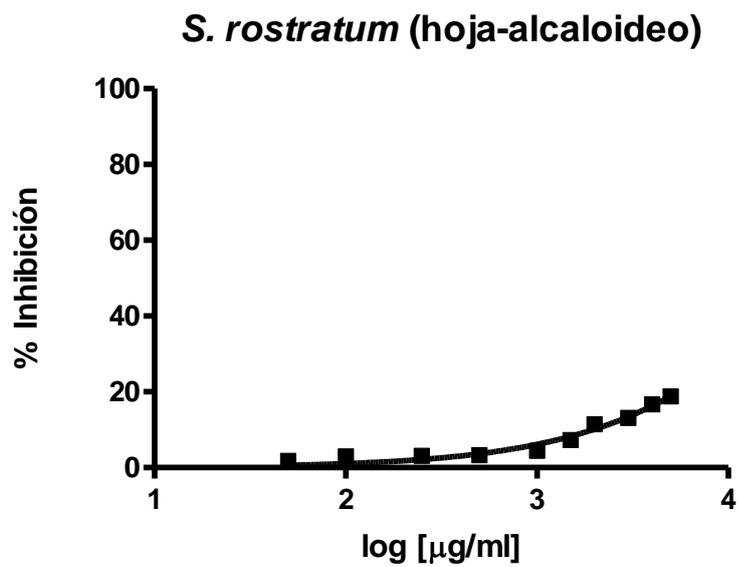


Figura 10. Curva dosis-respuesta obtenida de la actividad anti-radical para el extracto alcaloideo de la hoja de *Solanum rostratum*.

VII. DISCUSIÓN

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Las plantas objeto de estudio en el presente proyecto, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana trigonophylla*, *Solanum rostratum* de la familia de las Solanaceae se caracterizan por producir alcaloides o compuestos nitrogenados aromáticos como atropina, nicotina, solanina, tomatina, anabasina etc., los que, en algunos casos, se usan como drogas medicinales o estimulantes pero fácilmente pueden llegar a ser tóxicos para los animales y el hombre. También en estas plantas, se han identificado flavonoides, como la rutina y saponinas como la metilprotodioscina.

Por otro lado, es reconocida la actividad antioxidante de los alcaloides (Pérez y col., 2003; Maiza-benabdesselam y col., 2007; Suhanya y col., 2009; Oloyede y col., 2010) y los compuestos fenólicos en general (Soobrattee y col., 2005; Kaur y Kapoor, 2002; Wolf y Christa, 2002; Lykkesfeldt y Svendsen, 2007).

En este trabajo, se dividieron las plantas en cada una de sus partes morfológicas y de éstas a su vez se obtuvieron los extractos metanólicos y alcaloideos con el fin de localizar la actividad antioxidante más relevante. En la Figura 11, se compara la actividad antirradical de los extractos metanólicos de las 3 plantas y en la Figura 12, la de los extractos alcaloideos. Cabe mencionar que no de todas las plantas se prepararon los mismos extractos debido a la naturaleza de la planta. Por ejemplo, *N. glauca* es un arbusto que llega a desarrollar tronco y corteza no así las otras plantas. Por otro lado, la recolección de la semilla de algunas de las especies se hizo muy difícil, por lo tanto, en las gráficas siguientes la ausencia de barras significa estudio no realizado.

Según los resultados mostrados en las Figuras 11 y 12, se observa que de las tres plantas estudiadas *Nicotiana trigonophylla* mostró actividades antioxidantes más bajas para los dos tipos de extractos preparados y que los extractos alcaloideos en general fueron menos activos que los metanólicos. Figura 13.

Aunque la actividad antioxidante de los alcaloides está ampliamente documentada, es de esperarse que la disminución de ésta en dichos extractos se deba a la estructura de los alcaloides abundantes en estas especies que son

de tipo piridínicos (Figura 2) como la nicotina a la que se le atribuye más bien un carácter prooxidante. En *Solanum rostratum*, el alcaloide identificado fue la solanina, cuya estructura es diferente. En estos alcaloides se nota la ausencia de grupos fenólicos o dobles enlaces conjugados a los cuales se atribuye frecuentemente el efecto antioxidante, esto se corrobora en el estudio realizado por Maiza-Benabdesselam y colaboradores (2007) sobre la identificación de alcaloides y la actividad antioxidante de extractos alcaloideos de especies de *Fumarias* donde los alcaloides de tipo fenólico presentaron una actividad antioxidante considerablemente mayor que la cafeína. De la misma manera la erisodina, alcaloide de tipo fenólico presentó una considerable inhibición sobre el radical DPPH (Ibarra, 2010).

Finalmente, considerando la mejor actividad por planta tenemos que los extractos metanólicos de la flor de *Nicotiana glauca*, de la raíz de *Nicotiana trigonophylla*, y de la raíz de *Solanum rostratum* presentaron la mejor actividad antirradical.

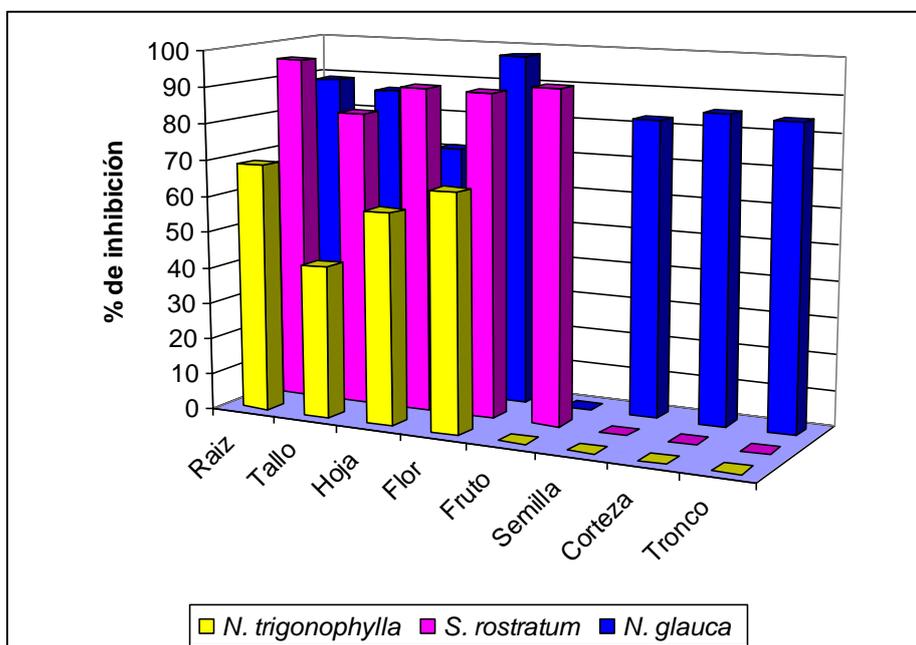


Figura 11. Comparación de la actividad anti-radical de los extractos metanólicos de *Nicotiana glauca*, *Nicotiana trigonophylla* y *Solanum rostratum*.

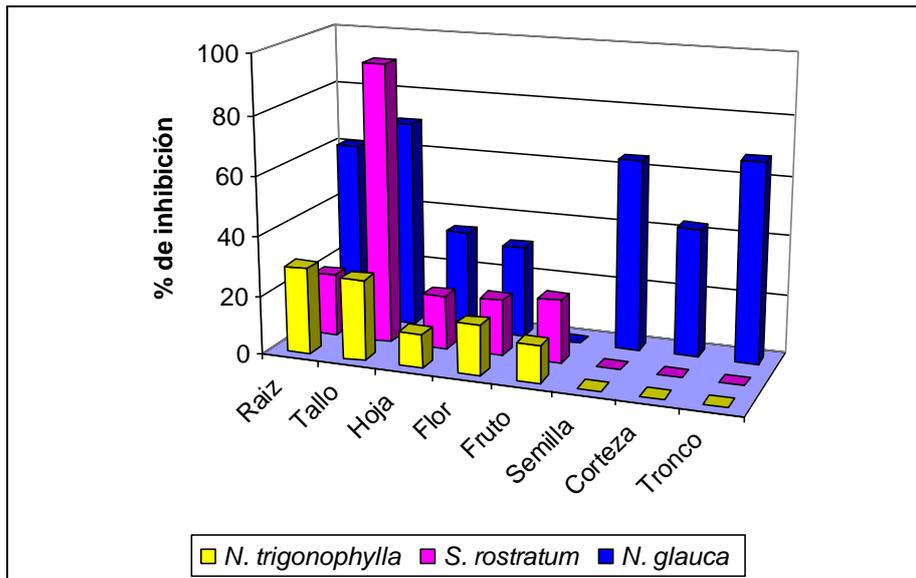


Figura 12. Comparación de la actividad anti-radical de los extractos alcaloideos de *Nicotiana glauca*, *Nicotiana trigonophylla* y *Solanum rostratum*.

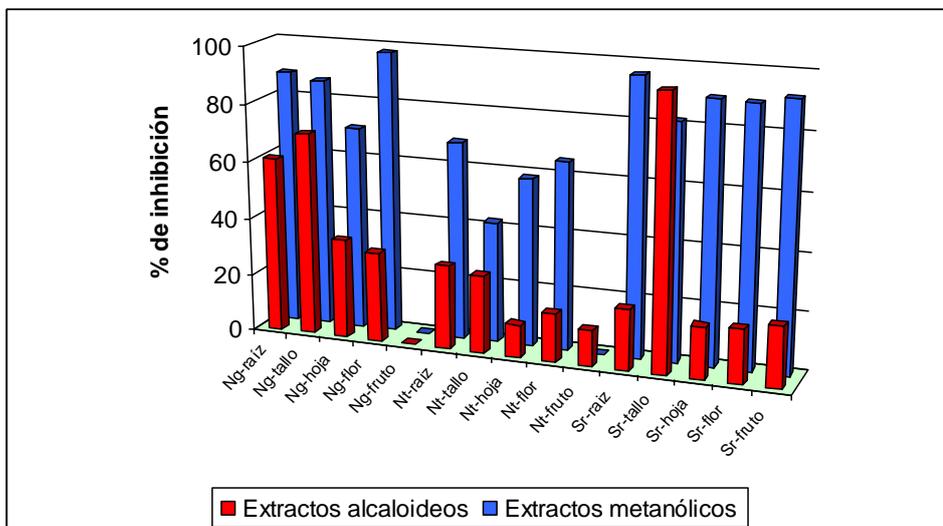


Figura 13. Comparación de la actividad antirradical de los extractos metanólicos y alcaloideos de *Nicotiana glauca*, *Nicotiana trigonophylla* y *Solanum rostratum*.

VIII. CONCLUSIONES

Se prepararon los extractos metanólicos y alcaloideos de cada una de las partes de 3 especies de Solanaceae con rendimientos sobre planta seca utilizada entre 2.0% y 20.4 % para los extractos metanólicos y entre el 0.2% y 1.2 % para los extractos alcaloideos.

El extracto metanólico de la flor de *Nicotiana glauca* presentó la mejor CE_{50} lo que significa que presentó la mejor concentración de compuestos antioxidantes capaces de inhibir el 50 % del radical DPPH.

Para la mayoría de los extractos alcaloideos de las tres plantas estudiadas no fue posible determinar los valores de CE_{50} debido a que el efecto máximo o porcentaje de inhibición fue inferior al 50% medida a una concentración máxima de 5000 $\mu\text{g/ml}$ a la cual los extractos fueron solubles. Lo que significa que los extractos alcaloideos no proporcionan un efecto antioxidante considerable, bajo las condiciones de estudio, excepto los extractos de la raíz, tallo, semilla y tronco de *Nicotiana glauca* que presentaron efectos superiores al 50%

De las tres plantas analizadas la que resultó menos activa frente al radical DPPH fue *Nicotiana trigonophylla* tanto para los extractos metanólicos como alcaloideos.

La base del ensayo del DPPH radica en la reacción de transferencia de electrones e hidrógeno del sustrato hacia el radical, sin embargo, pueden existir otras moléculas dentro del extracto cuya actividad antioxidante involucra otro mecanismo, por lo cual sería conveniente evaluar la capacidad antioxidante con otros ensayos como ABTS, FRAP y Folin para validar los resultados obtenidos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Backheet**, E. Y., Sayed, H. M. **2002**. Two new chlorinated amides from *Nicotiana glauca* R. Graham. *Pharmazie*: Vol. 57(3): 206-208
- Badgett**, C. O., Beinhart, E. G., Maher, J., Connelly, J. A. **1949**. Rutin content of several varieties of *Nicotiana rustica* and *Nicotiana glauca*. *Archives of Biochemistry*: Vol. 24: 245-50.
- Bah**, M., Gutierrez, D. M., Escobedo, C., Mendoza, S., Rojas, J., Rojas, A. **2004** Methylprotodioscin from the Mexican medical plant *Solanum rostratum* (Solanaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 32 (2): 197-202.
- Barilari**, E. M. **1958**. Study of the alkaloids of *Nicotiana glauca* of Argentina. Circular paper chromatography. *Archivos de bioquímica, química y farmacia*: Vol.8:119-26.
- Bhakuni**, D. S., Bittner, M., Marticorena, C., Silva, M., Weldt, E., Hoeneisen, M. **1976**. Screening of Chilean plants for anticancer activity. *Lloydia*: Vol. 39: 225-43.
- Bhakuni**, D.S., Bittner, M., Marticorena, C., Silva. M., Weldt, E., Melo. M. E., Zemelman, R. **1974**. Screening of Chilean plants for antimicrobial activity. *Lloydia*: Vol. 37(4): 621-32.
- Biblioteca** digital de la medicina tradicional Mexicana. **2009**. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tabaco_cimarrón&id=7766. Fecha de consulta diciembre 2010.
- Bowen**, C. V. **2006**. Alkaloids in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana trigonophylla*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*: Vol. 34(7): 199-206.
- Cárdenas**, R.N., Pedraza, C.J. **2006**. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*: Vol. 17(2): 164-173.
- Cheng**, M.S., Wang, Q.L., Tian, Q., Song, S., Liu, Y.X., Li, Q., Xu, X., Miao, H.D., Yao, X.S., Yang, Z. **2003**. Total Synthesis of Methyl Protodioscin: A Potent Agent with Antitumor Activity. *Journal Organic Chemistry*. Vol. 68 (9): 3658–3662.
- De Leon**, S .H., Hope, P. H. **1962**. Alkaloids of cultivated and wild Mexican tobacco. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*: Vol. 23: 107-118.

- Dröge, W. 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*: Vol. 82: 48-95.
- Encarnación, R. y Keer, G. S. 1991.** Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology*: Vol. 31: 181-192.
- Fukumoto, L. R., Mazza, G. 2000.** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 48: 3597-3604.
- Galiana, M. R., Pelegri; VigueraLoko, J. M. 1964** Alkaloids from *Nicotiana glauca*. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química, Serie B*: Vol. 60(5): 419-22.
- García Bacallao, L., Rojo Domínguez, D.M., García Gómez, L:V., Hernández A: V. 2002.** Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*: 21(3): 214-216.
- Halliwell, B., Gutteridge, M. 1999.** Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Nueva York, USA, 3rd Ed.
- Halliwell, B., Gutteridge, M., Corss, C.E. 1999.** Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*: Vol. 119: 598-620.
- Hansberg, W. 2002.** Biología de las especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico*: Vol. 26: 19-54.
- Harman, D. 1992.** Free radical theory of aging. *Mutation Research*: 275: 257-266.
- Ibarra, E. 2010.** Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. Montecillo, Texcoco. Colegio de Postgraduados. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. 50-58.
- Kaur, C., Kapoor, H. 2002.** Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*: Vol. 37: 153-161.
- Keeler, R. F., Crowe, M. W. 1985.** Anabasine, a teratogen from the *Nicotiana* genus. *Plant Toxicology*: 324-33.

Keeler, R. F., Dell Balls, L., Panter, K. **1981**. Teratogenic effects of *Nicotiana glauca* and concentration of anabasine, the suspect teratogen in plant parts. The Cornell Veterinarian: Vol. 71(1): 47-53.

Khafagy, S. M.; Metwally, A. M. **1968** Phytochemical study of *Nicotiana glauca* grown in Egypt. Journal of Pharmaceutical Sciences of the United Arab Republic: Vol.9: 83-96.

Lee, J.Y., Jang, Y.W., Kang, H.S., Moon, H.; Sim, S.S., Kim, C.J. **2006** .Anti-inflammatory action of phenolic compounds from *Gastrodia elata* root. Archives of Pharmacal Research:Vol. 29(10): 849-858.

Lykkesfeldt, J., Svendsen, O. **2007**. Oxidant and antioxidant in disease: Oxidative stress in farm animals. The Veterinary Journal: Vol. 173: 502-511.

Maiza-Benabdesselam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, s., Capeleur Y., Max, H. **2007**. Antioxidant activities of alkaloids or two Algerian species of *Fumaria*: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. Records of Natural Products. Vol. 1 (2-3): 28-35.

Morel, A. F., Machado, E. C., Navarro, C. E.,Giacomelli, S. R., Delle Monache, F. **1998**. A new amide from *Nicotiana*. Planta Medica: Vol.64(3): 284-285.

Oladosu, L. A., Case, A. A. **1979**. Large animal hepatotoxic and nephrotoxic plants. Veterinary and human toxicology: Vol. 21(5): 363-365.

Oloyede, K.G., Oke, M.J., Raji, Y., Olugbade, T. **2010**. Antioxidant and anticovulsant alkaloids in *Crinum ornatum* bulb estrac. Word Journal of Chemistry. Vol. 5(1): 26-31.

Pérez, R.M., Vargas, R., Martínez, F.J., García, E.V., Hernández, B. **2003**. Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. Ars Pharmaceutica, Vol. 44(1): 5-21.

PLANTS USDA, NRCS. **2010**. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 19 April 2010). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.

Pyriki, C. **1954**. Alkaloids in *Nicotiana glauca*. Pharmazeutische Zentralhalle fuer Deutschland: Vol. 93: 171-8.

Ródenas, J., Mitjavila, M. T., Carbonell, T. **1995**. Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in rats. Free Radical Biology & Medicine:18(5): 869-875.

- Saitoh**, F., Noma, S., Kawashima, N. **1985**. The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry*: Vol. 24(3): 477-480.
- Sánchez** R.A., Santiago, O.E., Vargas, L.A., Mendoza, V.M. **2004**. Propuesta de un constructor par evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*: Vol. 29 (003): 81-90.
- Schep**, L. J., Slaughter, R. J., Beasley, D., Michael, G. **2009**. Nicotinic plant poisoning. *Clinical Toxicology*: Vol.47(8): 771-781.
- Shabana**, M. M., Mirhom, Y. W., Genenah, A. A., Aboutabl, E. A., Ismail. M., Soliman. R., Niazi, Z. M. **1988**. Study of wild Egyptian plants of potential medicinal activity. Sixth communication: antibacterial and antifungal activities of some selected plants. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*: Vol. 42(5): 737-41.
- SIIT** **2009**. Sistema Integrado de Información Taxonómica SIIT^{*mx} http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxaget?p_ifx=itismx&p_lang=es
- Soobrattee**, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. **2005**. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Reswarch*: Vol. 579: 200-213.
- Suhanya**, P., Juzaili, B.A., Surash, R., Sabariah I., Sreenivasan, S., Mohd, I.M., Sharif M.M. **2009**. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. *Molecules*. Vol. 14: 3964-3974.
- Tenorio**, L.P. **2000**. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/nicotiana-glauca/fichas/ficha.htm>, fecha de consulta abril 2010.
- Van Den Berghe**, D. A., leven, M., Mertens, F., Vlietinck, A. J. **1978**. Screening of higher plants for biological activities II. Antiviral activity. *Lloydia (Journal of Natural Products)*: Vol.41(5): 463-71.
- Velioglu**, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. **1998**. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 46: 4113-4117.
- Wolf**, B., Christa, M. **2002**. Chemistry of the Antioxidant Effect of polyphenols. *Annals . New York Academic. Science*: Vol. 957: 57-9-69.

Zaher, Baher A., Zaghloul, M. G., Marzouk, A. M., El-Sharkawy, S. H. **2009**.
Phytochemical and biological studies of *Nicotiana glauca* R. Grah. leaves.
Journal of Pharmaceutical Sciences: Vol.25(1):103-111.