

Capítulo 3

Análisis de compuestos fitoquímicos

María de Lourdes de la Rosa Carrillo
Gerardo Castillo Vargas

*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

Desde que el hombre existe, ha dependido de las plantas para satisfacer la mayoría de sus necesidades y el estudio de éstas se ha incrementado de manera considerable al captar el interés de los investigadores con diversos fines como pueden ser el aumentar la producción de alimentos de origen vegetal, reforestación o descubrimiento de sustancias innovadoras para diferentes aplicaciones, siendo el área de la salud una de las más exploradas con ayuda de la fitoquímica, ciencia que permite conocer de manera integral, algunos de los muchos productos químicos naturales en las plantas. El análisis puede ser cualitativo, partiendo de una muestra de planta de interés, a la que, por medio de diferentes solventes, se le extraen diversos compuestos y en los extractos se realizan pruebas químicas que permiten identificar la presencia

de ciertos grupos de compuestos, esto se conoce como escrutinio fitoquímico y con el apoyo de métodos instrumentales se complementa el estudio al separar, identificar y cuantificarlos. Muchos de los compuestos de interés, son los metabolitos secundarios, compuestos producidos por las plantas que no tienen una función reconocida o concreta, pero sí una gran diversidad de aplicaciones. En este capítulo se presenta un protocolo para realizar el escrutinio fitoquímico preliminar de *Eryngium heterophyllum*, planta de uso medicinal, en la que se encontraron pequeñas diferencias en el contenido de algunos metabolitos secundarios al comparar muestras de planta propagada *in vitro* y *ex vitro*, demostrando que la biotecnología vegetal es una herramienta excelente para realizar investigación de manera sustentable.

Fitoquímica

Las plantas participan en ciclos biológicos, siendo indispensables para la supervivencia del hombre y estudiar sus compuestos da información que ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen lo que permite darles un mejor uso. Por otro lado, con el interés que ha despertado la medicina “naturista”, continuamente crece el número de publicaciones que ilustran la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones. Desafortunadamente, la mayoría no están suficientemente documentadas ni alertan contra los posibles efectos colaterales por el uso indiscriminado de materiales vegetales. Paralelamente el interés ha evolucionado hacia el estudio científico de los componentes y efectos de las plantas que tradicionalmente muestran actividades biológicas interesantes. Con ayuda de la fitoquímica, se puede tener, de manera integral, el conocimiento de algunos de los muchos productos químicos naturales que pueden ser extraídos, separados, purificados y determinados fisicoquímicamente en las plantas. Estos se encuentran en la complejidad de las células vegetales no sólo como entidades químicas, sino también como productos de una serie de mecanismos que intervienen en su biogénesis, como sustancias activas que desempeñan una función en los procesos bioquímicos de las células o bien como elementos que pueden provocar alteraciones fisiológicas en humanos y animales. La aplicación terapéutica que los productos químicos naturales puede tener en el hombre y también su uso como materias primas de la industria alimentaria y químico farmacéutica son

de gran importancia social y económica. Es deseable tener claro el objetivo a lograr al momento de realizar un análisis fitoquímico. En ocasiones el interés es por estudiar una planta en particular para explorar sus componentes y en otros casos se busca un principio activo en particular, por ejemplo: alcaloides, saponinas, colorantes, aceites esenciales, etc. La búsqueda y colecta de plantas para su análisis requiere de experiencia y tiempo, implica viajar e incluso desplazarse por terrenos de difícil acceso, así como también se debe tener idea de la cantidad de material vegetal que se va a recolectar y que parte o partes de la planta son las más adecuadas. En un laboratorio para la investigación química, en el que se puede recibir gran cantidad de material vegetal para su análisis, el tiempo y costo requerido en cada estudio, puede llegar a tener una marcada diferencia si se realizan de manera conveniente pruebas preliminares, que permitan dar preferencia a las plantas de mayor provecho. En estos estudios preliminares se pueden usar muestras desde 1 a 1000 gramos y el análisis se puede orientar a localizar cualitativa o cuantitativamente uno o varios principios activos. A finales del siglo XX, muchos de estos procesos requerían que se partiera de grandes cantidades de muestras biológicas (del orden de varios kilogramos), con procesos largos de fraccionamiento, purificación y caracterización. Estos procesos duraban inclusive años y se requería de varias personas trabajando de manera colaborativa en diferentes universidades o institutos de investigación.

Métodos de identificación

Los métodos más comunes para pruebas preliminares pueden ser:

- a) Histológicos: Observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores, den precipitados, etc.
- b) Químicos: Tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados, etc.
- c) Fisicoquímicos: Uso de cromatografía, localización de ciertas bandas de absorción en el infrarrojo, etc.
- d) Biológico: Efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupos de ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, etc.

En todos los casos es recomendable verificar el comportamiento de los reactivos y la reproductividad y limitaciones de las técnicas, empleando sustancias y extractos testigos. Para esto, es importante cuidar la calidad de los extractos, pues por lo general, son mezclas complejas de muchos metabolitos y los principales parámetros que se deben considerar y estos son:

- a) La planta: cualquier parte de la planta puede contener principios activos de interés y se puede usar planta fresca o seca.
- b) El solvente: el éxito en la determinación de compuestos biológicamente activos depende en gran medida del tipo de solvente que se usa, siendo los más comunes, para grupos de compuestos con propiedades similares de solubilidad de acuerdo a su estructura química: agua, acetona, alcohol (etanol, metanol), cloroformo y éter, un ejemplo de solvente específico para terpenoides es el diclorometanol.
- c) El procedimiento de extracción: el principio básico para una buena extracción es triturar finamente el material vegetal, húmedo o seco, para incrementar la superficie del área de extracción. Estudios anteriores muestran que la proporción de solvente a muestra de 10:1 (v/p) es adecuada. Los métodos más usados son: homogenización, extracción exhaustiva en serie, extracción Soxhlet, maceración, decocción, infusión, digestión, percolación, sonicación.

Actualmente las técnicas instrumentales han mostrado un gran avance en sus aplicaciones y permiten de una manera rápida y confiable el trabajo de caracterización de muchas sustancias naturales, inclusive las que están en muy baja concentración en las fuentes naturales, además de que presentan muchas ventajas como el uso de muestras más pequeñas, materiales y reactivos menos tóxicos y menor contaminación del ambiente al no hacer tanto uso de solventes orgánico como cloroformo, diclorometano, benceno, etc. Las técnicas más usadas son: espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopia infrarroja (IR), espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y sus diferentes variantes. Los métodos espectrofotométricos consisten básicamente en hacer reaccionar los metabolitos secundarios con reactantes que generen productos coloreados que puedan ser medidos por espectrofotometría en la región visible del espectro electromagnético. También se ha tenido éxito al ha-

cer la combinación de las técnicas de RMN y espectrometría de masas, junto con el uso de las bases de datos, facilitando así el análisis de los metabolitos ya conocidos o ayudando en el hallazgo de otros nuevos. Aunque estas técnicas han desplazado casi definitivamente el uso de los métodos clásicos, para muchos propósitos se utiliza todavía el análisis fitoquímico preliminar.

Metabolitos secundarios

Los compuestos orgánicos que se hallan presentes en el vegetal pueden proceder del metabolismo primario o del metabolismo secundario (tabla 3.1). El primario se considera esencial para la vida y es común a todos los seres vivos del mundo, mientras que el secundario no se considera esencial para la vida y únicamente se produce en ciertos grupos vegetales.

Tabla 3.1. Ejemplos de productos derivados del metabolismo primario y secundario

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Glúcidos: oligosacáridos y polisacáridos	Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos
Lípidos y ceras vegetales	Derivados fenólicos
Aminoácidos y proteínas	Shikimatos: fenoles y ácidos fenólicos,
Ácidos nucleicos	cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas
Compuestos nitrogenados, como enzimas	Acetatos: quinonas, antracénosidos.
	Alcaloides

En el caso de metabolismo secundario, las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que se conocen como metabolitos secundarios o productos naturales. Estos compuestos no tienen una función reconocida o concreta en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los metabolitos secundarios también difieren de los metabolitos primarios, en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas. El estudio de estos compuestos fue iniciado por los químicos

orgánicos del siglo XIX y principios del siglo XX, quienes se interesaron en estas sustancias debido a su importancia como drogas, venenos, sabores y materias industriales. Además de que estos compuestos tienen una implicación ecológica pues actúan como respuesta a un estrés biótico como ataque de herbívoros, virus, hongos, bacterias, produciendo fitoalexinas. Otros tienen una función fisiológica muchas veces asociada como respuesta a algún tipo de estrés abiótico por ejemplo los alcaloides y las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento respectivamente, mientras que los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas. Se tienen diversos criterios para clasificar estos compuestos, entre los principales metabolitos secundarios se encuentran: alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides, saponinas y glucósidos cianogénicos, y si se agrupan por su estructura química pueden ser isoprenoides, derivados fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno.

Isoprenoides

El elemento estructural básico de estos compuestos se conoce como unidad de isopreno (Fig. 3.1), son generalmente insolubles en agua e incluyen a los esteroides, pigmentos de caroteno (Fig. 3.2), la vitamina A, el hule, los terpenos, aceites esenciales, la cadena de fitol de la clorofila y algunas hormonas vegetales importantes. Los terpenos o terpenoides, constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios y al igual que muchos tipos de metabolitos secundarios, están involucrados en tareas de defensa. Se pueden encontrar en la fuente vegetal solos o formando glicósidos y son más frecuentes como triterpenos, también llamados, saponinas. El isopreno ha sido detectado libre en *Hamamelis jelena*; sin embargo, esta molécula como tal no es frecuente en las plantas, sino que está asociada a otras unidades iguales o a otras moléculas. Se le puede obtener por pirólisis del limoneno (Fig. 3.3) o de la goma con lo cual se deduce el origen común de estos compuestos.

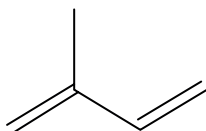


Figura 3.1. El isopreno es el hemiterpeno de mayor abundancia en las plantas

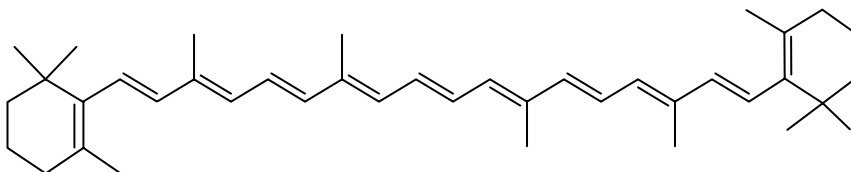


Figura 3.2. Molécula de β -caroteno, precursor de la vitamina A

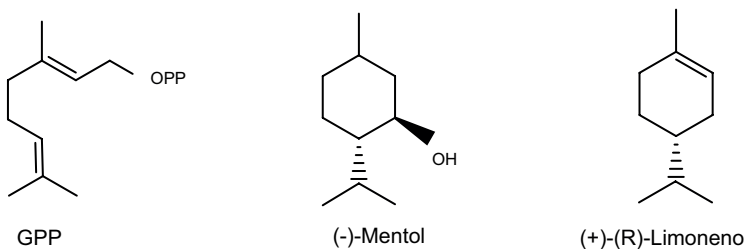


Figura 3.3. Monoterpenos. El mentol y el limoneno son derivados del geranildifosfato (GPP)

Derivados fenólicos

Los fenoles vegetales son los metabolitos secundarios que contienen en su estructura el grupo fenol, que es un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Fig. 3.4). Estos compuestos son sintetizados y acumulados en las plantas en gran número y variedad, hasta la fecha se han identificado aproximadamente 8000 compuestos y también son llamados polifenoles o fenilpropanoides, participan en diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Están relacionados con el color, el sabor, el olor y propiedades nutritivas y antioxidantes de las plantas. Los fenoles vegetales se clasifican de

acuerdo al número de anillos fenólicos que poseen y de los grupos funcionales que contienen. Los principales grupos son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. Los compuestos flavonoides (Fig. 3.5) constituyen uno de los grupos más ubicuos producidos por las plantas, se concentran en los órganos de éstas especialmente en las flores, hojas y semillas. Son compuestos de bajo peso molecular y tienen un amplio rango de funciones importantes en la bioquímica, fisiología y ecología de las plantas, incluyendo la coloración de semillas y pétalos de las flores, la germinación del polen y su fertilidad, protección contra radiación UV y organismos patógenos, así como también influyen en el crecimiento de la planta, inhibidores de enzimas, antioxidantes y compuestos anticancerígenos, por lo que tiene un alto potencial benefactor para los humanos, haciéndolos atractivos para su estudio, extracción o producción, algunos ejemplos se muestran en la figura 3.6.

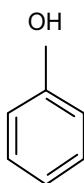


Figura 3.4. Estructura química del fenol

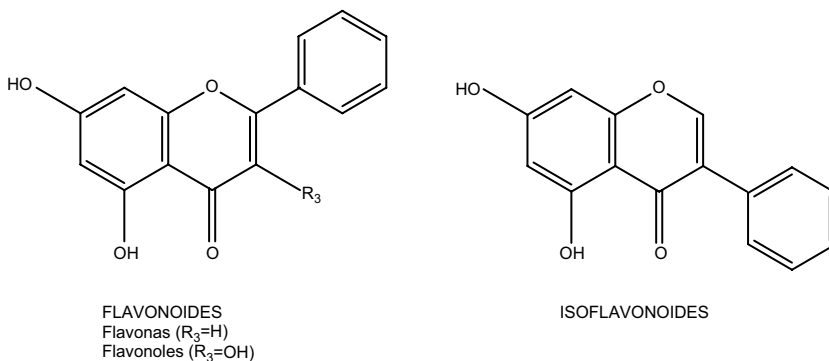


Figura 3.5. Estructura básica de los flavonoides y de los isoflavonoides que consiste en dos anillos fenólicos

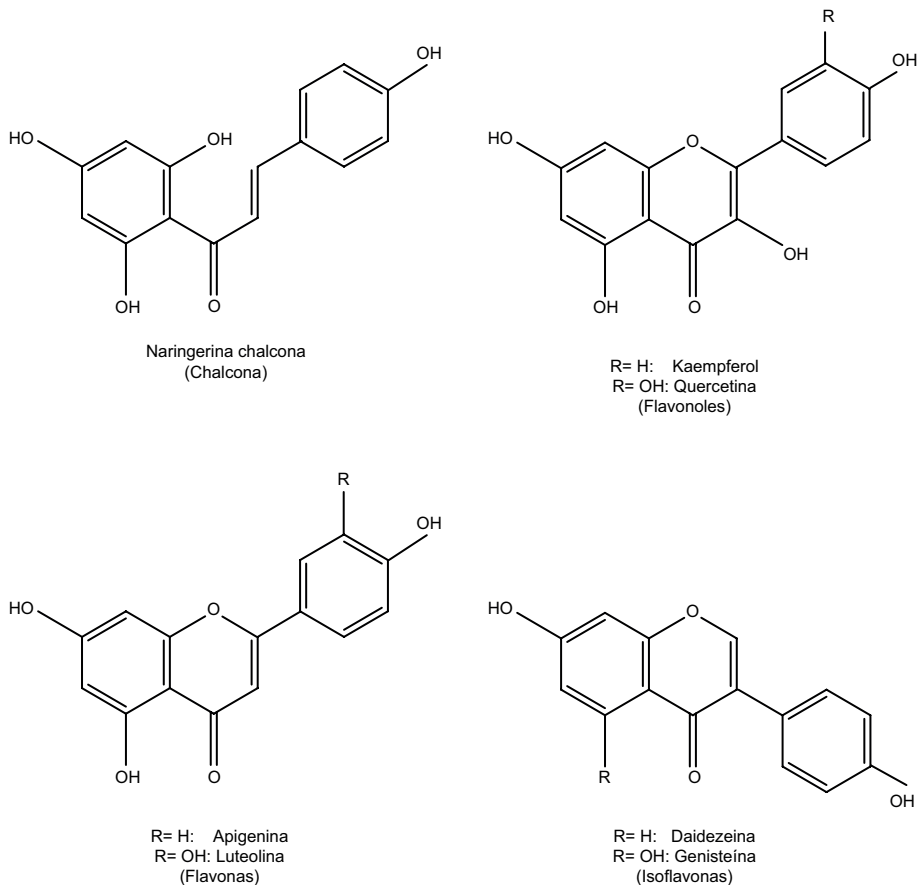


Figura 3.6. Ejemplos de flavonoides. El compuesto denominado chalcona es precursor de las demás clases de flavonoides

Compuestos que contienen nitrógeno: Alcaloides y glucósidos cianogénicos

Los alcaloides son compuestos nitrogenados cuya función en la planta no está bien determinada y ha sido objeto de especulación durante los últimos años, pero se cree que actúan como defensa frente a predadores, especialmente mamíferos, debido a su toxicidad y capacidad de disuasión. Su química es compleja

y se les clasifica según la composición de su núcleo, en una quincena de grupos diferentes. Aparecen en diversos órganos, según la especie vegetal, la nicotina, por ejemplo, se sintetiza en las raíces, pero se acumula únicamente en sus hojas. Estas sustancias son conocidas por sus impresionantes efectos farmacológicos sobre los animales vertebrados. Como su nombre sugiere, muchos alcaloides son alcalinos (Fig. 3.7). Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina. Hay alcaloides, como los del tropano, que contienen un anillo de pirrolidina, a esta familia pertenece la cocaína (Fig. 3.8).

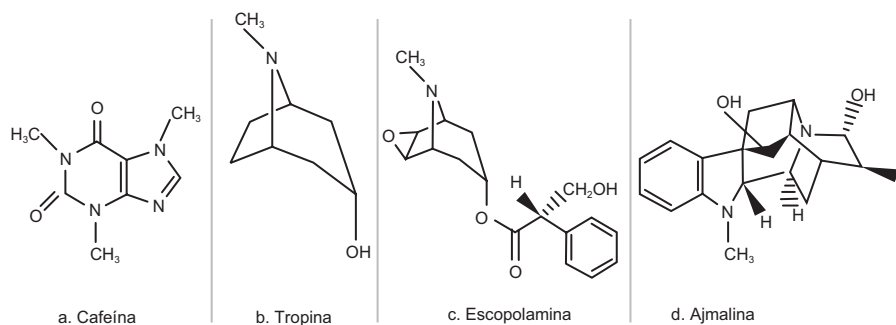


Figura 3.7. Algunos alcaloides de importancia. La cafeína (a) es el alcaloide de mayor abundancia; los tropano alcaloides (b y c) se encuentran solamente en la familia *Solanaceae*; y los monoterpenos indol alcaloides (d) se encuentran en las familias *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Nyssaceae* y *Rubiaceae*

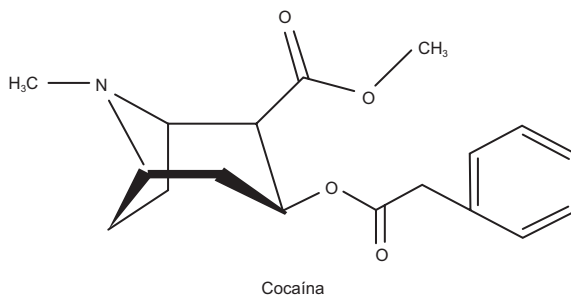


Figura 3.8. Estructura química de la cocaína

Otros metabolitos que tienen nitrógeno en su estructura son los glicósidos cianogénicos, que son sintetizados por algunas plantas y son capaces de

liberar por hidrólisis ácido cianhídrico (HCN), un gas tóxico que participa de las interacciones planta-animal y que produce a menudo envenenamiento de ganado y ocasionalmente de personas. Estructuralmente están formados por un azúcar, un grupo ciano y un derivado carbonílico (aldehído o cetona). Casi todas las sustancias cianógenas son glicósidos de α -hidroxinitrilos (cianhidri-*nas*). Se han encontrado más de 50 tipos de glicósidos cianógenos naturales de los cuales todos tienen una misma estructura general y en la actualidad se conocen más de 2500 especies, distribuidas en unas 110 familias diferentes que presentan estos compuestos. Para el reconocimiento de los metabolitos secundarios, en la actualidad sigue siendo de gran utilidad el realizar pruebas cualitativas preliminares como son las fitoquímicas, que consisten en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un aducto o un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de un color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, dando indicios de la presencia o ausencia de un metabolito secundario en particular.

Biotecnología vegetal como una alternativa

La pérdida de especies vegetales debido a la destrucción de su hábitat natural y a la explotación irracional de recursos forestales puede poner en peligro la supervivencia de plantas utilizadas de manera tradicional en cada región y en cada cultura, lo cual representa una pérdida no solo a nivel ecológico, sino también a nivel social y económico. En el caso concreto de las plantas medicinales, la colecta excesiva de material vegetal del medio silvestre se considera como la principal amenaza. De hecho, muchas de las especies de mayor valor medicinal han sido ya erradicadas de sus zonas más importantes de distribución natural. Por lo anterior, es crucial desarrollar estrategias para proteger estos valiosos recursos naturales, pero que también permitan su explotación racional. La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) abre la posibilidad, por un lado, de conservar *in vitro* el germoplasma (Fig. 3.9) de especies vegetales de uso tradicional y por otra parte aprovecharlas, mediante la micropropagación, con diversos fines. En la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), se logró el estableci-

miento del cultivo *in vitro* de varias especies (tabla 3.2), con uso medicinal de la región de Aguascalientes-Zacatecas.

Tabla 3.2. Sistema de propagación *in vitro* y usos de cinco especies de la región Aguascalientes-Zacates con propiedades medicinales

Especie	Nombre común	Propagación <i>In vitro</i>	Usos
<i>Eryngium heterophyllum</i>	Hierba del sapo	0.5 mg/L mT*	Antiinflamatoria, tos, riñón, artritis, diabetes
<i>Heterothecha inuloides</i>	Árnica amarilla	1.0 mg/L AIA**	Para cicatrizar y desinfectar heridas en personas y animales, para desinflamar golpes externos
<i>Ipomoea purpurea</i>	Hiedra de flores chiquitas	0.5 mg/L mT	Purgante; para ayudar al parto
<i>Plumeria rubra</i> L.	Xaca, plumeria	0.1 mg/L mT	Indigestión, lesiones óseas, purgante, postemillas, dolor de muelas.
<i>Ruta chalapensis</i> L.	Ruda	2 g/L Carbón activado	Trastornos gineco-obstétricos; para ayudar al parto, lactógeno; analgésico; trastornos gastrointestinales; enfermedades de la piel

* mT: meta-Topolina

**AIA: Ácido indol- acético

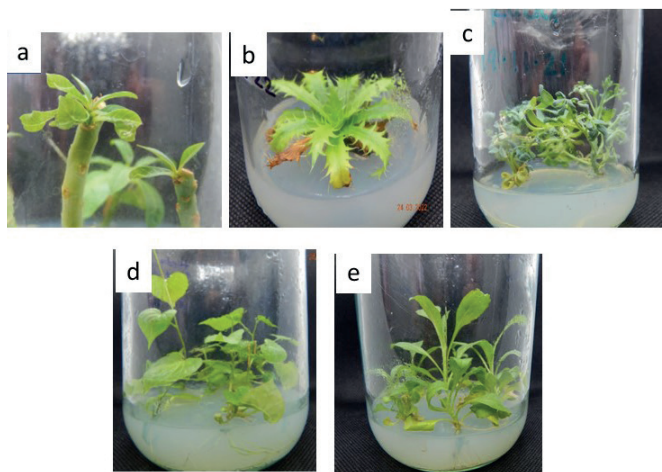


Figura 3.9. Especies propagadas *in vitro* y conservadas en el banco de germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes: a) *Plumeria rubra* L., b) *Eryngium heterophyllum*, c) *Ruta chalapensis* L., d) *Ipomoea purpurea* y e) *Heterothecha inuloides*

Es importante considerar que muchos de los metabolitos secundarios son producidos por las plantas en respuesta a algún tipo de estrés ambiental, o como defensa contra patógenos y predadores; asimismo, la acumulación de metabolitos secundarios suele depender de las condiciones que se presentaron durante el crecimiento y desarrollo del individuo, como presencia o ausencia de algunos nutrientes, exposición a sequía, salinidad, bajas temperaturas, radiación ultravioleta, ataque de patógenos, entre otros. Se pueden emular algunas de estas condiciones en los cultivos vegetales *in vitro* para obtener o potenciar la producción de determinados metabolitos, práctica que se conoce como elicitación. Por ejemplo, para incrementar la producción de compuestos fenólicos, como metabolitos secundarios, hay más de 40 referencias, usando diferentes tipos de elicitores como los biológicos (bacterias y hongos), químicos (aminoácidos, condiciones de cultivo, compuestos orgánicos, precursores metabólicos, RCV), físicos (metales, diferentes tipos de luz) y en ocasiones combinaciones de alguno de estos factores para incrementar la eficiencia. Para que el cultivo *in vitro* de células vegetales tenga aplicación en la producción industrial de metabolitos secundarios, se requiere que estos se puedan obtener

en grandes cantidades; no ocurre así en la mayoría de los cultivos celulares que producen estos compuestos en niveles inferiores a los obtenidos en las plantas de las cuales se derivan tales cultivos. No obstante, este panorama cambia rápidamente, la producción de algunos metabolitos específicos ha aumentado mediante diferentes métodos (Fig. 3.10).

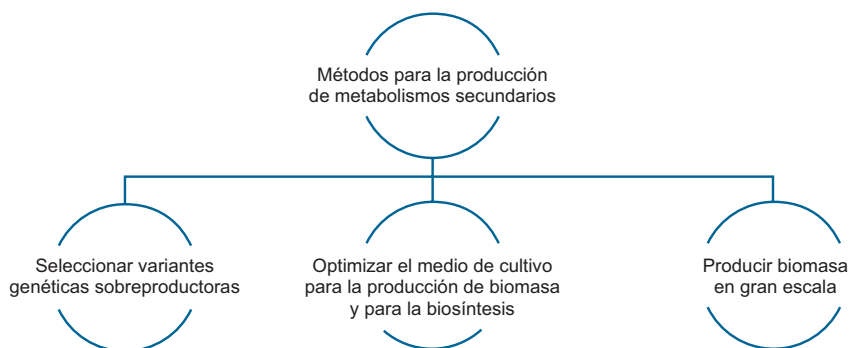


Figura 3.10. Principales métodos para la producción de metabolitos secundarios en grandes cantidades usando técnicas biotecnológicas.

Como ejemplo, la planta Llantén (*Plantago major*) (Fig. 11) es usado en muchas partes del mundo, entre ellos México, para el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades, pues posee propiedades medicinales antiinflamatorias, antidiarreicas y cicatrizantes, entre otras. Los estudios se han realizado desde los años 60's en diversas partes de la planta para identificar sus constituyentes químicos (carbohidratos, lípidos, alcaloides, terpenos, flavonoides, vitaminas, etc.), relacionados con la actividad biológica. Esta planta silvestre crece en todo el mundo y es considerada maleza, y aunque se piense que es una planta abundante, actualmente se ve perjudicada por actividades agronómicas, explotación y otros factores que pueden conducir a su erosión. En otras investigaciones se mencionan parámetros generales para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de esta especie, pero es necesario seguir aplicando esta tecnología a muchas otras plantas de interés por su uso y/o condiciones de conservación. En este sentido, debe evitarse que el consumo de especies vegetales silvestres se intensifique para no ocasionar su extinción, por lo que es inminente desarrollar técnicas sustentables como el CTV, que puede hacer posible la producción planificada, controlada y manipulada de compuestos

bio-activos poseedores de propiedades curativas. Esta técnica también se puede aplicar para especies cuya multiplicación por métodos convencionales, ya sea por semillas o por métodos asexuales, es poco eficiente.



Figura 3.11. *Plantago major* (García, 2015)

En los cultivos *in vitro* es común que se empleen diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV) como lo son las citocininas, vinculadas al crecimiento y desarrollo de las plantas. Después del establecimiento del cultivo *in vitro* a partir de semilla de la especie *E. heterophyllum* (Fig. 3.12) en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la UAA, se puede apreciar (Fig. 3.13) como la meta-Topolina, RCV del grupo de las citocininas, usada en diferentes concentraciones, influye en el desarrollo de la planta.



Figura 3.12. *E. heterophyllum* 26 días después de la germinación de la semilla.

También se puede observar la generación de raíces.

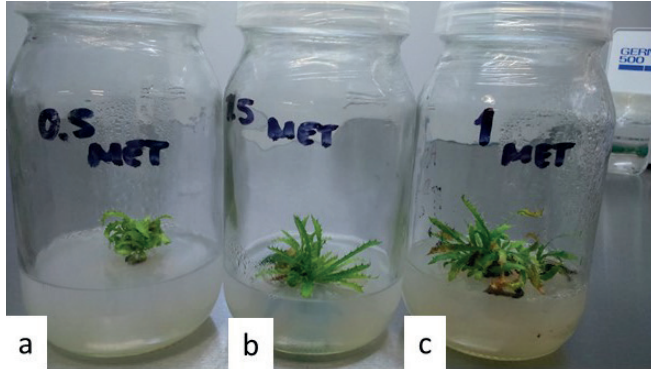


Figura 3.13. *E. heterophyllum* con meta-Topolina en concentraciones de a) 0.5 mg/L b) 1.5mg/L y c) 1mg/L. Obsérvese la respuesta del tejido ante las diferentes concentraciones, hay formación de raíz en (b) y un mayor crecimiento en (c)

Al influir en el desarrollo de la planta, también es importante investigar si los reguladores de crecimiento o si el mismo cultivo *in vitro* provoca variaciones en la producción de metabolitos secundarios. Se realizó una investigación

sobre la producción de metabolitos secundarios mediante la capacidad antioxidante en *Aloe arborescens*, detectando compuestos irinoides, fenólicos, flavonoides y taninos condensados, a partir de plantas regeneradas *in vitro*, llegando a la conclusión que de manera particular la adición de los reguladores de crecimiento vegetal en el *A. arborescens* aumentan considerablemente la producción de estos metabolitos en comparación con los medios a los que no se le añadieron RCV, sin embargo de igual manera se notó que a partir de cierta concentración es donde alcanza su punto máximo. Esto puede servir como base no solo para la proliferación, si no para la producción de metabolitos secundarios a largo plazo. Por otro lado, el análisis fitoquímico se ha intensificado en una gran diversidad de especies. Por ejemplo, se reportó en un estudio preliminar en 78 plantas usadas tradicionalmente en Perú con fines medicinales, usando pruebas químicas cualitativas para identificar la presencia de metabolitos secundarios encontrando alcaloides, flavonoides, cardiotónicos, saponinas, taninos, esteroides y antocianinas en diferentes proporciones. Este tipo de estudios permite dirigir investigaciones más precisas sobre alguna especie o metabolito en particular. De esta manera se han realizado la caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco) por medio de una marcha fitoquímica (Fig. 3.14), metodología que se basa en realizar extracciones con solventes y separarlo en diversas fracciones a las que se les pueden realizar pruebas cualitativas (tabla 3.3) para determinar la presencia de los diferentes metabolitos.

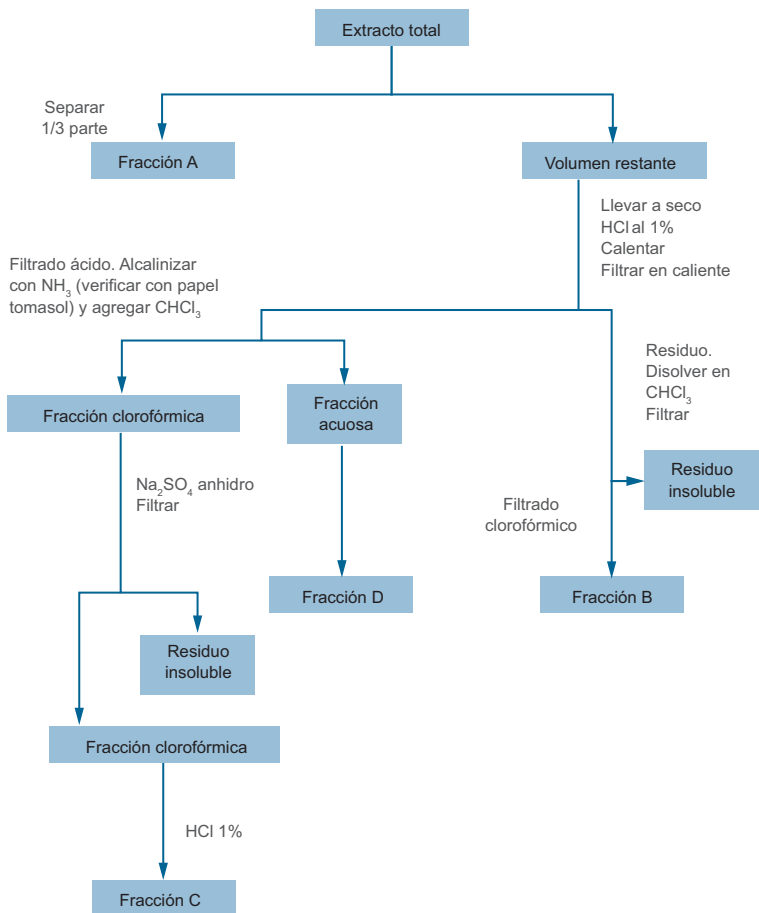


Figura 3.14. Secuencia para separar las fracciones de un extracto de una planta obtenido por el uso de diferentes solventes y poder realizar un escrutinio fitoquímico, modificado de Ardoino (2017).

Tabla 3.3. Pruebas químicas cualitativas para determinar la presencia de metabolitos secundarios, en fracciones obtenidas a partir del extracto de la planta con diferentes solventes

Fracción	Metabolito	Prueba
A	Flavonoides	Reacción de Shinoda
	Taninos y OH fenólicos	Reacción de Cloruro Férrico
		Reacción con gelatina
	Lípidos	Yodo
	Hidratos de carbono	Reacción con fenol
B	Núcleos esteroidales y triterpenos	Reacción de Liebermann-Burchard
	Antraquinonas	Reacción de Borntrager directa
	Alcaloides	Reacción de Dragendorff
C	Cardenólidos	Reacción de Kedde
	Estructuras esteroidales	Reacción de Liebermann-Burchard
	Leucoantocianidinas	Reacción de Rosenheim
D	Compuestos fenólicos	Reacción de Cloruro Férrico
	Proteínas y péptidos	Reacción de Biuret
REACCIONES DIRECTAS	Saponinas	Poder afrógeno
		Poder emulsificante
	Proteínas-aminogrupos	Reacción de Ninhidrina (sobre papel)

Otro tipo de técnicas como las cromatográficas y/o espectrométricas se usaron para determinar la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos en cactus globulares y columnares, estas plantas producen una amplia gama de metabolitos secundarios implicados en el mecanismo de defensa frente a estrés biótico y abiótico. Los datos revelaron que el nivel de algunos constituyentes químicos podría dar valor agregado a estas especies desde el punto de vista nutricional, farmacológico y biológico.

Acoplando la biotecnología con el análisis fitoquímico comienzan a surgir estudios interesantes. Se tiene el caso donde se realizó un escrutinio fitoquímico mediante cromatografía en capa fina a partir de raíces transformadas de *Bidens odorata*, encontrando que tienen la capacidad de sintetizar compuestos diversos como alcaloides, derivados de antraceno, aceites esenciales, flavonoi-

des, saponinas, esteroides y triterpenos. Estos metabolitos secundarios están presentes tanto en la parte aérea como en raíces de las plantas, por lo que los resultados demuestran que las raíces transformadas pueden ser una opción viable para la obtención de los compuestos de interés farmacológico. En otro ejemplo, haciendo uso de métodos instrumentales de análisis como la cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS) se detectaron 44 metabolitos y lograron identificar 43, a partir de cultivos *in vitro* de *Coryphantha macromeris*, siete compuestos son reportados por primera vez para especies de cactáceas. Algunos ácidos orgánicos (ácido cítrico, glucónico y tianshico) y ácidos fenólicos (ácido piscídico, ferúlico y siringico y/o sus derivados) se encontraron como los metabolitos de mayor abundancia relativa, resaltando así el potencial del CTV como una alternativa para la obtención y estudio de metabolitos de interés. Cabe destacar el uso de técnicas combinadas para separar e identificar los componentes de una mezcla. En este caso la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (sigla inglesa HPLC) es una técnica de separación muy utilizada, en la que el tamaño de partícula de la fase estacionaria generalmente es de 2 a 5 μm , pero recientemente se han incorporado tamaños de partícula menores a 2 μm , lo que se traduce en una separación más eficiente, aunque se requiere de bombas de presión de mayor capacidad (más de 6.000 psi), por lo que a ésta se la denomina UPLC, o UHPLC, hablándose de ultra-HPLC. En cuanto a los analizadores de masas, se cuenta con analizadores de cuadrupolo, de trampa de iones, y de tiempo de vuelo. Los desarrollados últimamente son los analizadores de trampa de iones que permiten atrapar ciertos iones y someterlos a una fragmentación posterior, logrando obtener un nuevo espectro de masas, lo que lleva a la técnica denominada espectrometría de masas tándem, conocida por la sigla inglesa MS/MS. Los espectros así obtenidos proporcionan mayor información de los procesos de fragmentación, lo que es muy útil para la dilucidación estructural de los metabolitos secundarios. También es importante mencionar el uso cada vez más extendido de las redes de datos moleculares como por ejemplo la red social global de productos Naturales (Global Natural Products Social Molecular Network, GNPS), que combinada con otras herramientas disponibles en línea como LipidsXplorer, permite la desrepleción, identificación y caracterización estructural de diferentes productos naturales como lípidos y alcaloides esteroidales. De esta manera, la combinación de técnicas junto con el uso de las bases de datos, facilita mucho el análisis de los

metabolitos ya conocidos y ayuda en el hallazgo de otros nuevos. En estudio reciente lograron determinar y aislar por medio de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas un derivado del ácido ferúlico (feruloil-glucósido) a partir de raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophoroides*, compuesto que se reporta por primera vez y que no se detectó en las raíces sin transformar (control), siendo nuevamente la biotecnología vegetal una opción si se desea producir este compuesto en grandes cantidades.

El registro de este tipo de investigaciones aumenta de manera importante, resaltando que el escrutinio fitoquímico preliminar sigue siendo una estrategia valiosa para tener un panorama general de los metabolitos presentes en alguna especie de interés; con el apoyo de los métodos instrumentales se puede separar, identificar y cuantificar compuestos y la biotecnología vegetal es una herramienta excelente para el estudio y producción de estos metabolitos.

Protocolo

Protocolo 3.1 Análisis fitoquímico preliminar en plantas propagadas *in vitro*

Para determinar el efecto de la propagación *in vitro* en una especie vegetal con relación a la producción de metabolitos secundarios, es deseable hacer una primera aproximación comparando de manera cualitativa la presencia de grupos de compuestos entre el cultivo *in vitro* y *ex vitro*. Se inicia con seleccionar la especie de interés y establecer su cultivo *in vitro*, para encontrar las condiciones más favorables para su micropropagación. Cuando se tiene material vegetal suficiente en ambos tipos de cultivo se puede realizar el escrutinio fitoquímico.

En el caso de *Eryngium* los estudios sobre esta familia son muy extensos, sin embargo, no hay estudios referentes a la micropropagación de *Eryngium heterophyllum*, por otra parte, existen estudios de especies pertenecientes a la misma familia, tal es el caso de *Eryngium foetidum* (cilantro cimarrón) el cual se logró micropropagar mediante el uso de medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1.5mg/L de bencilaminopurina (BAP) y 0.1mg/L de ácido naftalenacético (ANA). Considerando esta referencia se desarrolla un sistema de cultivo *in vitro* para la especie seleccionada (Revisar capítulo 1).

- Material vegetal: planta *Eryngium heterophyllum* propagada *in vitro* y *ex vitro*
- Procedimiento:
 - a) Preparación de la muestra. Para la obtención del material seco de *E. heterophyllum*, se pesaron aproximadamente 5 g de la parte aérea de la planta *ex vitro* e *in vitro*. Se secaron al sol siendo cubiertas de la radiación directa con papel estraza durante una semana.
 - b) Obtención de extractos. Las muestras secas se trituraron con mortero y se dividieron en tres porciones aproximadamente de 0.20 g cada una. Se añadió el solvente a usar: metanol, cloroformo y agua acidificada con HCl al 5% (v/v) para tener un volumen final de 10 mL. Cada muestra se calentó en baño maría durante 10 minutos a reflujo. Pasado este tiempo, si es necesario se completa el volumen perdido de cada solvente hasta obtener un volumen de 10 mL. Los extractos se dejaron 1 día en oscuridad para una mejor extracción de los compuestos.
 - c) Pruebas cualitativas (a la gota) para principios activos. Se realizaron diversas pruebas para determinar la presencia de diferentes grupos químicos de metabolitos secundarios, adaptación del protocolo propuesto por Bussmann y Barba. Se utilizaron los extractos (metanólico, cloroformo y agua acidulada con HCl al 5% v/v) tanto de las muestras *in vitro* como *ex vitro* y las pruebas se realizaron en una placa de toque de cerámica.

1.- Alcaloides:

- Mayer: Se agregaron 4 gotas de extracto y 2 gotas de reactivo. Este reactivo se prepara al disolver 1.36 g de cloruro mercúrico en 60 mL de agua. Se prepara otra solución con 5 g de yoduro de potasio y 10 mL de agua para disolver la sal. Se mezclan las dos soluciones y se afora a 100 mL. El reactivo sólo se agrega a soluciones previamente aciduladas con HCl o H₂SO₄ diluidos y las muestras no deben contener ácido acético o etanol, pues se disuelve el precipitado blanco que se forma. Es importante agregar unas cuantas gotas del reactivo a la muestra, porque algunos alcaloides son solubles en exceso de éste.

- Dragendorff: El reactivo se prepara a partir de dos soluciones. Para la primera se disuelven 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20 mL de ácido nítrico al 30%. La segunda solución es a partir 27.2 g de yoduro de potasio disueltos con 50 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan en reposo durante 24 horas. Decantar la solución (para separar residuos de cristales de nitrato de potasio) y aforar con agua a 100 mL. El reactivo preparado se emplea en soluciones aciduladas. Para la prueba se agregaron 4 gotas de extracto y 2 gotas de reactivo. La prueba es positiva al formarse un precipitado color marrón naranja.
 - Wagner: Se agregaron 4 gotas de extracto y 2 gotas de reactivo el cual se prepara a base de yodo. Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua, se afora la solución a 100 mL con agua destilada. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman un precipitado color marrón.
 - Marquis: Se añadieron 4 gotas en placa de toque del extracto y 2 gotas de reactivo. Para el reactivo se agregan 5 gotas de formol al 40% a 3 mL de H_2SO_4 concentrado. La heroína y la morfina dan en forma inmediata una coloración rojo púrpura, luego pasa a coloración violeta y finalmente a coloración azul.
- 2.- Esteroides: Prueba de Liebermann-Burchard, el reactivo que se prepara mezclando 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfría a 0 °C y se añade una gota de ácido sulfúrico. Se colocaron 4 gotas de extracto en placa de toque y se agrega gota a gota el reactivo. La prueba es positiva si el extracto cambia de color a azul, verde, rojo o naranja.
 - 3.- Lignanos: A una alícuota de 5 gotas de extracto se le agregó una gota de formol y una gota de ácido sulfúrico concentrado y se calentó. La prueba es positiva por la formación de un color rojo.
 - 4.- Quinonas: Prueba de Borntrager. Se tomaron 5 gotas de los extractos y se secaron a temperatura ambiente en placa de toque, se resuspendieron en 5 gotas de tolueno y se añadieron 5 gotas de NaOH al 5%. La aparición de una coloración roja en la fase acuosa se tomó como positivo.
 - 5.- Flavonoides: Prueba de Shinoda. Se colocaron 5 gotas del extracto, se les añadió unas piezas de limadura de Magnesio y tres gotas de ácido clor-

hídrico concentrado. La prueba fue tomada positiva con la aparición de una coloración roja.

- 6.- Taninos: Prueba con cloruro férrico. A 5 gotas de extracto se añaden dos gotas de solución de FeCl_3 preparada al disolver 1.25 g de esta sal en 25 mL de agua y después aforar a 50 mL con alcohol metílico. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado como resultado positivo.

Resultados

Se encontraron pequeñas diferencias en el contenido de algunos metabolitos secundarios para la especie *E. heterophyllum* al comparar las muestras *in vitro* y *ex vitro*, como se puede apreciar en la tabla 3.4. La presencia de precipitados o cambio de coloración (Fig. 3.15) fueron tomados como resultado positivo para cada prueba en específico, esto permite tomar decisiones para continuar con la investigación de esta especie.

Tabla 3.4. Comparación del análisis fitoquímico preliminar de *E. heterophyllum*, cultivada *in vitro* y *ex vitro* en extractos con metanol, cloroformo y agua acidulada con HCl al 5%(v/v)

Metabolito	Prueba	<i>In vitro</i>			<i>Ex vitro</i>		
		Metanol	Cloroformo	HCl(5%)	Metanol	Cloroformo	HCl(5%)
Alcaloides	Mayer	+	+	+	+	+	+
	Dragendorff	+	++	++	+	+	+
	Wagner	+	++	++	+	+	+
	Marquis	+	+	+	+	+	+
Esteroides	Liebermann-Burchard	++	+	-	+	+	-
Lignanós	Formol	-	-	+	-	-	-
Quinonas	Borntrager	-	-	-	+	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	-	+	+	-	+
Taninos	FeCl_3	+	-	-	+	-	-

Escala cualitativa: (+) = Presencia; (-) = Ausencia

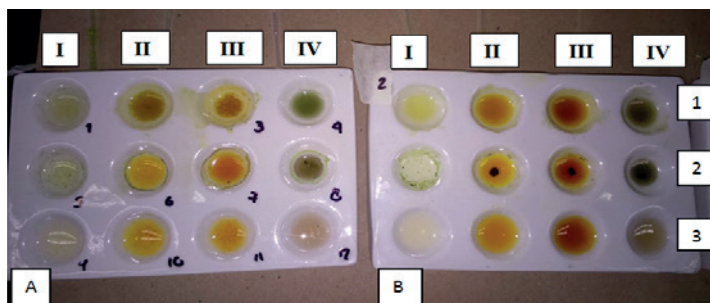


Figura 3.15. Prueba para la determinación de alcaloides. A) Muestra *in vitro*, B) Muestra *ex vitro*. 1) extractos metanólicos, 2) extractos con cloroformo, 3) extractos con agua acidulada (HCl al 5%) por medio de las pruebas de I) Mayer, II) Dragendorff, III) Wagner y IV) Marquis para la especie *E. heterophyllum*.

Abreviaturas

AIA: ácido indolacético

ANA: ácido naftalenacético

BAP: bencilaminopurina

CTV: cultivo de tejidos vegetales

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

IR: infrarrojo

MS: espectrofotometría de masas

mT: metatopolina

RMN: resonancia magnética nuclear

Glosario

Análisis cualitativo: identificar la presencia de ciertos grupos de compuestos en una muestra por medio de pruebas químicas.

Fitoquímica: ciencia que permite conocer de manera integral, algunos de los muchos productos químicos naturales en las plantas.

Metabolito secundario: compuestos producidos por las plantas que no tienen una función reconocida o concreta.

Bibliografía

- Albarracín, C. (2012). Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación de cilantro cimarrón (*Eryngium Foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis para obtener grado de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejercito. Ecuador.
- Almaraz, N., Ávila, J., Delgado, E., Naranjo, N. & Herrera, J. (2006). El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. *Vid Supra*, 1, 39-49
- Amoo, S., Aremu, A. & Van Staden, J. (2012). *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micro-propagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111, 345–358
- Ardoino, S., Boeris, M. & Toso, R. (2017). Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Ciencia Veterinaria*, 15(1), 115-125.
- Barba, J. (1997). Introducción al análisis de productos naturales; laboratorio de fitoquímica. Universidad Autónoma Metropolitana. Ed. Casa abierta al tiempo. México.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E. (2001). Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839–851.
- Bussmann, R., Glenn, A., Meyer, K., Rothrock, A., Townesmith, A., Sharon, D., Castro, M., Cardenas, R., Regalado, S., Del Toro, R., Chait, G., Malca, G. & Perez, F. (2009). Phyto-Chemical Analysis of Peruvian Medicinal Plants - Análisis fitoquímico de plantas medicinales peruanas. *Arnaldoa*, 16(1), 105 - 110.
- Cabañas, E., Areche, C., Gómez, Y., Jáuregui, J., Cruz, F. & Pérez, E. (2019). Phytochemical profile of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose Cactaceae obtained from *in vitro* culture. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 239-249.
- Dias, M., Sousa, M., Alves, R. & Ferreira, I. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82, 9- 22.

- Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa, México.
- Ege, S. (1998). Química orgánica: Estructura y reactividad, Volumen 2. Editorial Reverte.
- Estrada, M. (2010). Producción de fenilpropanoides en cultivos celulares y rizogénicos de *Buddleja cordata*, planta empleada en la Medicina Tradicional Mexicana. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- García, G. (2015). Plantas medicinales de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México
- Jordan, M. & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Fisiología Vegetal (Squeo F. y Cardemil L. eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile 15, 19-22
- Kuklinski, K. (2003). Farmacognosia. (1ª ed.) Ediciones Omega S.A. Barcelona, España.
- Li, P., Chen, H., Li, YX. (2005). Establishment and optimization of *in vitro* regeneration system for *Plantago major* L. *Chinese Journal of Biotechnology*, 21(6),916-22.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. (2ª ed.) Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Venezuela.
- Martínez, A. (2020). Química de productos naturales. (1ª ed.) Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia.
- McKenzie, M., Kirakosyan, A. & Kaufman, P. (2009). Risks Associated with Overcollection of Medicinal Plants in Natural Habitats. En: *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Boston, MA: Springer.
- Mederos, S., Martin, C., Navarro, E. & Ayuso, M. (1997). Micropropagation of a medicinal plant, *Plantago major* L. *Biología plantarum*, 39(3), 465-468.
- Muñoz, F. (2002). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesamiento. Editorial Mundi-prensa Libros.
- Osbourn, A., Lanzotti, V., Springob, K. & Kutchan, T. (2009). Introduction to the Different Classes of Natural Products. *Plant-derived Natural Products*, 3-50.

- Paladino, S. (2001). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de maestría. Universidades Nacionales del Cuyo La Rioja, San Juan y San Luis.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. & Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106.
- Pence, V. (2011). Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. In *Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant*, 47, 176–187.
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27:76-89.
- Ramakrishna, A. & Ravishankar, G. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720–1731.
- Ringuelet, J. & Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. Argentina: Editorial Universidad de la Plata.
- Robert, M., Reyes, J. & Loyola, V. (1998). Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. Centro de Investigación científica de Yucatán, México.
- Rojas, A., Jaramillo, J. & Lemus, B. (2015). Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. Machala: Ecuador.
- Romeo, J. (2003). Integrative phytochemistry from ethnobotany to molecular Ecology. Volumen 37. Tampa, Florida: Universidad de Florida.
- Samuelsen, A. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), 1–21.
- Santos, M. & Camarena, N. (2019). Cacti for production of metabolites: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(21-22), 8657–8667.
- Simmonds, M. (2009). Opportunities and Challenges for Ethnobotany at the Start of the Twenty-First Century. En: *Plant-derived Natural Products*. (Pp 127-140). New York, USA: Springer
- Solis, G., Zamilpa, A., Cabañas, E., Bahena, S., Pérez, E. & Gómez, Y. (2020). Identification and quantitative determination of feruloyl-glucoside from hairy root cultures of *Turbinicarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. &

- Backeb. (Cactaceae). In Vitro *Cellular & Developmental Biology - Plant*. 56, 8–17
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. España.
- Torres, B., Morales, J., Fraire, S. & Pérez, E. (2018). Generación de cultivos de raíces transformadas de la planta medicinal *Bidens odorata* Cav (Compositae) y análisis fitoquímico preliminar. *Polibotánica*, (46), 241-257.
- Wink, M. (2007). Cap. 6 Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application (pp. 97-116). Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

