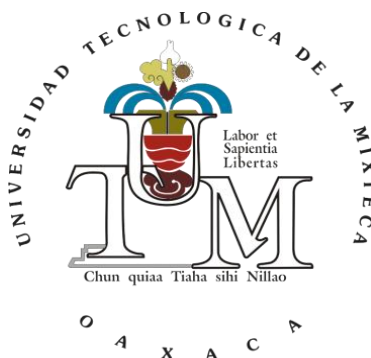




UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

“Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides* (casahuate)”

Tesis para obtener el título de:

Ingeniero en Alimentos

Presenta:

Magdalena Paz Oropeza Guerrero

Director de Tesis:

Dr. Raúl Salas Coronado

Co-Directora de Tesis:

Dra. Norma Francenia Santos Sánchez

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Septiembre de 2012

DEDICATORIA

Este momento tan importante está dedicado a las maravillosas personas que siempre han estado conmigo y que son parte de mí.

A Dios.

A Guino, Nandito y a Dany.

A Nash, Alí y a mi papá.

A mis mamis: Fide, Maty y Olga Ballesteros.

Su apoyo hizo posible lo que en algún momento creí imposible.

Todo mi cariño es para cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Todo lo que encierra este trabajo se lo debo a las personas con las que coincidí mientras realizaba este proyecto. Esta ocasión quiero expresarles mi agradecimiento.

Guino, tú eres mi otra parte, la parte que siempre me ha impulsado a seguir adelante pese a cualquier adversidad. Gracias amor por apoyarme.

Nando y Dany mis queridos niños, ustedes siempre han sido mi sostén. No olvido la ocasión en que quise dejar todo y ustedes no lo permitieron, muchas gracias.

A mis papás y a mis hermanos, les agradezco su cariño y el apoyo que siempre me dieron. A mi familia política, quienes me enseñaron que pese a cualquier desacuerdo, la familia siempre está cuando los necesitas.

Dres. Raúl Salas Coronado y Norma F. Santos Sánchez, fue una fortuna ser dirigida por ustedes en este proyecto porque sin importar el momento, ustedes siempre me atendieron. Gracias.

A mis sinodales Paula C. Guadarrama Mendoza (a quien admiro porque aun teniendo mil cosas prioritarias, las dejó para atenderme) y Edith G. Mendoza González (quien en poco tiempo hizo la revisión del trabajo).

A los profesores que me tuvieron como alumna, por contribuir en mi formación profesional y personal. Específicamente al M. C. Evaristo Isaac Velásquez.

No pueden faltar mis amigos los ingenieros Aidecita, Ana, Andre, Clau, Checa, Fran, Karlita, Nancy y el M. C. Erickcito. Quienes a pesar de la diferencia de edades me vieron como una más de la banda. Y por supuesto mis otras amigas: Ramona, Paty, Amparito, Perlita, Betty, Olga, Nubia quienes siempre me echaron porras.

Al instituto de Hidrología: Cori, Uli y Sofi por prestarme los equipos de laboratorio. A Sarita y a Doña Lucy.

Al Jefe del área de Jardinería: Sr. Víctor Tolentino Flores Gil y los Sres. Gonzalo Sandoval Reyes y Martín Ocampo Guzmán quienes me apoyaron para obtener muestras del casahuate.

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Parte de este trabajo se presentó en el XLVI Congreso Mexicano de Química en el Concurso Nacional de Carteles Estudiantiles (Nivel Licenciatura), organizado por la Sociedad Química de México, en Querétaro, Qro., el 13 de Septiembre de 2011.

RESUMEN

Ipomoea murucoides (casahuate), pertenece a un género que se caracteriza por contener sustancias con propiedades tales como antimicrobianas, antifúngicas, herbicidas, así como actividad sobre el sistema nervioso central. Estas propiedades están asociadas con alcaloides y compuestos fenólicos. Por lo anterior, en esta investigación se cuantificaron alcaloides, fenoles y flavonoides totales por métodos espectrofotométricos de extractos metanólicos de las hojas de *I. murucoides*. También se cuantificaron el poder antioxidante como reducción férrica (FRAP, *Ferric Reducing Antioxidant Power*), la actividad antirradicalar (EC_{50}) y la eficiencia antirradicalar (AE, *Antiradical efficiency*) empleando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) de dichos extractos metanólicos. La cantidad encontrada de alcaloides totales fue de 28.90 ± 1.10 μ moles ECCN/100 g ms, mientras que fenoles totales 100.20 ± 2.64 mg GAE/100 g ms y de flavonoides totales de 45.15 ± 2.25 mg CE/100 g ms. La actividad antioxidante por el ensayo FRAP fue de 92.00 ± 4.31 μ g/mL TE/100 g ms, EC_{50} de $3\ 296.59 \pm 61.20$ μ g/mL ms, T_{EC50} 51 minutos y AE 1.19×10^{-7} kg DPPH•/g ms•min.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	vi
Índice de figuras	x
Lista de tablas	xii
Lista de abreviaturas	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3 Importancia del estudio	4
1.4 Limitaciones del estudio	4
2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS	6
2.1 Generalidades de <i>Ipomoea murucoides</i>	6
2.2 Propiedades biológicas del género <i>Ipomoea</i>	8
2.3 Componentes bioactivos	13
2.4 Alcaloides	14
2.5 Métodos utilizados para determinar alcaloides totales	15
2.6 Compuestos fenólicos	16
2.7 Métodos utilizados para determinar actividad antioxidante	17
3. METODOLOGÍA	21
3.1 Equipos, reactivos y disolventes	21
3.2 Obtención de la muestra	22
3.3 Determinación de humedad en hoja fresca y seca	23
3.4 Análisis químico	24
3.4.1 Obtención de los extractos metanólicos	24
3.4.2 Remoción de clorofilas	24
3.4.3 Separación de alcaloides de compuestos fenólicos	24
3.4.4 Cuantificación de alcaloides totales	25

	Página
3.4.5 Cuantificación de fenoles totales	26
3.4.6 Cuantificación de flavonoides totales	27
3.4.7 Cuantificación del poder antioxidante expresado como reducción férica (FRAP)	28
3.4.8 Cuantificación de la actividad antirradicalar	29
3.4.9 Cinética de eficiencia antirradicalar	30
3.5 Análisis estadístico	31
4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
4.1 Obtención de los extractos	32
4.2 Cuantificación de alcaloides, fenoles y flavonoides totales	33
4.2.1 Alcaloides totales	33
4.2.2 Fenoles totales (FT)	34
4.2.3 Flavonoides totales (FVT)	36
4.3 Evaluación de la actividad antioxidante	37
4.3.1 FRAP	37
4.3.2 Actividad antirradicalar frente al DPPH•	38
4.3.3 Eficiencia antirradicalar (AE)	40
5 CONCLUSIONES	43
6 PERSPECTIVAS	44
7 REFERENCIAS	45
8 APÉNDICE	50
Apéndice 1a. Obtención de extracto metanólico crudo E ₀	50
Apéndice 1b. Obtención de extracto libre de clorofilas E ₁	51
Apéndice 1c. Obtención de extractos E ₂ y E ₃	52
Apéndice 2. Curva de calibración de estándares de cinconina para la cuantificación de alcaloides totales	53
Apéndice 3. Curva de calibración de estándares de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales	54
Apéndice 4. Curva de calibración de estándares de (+)-catequina para la cuantificación de flavonoides totales	55

	Página
Apéndice 5. Curva de calibración de estándares de trolox para la cuantificación FRAP	56
Apéndice 6. Curva de calibración de estándares de Fe_2SO_4 para la cuantificación FRAP	57
Apéndice 7. Curva de calibración de estándares de ácido gálico para la cuantificación de DPPH•	58
Apéndice 8. Curva de calibración de estándares de rutina para la cuantificación de DPPH•	59
Apéndice 9. Análisis estadístico	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Ipomoea murucoides</i> .	6
Figura 2. Criterios taxonómicos de <i>Ipomoea murucoides</i> *.	7
Figura 3. Estructuras químicas de la ergolina y derivados.	11
Figura 4. Estructura química de la swainsonina.	12
Figura 5. Ácidos di-O-cafeoilquínicos presentes en las raíces de <i>Ipomoea batatas</i> .	12
Figura 6. Estructura propuesta del complejo de verde de bromocresol-cinconina (Rajendraprasad <i>et al.</i> , 2010).	16
Figura 7. Estructura del complejo tricloruro de aluminio-flavonoide.	18
Figura 8. Mecanismo de reacción para el ensayo FRAP frente a un antioxidante (Prior <i>et al.</i> , 2005).	19
Figura 9. Reacción de reducción de DPPH• por antioxidantes.	19
Figura 10. Obtención de extractos E ₁ , E ₂ y E ₃ .	33
Figura 11. Contenido de fenoles totales en especies del género <i>Ipomoea</i> .	35

	Página
Figura 12. Contenido de flavonoides totales en especies del género <i>Ipomoea</i> .	36
Figura 13. Curvas del radical DPPH• inhibido en los extractos E ₁ y E ₂ .	38
Figura 14. Actividad antirradicalar en especies del género <i>Ipomoea</i> .	40
Figura 15. Determinación gráfica de los tiempos T _{EC50} para el extracto E ₂ .	41

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Descripción comparativa entre varias especies arbustivas del género <i>Ipomoea</i> *.	9
Tabla 2. Escala de la eficiencia antirradicalar (AE).	20
Tabla 3. Coordenadas de árboles muestreados de <i>I. murucoides</i> .	23
Tabla 4. Contenido de humedad en hoja fresca y seca de <i>I. murucoides</i> .	24
Tabla 5. Tipos de extractos conteniendo clorofilas y metabolitos secundarios.	32
Tabla 6. Contenido de alcaloides y compuestos fenólicos en extractos de hojas secas de <i>I. murucoides</i> .	34
Tabla 7. Relación flavonoides-fenoles totales en especies de <i>Ipomoea</i> .	37
Tabla 8. Valores FRAP en extractos de hojas secas de <i>I. murucoides</i> .	38
Tabla 9. Estequiometría antioxidante, <i>n</i> , de extractos de hojas secas de <i>I. murucoides</i> y de algunos compuestos fenólicos representativos.	40

Tabla 10. Valores de actividad antirradicalar en extractos de hojas secas de <i>I. murucoides</i> .	41
Tabla 11. Valores de la eficiencia antirradicalar usando radical DPPH• en extractos metanólicos de hojas secas de <i>I. murucoides</i> y controles.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Nivel de significancia
AE	<i>Antiradical efficiency</i> <i>Eficiencia antirradical</i>
CE	<i>Catechin equivalents</i> <i>Equivalentes de catequina</i>
DCQA	<i>Dicaffeoyl quinic acid</i> Ácido dicafeolquínico
DPPH•	<i>Radical 2,2-diphenil-1-picrylhydrazil</i> Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ECCN	Equivalente de cinconina
EC ₅₀	Effective concentration 50 Concentración inhibitoria 50
E ₀	Extracto metanólico crudo
E ₁	Extracto libre de clorofilas
E ₂	Extracto libre de clorofilas y alcaloides
E ₃	Extracto libre de clorofilas y compuestos fenólicos
F	Cociente de los cuadrados de las desviaciones estándar
FRAP	<i>Ferric reducing antioxidant power</i> Poder antioxidante expresado como reducción férrica
FT	Fenoles totales

FVT	Flavonoides totales
GAE	<i>Gallic acid equivalent</i> Equivalente de ácido gálico
<i>gl</i>	Grados de libertad
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alterna
<i>I.</i>	<i>Ipomoea</i>
ms	Masa seca
<i>n</i>	Número de átomos de H transferidos al radical DPPH•
<i>n</i> ₁	3 mediciones del extracto E ₁
<i>n</i> ₂	3 mediciones del extracto E ₂
rpm	Revoluciones por minuto
<i>spp</i>	Varias especies
<i>s</i> ₁	Desviación estándar 1
<i>s</i> ₂	Desviación estándar 2
<i>t</i>	Prueba <i>t</i> de Student
TCQA	<i>Tricaffeoylquinic acid</i> Ácido tricafeoilquínico

TE	<i>Trolox equivalents</i> Equivalente de trolox
T _{EC50}	<i>Time needed to reach the steady state to EC₅₀</i> Tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario correspondiente al EC ₅₀
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine 2,4,6-Tris-(2-piridil)-s-triazina
Trolox	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (±) Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
$\bar{x}_1$	Valor promedio 1
$\bar{x}_2$	Valor promedio 2

1. INTRODUCCIÓN

En México el género *Ipomoea* comprende especies diversas que se han usado durante años en la medicina tradicional. De acuerdo con Díaz-Pontones (2009), estas plantas poseen una cantidad grande de componentes denominados metabolitos secundarios que potencialmente pueden utilizarse como principios activos de medicamentos.

El género *Ipomoea* comprende especies que se caracterizan fitoquímicamente por la existencia de diferentes alcaloides tipo ergolina (Jenett-Siems *et al.*, 2003). Las semillas de *I. violacea* contienen isoergina, chanoclavina y elimoclavina, todos estos alcaloides son derivados del ácido lisérgico y están presentes ampliamente en el género *Ipomoea* y cerca de 50 especies se usan con propósitos medicinales.

En *I. batatas* se han evaluado algunas propiedades bioactivas y funcionales como su actividad antioxidante, contenido de antocianinas y fenoles así como su efecto antimicrobiano (Lobaina-Rodríguez *et al.*, 2007). En el caso de *I. reniformis*, utilizada en la India frecuentemente, los estudios realizados muestran la presencia de resinas, glicósidos, azúcares reductores y almidones. Según Mehul *et al.* (2010), las investigaciones químicas detectaron ésteres de ácidos cafeicos y ferúlicos en sus semillas.

En el caso de *Ipomoea murucoides*, se sabe que los cocimientos de sus hojas, tallos, flores y cortezas se emplean en el tratamiento de dolor e inflamación por golpes y reumas, o en picaduras de algunos insectos (Argueta & Gallardo, 1994).

Basados en el hecho de que el género *Ipomoea* se caracteriza por tener metabolitos secundarios con propiedades biológicas importantes, en este estudio se cuantificaron de los extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides*, alcaloides, fenoles y flavonoides totales. También se evaluó el poder antioxidante para reducir iones Fe^{3+} a Fe^{2+} , la actividad antirradicalar frente al radical DPPH• y la eficiencia antirradicalar. De esta manera, se puede determinar si las hojas de la planta objeto de estudio, poseen el suficiente potencial para ser consideradas como una fuente importante de compuestos bioactivos.

En una primera etapa de esta investigación, se realizó la remoción de clorofilas del extracto metanólico de las hojas de *Ipomoea murucoides*, para evitar interferencias en la cuantificación espectrofotométrica de alcaloides, fenoles y flavonoides totales. La cuantificación de los metabolitos secundarios en el extracto metanólico se realizó por métodos espectrofotométricos. El contenido de alcaloides totales se determinó formando un complejo colorido con verde de bromocresol (Shamsa *et al.*, 2008). Para cuantificar fenoles totales se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteu, cuyas sales de molibdato y tungstato sódico en presencia de compuestos fenólicos se reducen formando un complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico de color azul. En relación a la cuantificación de flavonoides totales, se realizó empleando cloruro de aluminio el cual forma un complejo de color rosa con los flavonoides en medio básico. Todos estos complejos coloridos se miden espectrofotométricamente para cuantificar los metabolitos de interés.

Con la finalidad de evaluar el potencial antioxidante del extracto metanólico de las hojas de *Ipomoea murucoides*, en una segunda etapa de este trabajo se evaluó su poder antioxidante *in vitro* por dos métodos. Uno de estos métodos implica la transferencia de electrones por parte del compuesto o extracto con potencial antioxidante. Esta evaluación se realizó por la transferencia de un electrón del extracto para reducir el ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}) y la consecuente formación de un complejo con la 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ). Por otra

parte, para evaluar la capacidad reductora del extracto mediante el mecanismo de transferencia de radicales hidrógeno, se cuantificó la actividad antirradicalar frente al radical DPPH•.

El ensayo FRAP y el radical DPPH• fueron empleados por ser métodos reproducibles, rápidos y porque son de los más comunes en diferentes investigaciones. Por último, se calculó la eficiencia antirradicalar a partir de los valores obtenidos para EC₅₀ y T_{EC50}.

1.1 Hipótesis

Los extractos metanólicos de las hojas de *Ipomoea murucoides* son una fuente de compuestos bioactivos, tales como alcaloides y fenoles, con actividad antioxidante.

.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Cuantificar alcaloides, fenoles y flavonoides totales, FRAP, actividad antirradicalar frente al radical DPPH• y eficiencia antirradicalar, en los extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides* (casahuate), por métodos espectrofotométricos.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos metanólicos a partir de hojas de *I. murucoides* usando la técnica de ultrasonido.
2. Remover las clorofilas presentes en el material vegetal.
3. Cuantificar alcaloides totales empleando verde de bromocresol (Shamsa *et al.*, 2008).
4. Cuantificar fenoles totales utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Julián-Loaeza *et al.*, 2011).
5. Cuantificar el contenido de flavonoides totales empleando tricloruro de aluminio (Julián-Loaeza *et al.*, 2011).
6. Cuantificar el poder antioxidante como reducción férrica, para reducir

Fe^{3+} a Fe^{2+} utilizando el reactivo FRAP (Ghasemzadeh *et al.*, 2012).

7. Evaluar la actividad antirradicalar frente al radical DPPH• (Gramza *et al.*, 2005).
8. Calcular la eficiencia antirradicalar a partir de los valores obtenidos de EC_{50} y $\text{T}_{\text{EC}_{50}}$ (Gramza *et al.*, 2005).

1.3 Importancia del estudio

En la literatura se describe que el género *Ipomoea* se caracteriza por sus metabolitos secundarios entre los que se destacan alcaloides y compuestos fenólicos. Así mismo, se ha reportado para este género una actividad antioxidante de importancia generada en gran parte por los compuestos fenólicos (Maurya & Srivastava, 2009), (Konczak *et al.*, 2004).

También se ha descrito que *Ipomoea murucoides* investigada mediante técnicas cualitativas, posee compuestos fitoquímicos como saponinas, terpenos, alcaloides, fenoles y flavonoides entre otros. Estos metabolitos secundarios están distribuidos en distintas partes de la planta y le confieren acción antimicrobiana e insecticida (Lina-García, 2006), (Thomas *et al.*, 2004).

La importancia de este estudio radica en la cuantificación de alcaloides, fenoles y flavonoides así como la evaluación de su poder antioxidante. Con esto se logra evaluar el potencial que poseen las hojas de esta planta como una fuente de compuestos bioactivos.

1.4 Limitaciones del estudio

El estudio se limitó a muestras de hojas de *I. murucoides* recolectadas en el campus de la Universidad Tecnológica de la Mixteca a finales del mes de noviembre de 2010, por ser la época del año en que ocurre la defoliación natural de la planta. Los extractos metanólicos de las hojas de *I. murucoides*, se obtuvieron mediante extracción por ultrasonido.

La cuantificación de alcaloides totales, fenoles totales y flavonoides totales se realizó en los extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides*. También se evaluó el poder antioxidante como reducción férrica (FRAP), la actividad antirradicalar frente al radical DPPH• y la eficiencia antirradicalar de los extractos metanólicos de las hojas de *Ipomoea murucoides*.

2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

En la presente sección se describen las características taxonómicas de *Ipomoea murucoides*. También se hace referencia a su bioactividad y se enlistan algunas propiedades de los metabolitos secundarios del género *Ipomoea*, tales como los alcaloides, fenoles simples y flavonoides. Finalmente se mencionan algunos métodos para la cuantificación de alcaloides, fenoles y flavonoides, así como la evaluación del poder antioxidante como reductor férrico y la actividad antirradicalar.

2.1 Generalidades de *Ipomoea murucoides*

La planta *I. murucoides* pertenece a la familia *Convolvulaceae*, Figura 1. El reporte taxonómico en México de esta especie se obtuvo de plantas encontradas entre las localidades de Tejupan-Coixtlahuaca, Oaxaca, latitud 17.683, longitud -97.433 y altitud 2320, de acuerdo a los datos aportados por el Instituto de Biología de la UNAM, Figura 2.



Figura 1. *Ipomoea murucoides*.

Reino	<i>Plantae</i>
Familia	<i>Convolvulaceae</i>
Género	<i>Ipomoea</i>
Epíteto específico	<i>murucoides</i>
Nombre científico	<i>Ipomoea murucoides</i> Roem & Schult
Autor del nombre	Roem & Schult
*Instituto de Biología. “ <i>Ipomoea murucoides</i> Roem & Schult–BUNAM:MEXU: OAX408134”.	

Figura 2. Criterios taxonómicos de *Ipomoea murucoides**.

El género *Ipomoea* comprende 650 especies nativas de zonas templadas y cálidas. La mayoría de ellas habita en África y América tropical. Casi todas las especies del género son arbustos trepadores, aunque existen unas pocas que son arbustivas o arborescentes, tal como *I. murucoides*. Este género es el más representativo de la familia *Convolvulaceae*, son abundantes en el continente americano e importantes por los niveles de toxicidad que muestran al ser ingeridos por los animales (Tecanhuey-Fernández, 2005). Dentro de los usos de estas plantas se pueden mencionar su empleo como cercas vivas de cultivos, como sustrato de producción para hongos seta, como productos ornamentales y con distintas aplicaciones dentro de la medicina tradicional (Lina-García, 2006).

La población de *I. murucoides* es endémica de México y se distribuye principalmente entre los estados de Morelos, Guerrero, Querétaro y Oaxaca, debido a que crecen en matorrales xerófilos (Tecanhuey-Fernández, 2005).

Las *Ipomoeas* son plantas silvestres que cuentan con una gran capacidad de tolerancia a las condiciones extremas. Esto se debe al desarrollo de complejos mecanismos de defensa, lo que las hace diferentes de otras plantas domesticadas que no desarrollaron o perdieron esa habilidad (Díaz-Pontones, 2009). Esto coincide con lo escrito por Rey (1999), quien menciona que algunas especies del género *Ipomoea spp* han sido reportadas como malezas difíciles de manejar en los cultivos del trópico. Éstas poseen semillas con una cubierta de gran dureza,

dando como consecuencia una germinación no uniforme y una producción en casi todas las épocas del año.

Debido a que las características de las hojas del género *Ipomoea* son un parámetro importante en el presente estudio, en la Tabla 1 se describen algunas características.

2.2 Propiedades biológicas del género *Ipomoea*

Actualmente, las plantas del género *Ipomoea* son de gran interés científico debido a que poseen metabolitos secundarios con potente actividad biológica.

Según lo descrito por Jung *et al.* (2011), de los extractos etanólicos de flores, hojas, tallos y raíces de *I. batatas* se determinaron propiedades bioactivas y funcionales. Se evaluó la actividad antioxidante frente al radical DPPH•, el contenido de antocianinas y fenoles utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, así como su efecto antimicrobiano.

En el caso de *I. reniformis*, que se ha utilizado en la medicina tradicional de la India, las investigaciones mostraron la presencia de resinas, glicósidos y azúcares reductores. En las semillas se detectaron ésteres de los ácidos caféico, ferúlicos y del ácido sinápico (Mehul *et al.*, 2010).

El género *Ipomoea* comprende especies que se caracterizan fitoquímicamente por la existencia de diferentes alcaloides tipo ergolina, Figura 3. Este heterociclo está constituido por un fragmento indólico, producto de la transformación bioquímica de la serotonina (Jenett-Siems *et al.*, 2003). La estructura más común de los alcaloides ergóticos es el anillo de ergolina metilado en el nitrógeno 6 y con sustituyentes de estructura diversa en el carbono 8 (Flieger *et al.*, 1997).

Tabla 1. Descripción comparativa entre varias especies arbustivas del género *Ipomoea**.

	<i>Ipomoea murucoides</i>	<i>Ipomoea chilopsidis</i>	<i>Ipomoea intrapilosa</i>	<i>Ipomoea pauciflora</i>	<i>Ipomoea rzedowskii</i>
Hábito	Árbol, 3 a 13 m	Arbusto, 2 a 6 m	Árbol, 3 a 10 m	Árbol, 3 a 8 m	Arbusto, 1 a 3 (5) m
Forma de la hoja	Lanceolada, elíptica a linear	Linear	Lanceolada a estrechamente ovada	Ovada	Ovado-lanceolada a anchamente lanceolada
Número de flores por cima	1 ó 2	1 a 3	1 a 3 hasta 5	1 a 5	1 hasta 3
Forma de los sépalos	Ovados, o ampliamente oblongos, obtusos o agudos en el ápice	Ovados, obtusos o agudos en el ápice	Ovados, obtusos, ápice obtuso mucronado agudo	Ovados, a oblongos, obtusos o agudos, mucronados en el ápice	Ovados con ápice obtuso
Color de la corola	Blanca, la garganta roja oscura a purpúrea	Blanca, la garganta purpúrea	Blanca, con tonos amarillentos y verdosos	Blanca, la garganta roja a purpúrea oscura	Blanca
Semillas	Pilosa en los márgenes dorsales	Pilosa en los márgenes dorsal y ventral	Pilosa en los márgenes dorsales	Pilosa en los márgenes dorsales	Pilosa en los márgenes dorsal y ventral
Meses de floración	Octubre – Abril	Julio - Septiembre	Octubre – Abril	Septiembre - Febrero	Julio – Septiembre

*Datos tomados del Acta Botánica Mexicana (Carranza-González *et al.*, 1998).

Las semillas de *I. violacea* contienen isoergina, chanoclavina y elimoclavina, Figura 3, todos estos compuestos son derivados del ácido lisérgico y están presentes ampliamente en el género *Ipomoea* y cerca de 50 especies se usan con propósitos medicinales. Los efectos que producen estos alcaloides son somnolencia y vaguedad mental (Witters, 1975).

Otro alcaloide presente en plantas del género *Ipomoea* es el lisergol, Figura 3, que se emplea como hipotensivo, analgésico psicotrópico y como droga estimulante del intestino y el útero. El lisergol también se emplea para sintetizar cabergolina, una droga empleada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Maurya & Srivastava, 2009).

Las ipomoeas se usan ampliamente en la medicina tradicional de muchos países para tratar desórdenes intestinales, como diarreas, espasmos, debido a sus propiedades antiespasmódicas. La *I. pes caprae* se emplea contra la inflamación, desórdenes gastrointestinales y como agente analgésico (Emendörfer *et al.*, 2005).

I. carnea, induce severas intoxicaciones a mamíferos tales como los borregos, las vacas y las cabras que ingieren las partes aéreas de esta planta. Las características clínicas de la intoxicación son: inapetencia y pérdida de peso; además sufren una alteración del sistema nervioso central manifestado como temblores de cabeza, hiperestesia y la muerte (Hueza *et al.*, 2003).

Los principales alcaloides de *I. carnea* son de tipo nortropano, calistegina B2 y C1, y de tipo indolizidina, swainsonina (Hueza *et al.*, 2003). La swainsonina, que es un derivado de la lisina, Figura 4, también se ha aislado de *Swainsona canescens*. Las investigaciones realizadas demuestran que inhibe a la enzima glicosidasa, la cual, forma parte de la síntesis de glicoproteínas que influyen en la proliferación del virus del VIH (Arango, 2008).

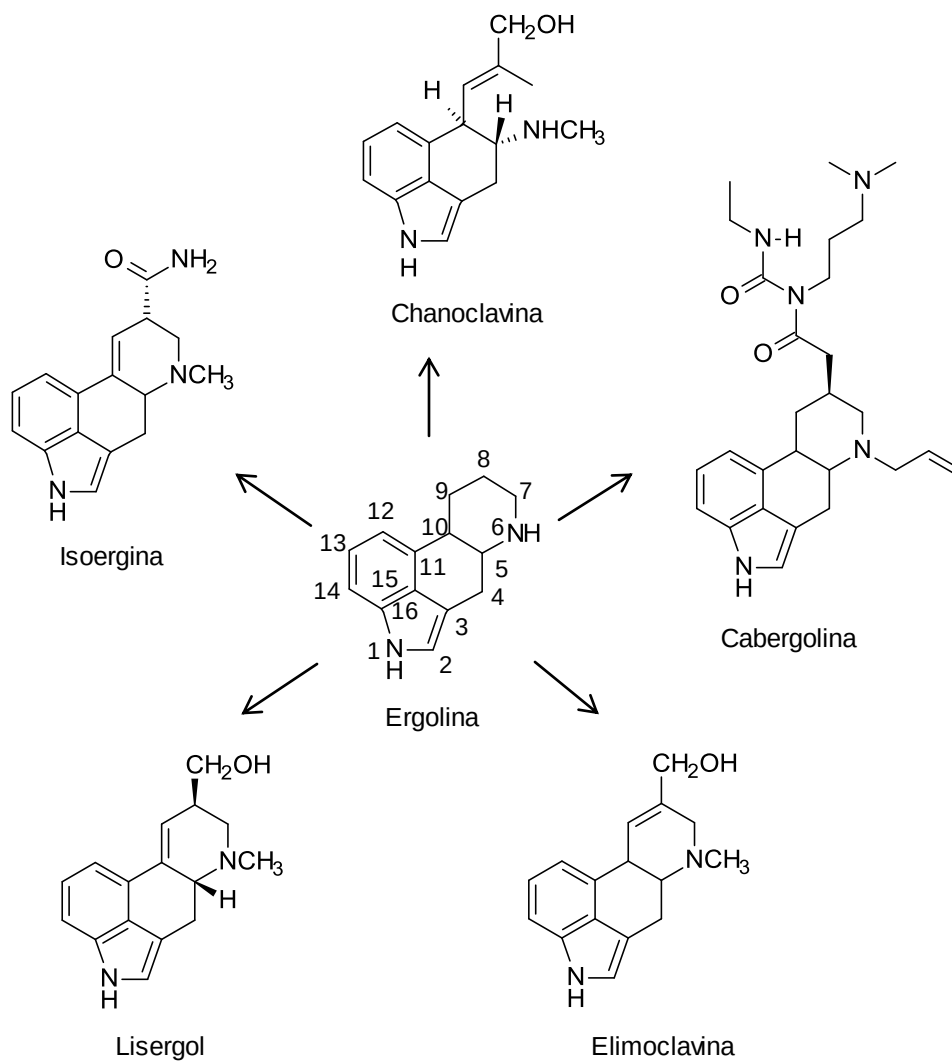


Figura 3. Estructuras químicas de la ergolina y derivados.

Por otra parte, los ácidos cafeoilquínicos en *I. batatas*, han mostrado actividad antifúngica. También se ha encontrado que el ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-TCQA) y los isómeros del ácido dicafeoilquínico (DCQA), Figura 5, presentes en raíces de *I. batatas* tienen capacidad antimutagénica contra la mutación inducida por Trp-P-1 en *Salmonella typhimurium* TA98. Así mismo, se ha encontrado que los isómeros de DCQA inhiben irreversiblemente al virus VIH (Konczak *et al.*, 2004).

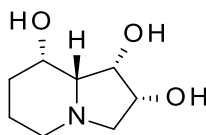


Figura 4. Estructura química de la swainsonina.

Los ácidos cafeoilquínicos en plantas comestibles promueven propiedades nutraceuticas. Sin embargo, la calidad de los mismos depende de la biodisponibilidad o la degradación efectuada durante el proceso digestivo (Konczak *et al.*, 2004).

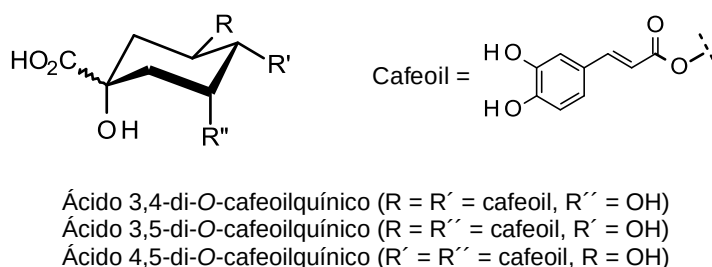


Figura 5. Ácidos di-O-cafeoilquínicos presentes en las raíces de *Ipomoea batatas*.

En México, las infusiones de *I. stans* se usan en la medicina tradicional para el tratamiento de ataques epilépticos, como sedativo, purgativo, hipotensivo, abortivo, así como en el tratamiento de desórdenes renales y dolores de cabeza, debido a su efecto sobre el sistema nervioso central (Herrera-Ruiz *et al.*, 2007). Las raíces de esta planta contienen resinas glicosídicas, las cuales poseen propiedades citotóxicas y antimicrobianas. Esto sugiere la potencialidad de los extractos de esa planta para modular la fisiología del sistema nervioso central (Herrera-Ruiz *et al.*, 2007). Pereda-Miranda & Bah (2003), mencionan que estas glicorresinas, tienen actividad contra varias especies vegetales competidoras, por lo que se han utilizado como herbicidas.

Se ha descrito que los extractos de hojas de *I. murucoides* contienen terpenos, ácidos grasos y alcaloides tipo pirrolizidínico. Esta información se obtuvo por el

análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (Lina-García, 2006).

Por otra parte, los extractos crudos obtenidos con hexano, cloroformo y metanol de corteza, hojas, flores y semillas de cinco especies arbóreas del género *Ipomoea* (*I. murucoides*, *I. intrapilosa*, *I. cuernavacensis*, *I. carnea* e *I. arborescens*) mostraron actividad insecticida contra plagas de importancia agrícola en México (Thomas *et al.*, 2004).

Todas las características antes mencionadas hacen del género *Ipomoea* una fuente potencial de compuestos fitoquímicos. Siendo las industrias alimentaria y farmacéutica las potenciales beneficiarias de estos componentes bioactivos debido a su gran demanda.

2.3 Componentes bioactivos

De acuerdo a lo que menciona Drago-Serrano *et al.* (2006), los fitoquímicos o componentes bioactivos tienen un valor terapéutico alto y se encuentran en diversas plantas. Estos vegetales presentan efectos farmacológicos en el tratamiento de infecciones fúngicas, bacterianas y enfermedades crónico-degenerativas.

La bioactividad en los alimentos puede ser perjudicial o benéfica dependiendo de la dosis y la frecuencia de consumo. Un fitoquímico no puede ser considerado un nutriente. El ingerir compuestos bioactivos resulta benéfico a largo plazo, sobre todo en el caso de las enfermedades degenerativas. En cambio, la deficiencia de los nutrientes, condiciona la presencia de enfermedades. Es importante seguir una dieta rica en antioxidantes para prevenir enfermedades (Schröder, 2003).

Los alimentos funcionales son proveedores de nutrientes y de compuestos fitoquímicos. Su ingestión hace que el organismo funcione de manera adecuada y al mismo tiempo ayudan a mejorar la salud y a prevenir enfermedades (Drago-

Serrano *et al.*, 2006). De acuerdo con el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, ILSI, un alimento funcional “es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse el carácter funcional o incluso saludable”.

En el caso de *I. murucoides*, se ha reportado en la literatura que los cocimientos de las flores, hojas, tallos y cortezas se emplean en el tratamiento de dolor e inflamación por golpes y reumas, o en picaduras de algunos insectos (Tecanhuey-Fernández, 2005). En el caso de inflamación de estómago se agregan a la infusión el cuajote (*Bursera fagaroides*) y el palo mulato (*Bursera simaruba*) y se toma en ayunas durante 3 días. Para problemas de parálisis, se hierven las hojas y se agregan al baño bien caliente. Otros padecimientos en los que se aplican sus propiedades medicinales son el dolor de muelas, para la tos y la hidropesía. Además en procesos inflamatorios de vientre, ovarios y pies y como diurético (Argueta & Gallardo, 1994).

2.4 Alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios que han impactado en la historia, la medicina, la política y la economía del mundo. Algunos constituyen agentes terapéuticos de gran importancia debido a sus efectos fisiológicos potenciales en mamíferos y otros organismos (Shamsa *et al.*, 2008). Se les suele encontrar en insectos, organismos marinos, microorganismos y plantas superiores e inferiores (Roberts & Wink, 1998). El intervalo de sus pesos moleculares oscila entre los 100 y 900 g/mol (Arango, 2008). Son bases orgánicas que contienen uno o más nitrógenos y que pueden estar como una amina o amida, los nitrógenos pueden conformar grupos funcionales distintos en la misma molécula y generalmente provienen de los aminoácidos. La mayoría son incoloros, sólidos cristalinos, ópticamente activos, levorrotarios con excepción de la cinconina y la laudanosina (Shamsa *et al.*, 2008). Los alcaloides se pueden encontrar en hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces (Arango, 2008). Los estudios realizados han

demostrado que los alcaloides son parte importante dentro de un sistema de defensa químico complejo para el organismo que los sintetiza. Ese comportamiento se ha observado en plantas, vertebrados, invertebrados y en microorganismos (Roberts & Wink, 1998). Otras funciones realizadas por estos metabolitos incluyen la protección contra los rayos ultravioleta, ser medio de transporte o almacenamiento de nitrógeno no metabolizado, como reguladores de crecimiento y protectores contra sus depredadores naturales. Así mismo, se ha comprobado que los alcaloides no son prioritarios en las plantas (Arango, 2008).

Dado que el género *Ipomoea* se caracteriza por su contenido de alcaloides, en el presente trabajo se cuantificaron estos metabolitos de extractos metanólicos y mediante una separación selectiva, se separaron de los compuestos fenólicos para evitar interferencias en su cuantificación.

2.5 Métodos utilizados para determinar alcaloides totales

Las técnicas cualitativas más empleadas se basan en la capacidad que los alcaloides tienen para formar sales; al combinarse con el yodo y los metales pesados se forman precipitados. Los reactivos más comunes para detectarlos son los siguientes: de Dragendorff, de Hager, de Bertrand, de Ehrlich y de Vitali-Morin, este último se usa para la detección de alcaloides básicos (Arango, 2008).

Entre los métodos oficiales para la determinación de alcaloides totales se pueden mencionar la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la fluorometría, la cromatografía iónica, la cromatografía de gases y la electrocromatografía. Muchos de estos métodos tienen la desventaja de emplear elevadas temperaturas para extraerlos, necesitar prolongados tiempos para completar la reacción, o que el producto colorido es inestable (Shamsa *et al.*, 2008).

Un método publicado recientemente por Shamsa *et al.* (2008), consiste en la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol a un pH 4.7, que absorbe a 470 nm, Figura 6. Este método es

sencillo, rápido, sensible, requiere de un espectrofotómetro de UV-Vis, el complejo obtenido es muy estable y es nula o escasa la interferencia por otros compuestos. Por las ventajas mencionadas, en el presente trabajo se utilizó este método para determinar alcaloides totales.

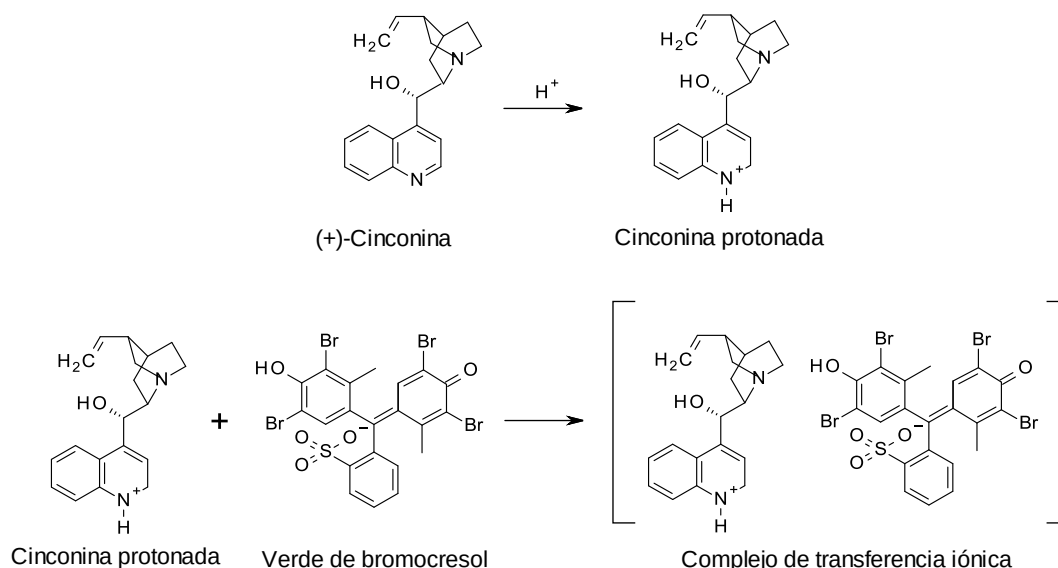


Figura 6. Estructura propuesta del complejo de verde de bromocresol–cinchonina (Rajendraprasad *et al.*, 2010).

2.6 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo amplio de sustancias químicas, con estructuras, propiedades químicas y actividad biológica diferente, englobando más de 8,000 compuestos distintos. También constituyen un grupo representativo de micronutrientes derivados del reino vegetal, y son parte importante dentro de la dieta tanto humana como animal (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Gran parte de los compuestos fenólicos que se encuentran en la naturaleza poseen cierta actividad biológica o farmacológica. La función de estos compuestos en las plantas es diverso, se encuentran como precursores de compuestos de mayor complejidad o interviniendo en procesos de regulación y control del

crecimiento de las plantas además de servir como medio defensivo de las mismas (Barrera *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que los componentes fenólicos son los principales antioxidantes derivados de plantas. La actividad química de estos compuestos se ha comprobado en estudios de modelos *in vitro* para inhibir la oxidación. Algunos métodos utilizados para evaluar la inhibición del estrés oxidativo incluyen la inhibición de la peroxidación del ácido linoléico, la captación de radicales libres, transferencia de electrones y quelación metálica (Rumbaoa *et al.*, 2009). El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo (Miller *et al.*, 1993).

Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides, los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les han atribuido efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, entre otros. Químicamente, estos compuestos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos (Narayana *et al.*, 2001). La naturaleza de los mismos incluye desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados. Generalmente están unidos a los azúcares, aunque también se les encuentra unidos a ácidos carboxílicos, aminas, lípidos así como a otros compuestos fenólicos (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Por todo lo anterior, la cuantificación de fenoles y flavonoides fue importante en este trabajo para determinar si *Ipomoea murucoides*, es una fuente potencial de compuestos bioactivos antioxidantes.

2.7 Métodos utilizados para determinar actividad antioxidante

El método usado comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos es el que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de

Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Los cuales son cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiitto, 1985).

Para cuantificar flavonoides totales se empleó el tricloruro de aluminio. El fundamento de esta metodología está basado en la reacción de los iones aluminio con los flavonoides en medio alcalino y en presencia de nitrito de sodio, formándose un complejo de color rojo (Cruz-Gallegos, 2012). Figura 7.

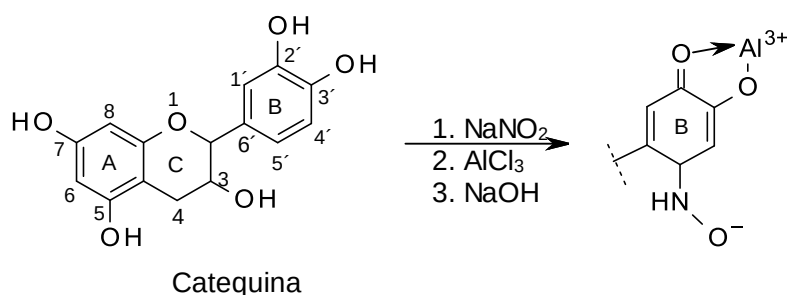


Figura 7. Estructura del complejo tricloruro de aluminio–flavonoide.

Un método que permite la cuantificación de la actividad antioxidante es el ensayo FRAP desarrollado por Benzie & Strain (1996). Este ensayo se basa en el poder de un compuesto o extracto para reducir la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ). Un antioxidante potencial puede reducir el ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}); este último forma un complejo azul ($Fe^{2+}/TPTZ$), cuya absorbencia se lee a 590 nm, Figura 8. La reacción debe llevarse a cabo en condiciones ácidas (pH 3.6) para conservar la solubilidad del hierro. El poder reductor está relacionado con el grado de hidroxilación y la conjugación en los fenoles (Ghasemzadeh *et al.*, 2012). El método es rápido, fácil y reproducible (Rojas-Barquera *et al.*, 2008).

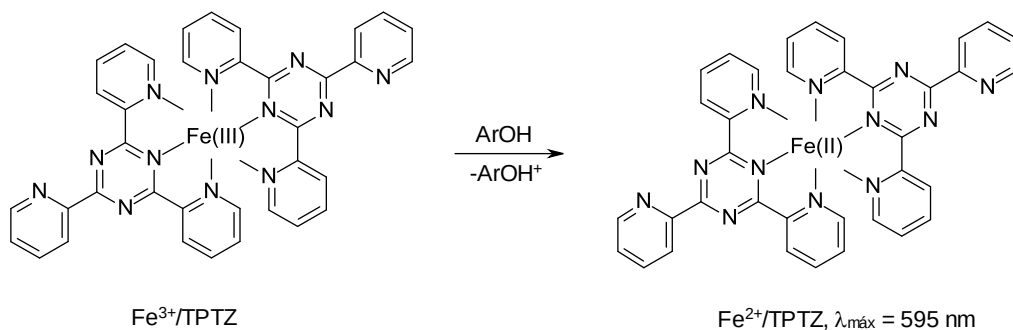


Figura 8. Mecanismo de reacción para el ensayo FRAP frente a un antioxidante (Prior *et al.*, 2005).

Un método muy usado para medir la capacidad antirradicalar de una especie o sustancia, se basa en la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), Figura 9. La estabilidad relativa de este radical se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en disolución etanólica a 520 nm. Cuando una disolución de DPPH• está en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical ($\text{R}^\bullet$) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la disminución o pérdida de la absorbencia. El parámetro EC_{50} , que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método (Gutiérrez-Avella *et al.*, 2008).

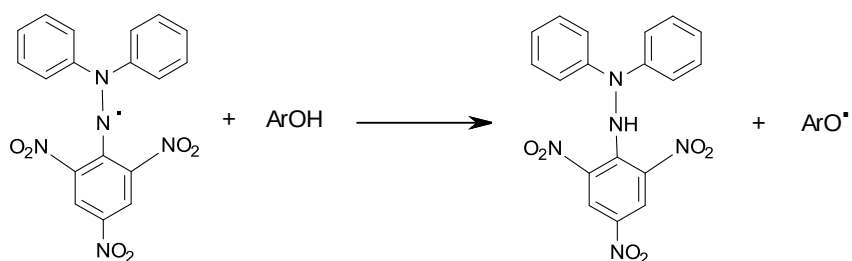


Figura 9. Reacción de reducción de DPPH• por antioxidantes.

El fundamento de esta metodología se centra en medir la captación de los radicales libres por compuestos antioxidantes con el radical DPPH•. Se ocupan

diferentes concentraciones y el tiempo de la reacción (30 minutos o hasta alcanzar el estado estacionario). Hasta el momento no hay reportes acerca de la existencia de un modelo cinético matemático que ayude a entender el comportamiento de los antioxidantes (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998). Los modelos experimentales hasta el momento emplean el porcentaje de DPPH• remanente para obtener las cantidades necesarias que se requieren para disminuir la concentración inicial al 50%. De manera adicional se realizan cinéticas para determinar a partir de las gráficas el valor de T_{EC50} (*Time needed to reach the steady state to EC₅₀*). Posteriormente a partir de EC_{50} y T_{EC50} se calcula AE (*Antiradical efficiency*), Ecuación 1. Valores bajos de EC_{50} (*Effective concentration 50*) y una reducción rápida del DPPH• indican una eficiencia alta de los antioxidantes (Gramza *et al.*, 2005). La eficiencia antirradicalar se estima con base en la escala contenida en la Tabla 2.

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Las ventajas de los métodos descritos anteriormente, permitieron escoger las técnicas de referencia confiables y más empleadas para la cuantificación de componentes antioxidantes en las hojas de *Ipomoea murucoides*.

Tabla 2. Escala de la eficiencia antirradicalar (AE).

Intervalo de AE (kg DPPH•/g*min)	Clasificación de la eficiencia antirradicalar
$AE \leq 1 \times 10^{-3}$	Baja
$1 \times 10^{-3} < AE \leq 5 \times 10^{-3}$	Mediana
$5 \times 10^{-3} < 10 \times 10^{-3}$	Alta
$AE > 10 \times 10^{-3}$	Muy alta

Datos tomados del *Polish Journal of Environmental Studies* (Gramza *et al.*, 2005).

3. METODOLOGÍA

3.1 Equipos, reactivos y disolventes

El trabajo experimental del presente proyecto se realizó en los laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Los equipos y reactivos utilizados se enlistan a continuación.

Balanza analítica Sartorius™ BL210S, termobalanza Sartorius™ MA45, molino ciclónico Foss™ Cyclotec 1093, congelador General Electric FUM 17DRBRWIT, refrigerador Across-Whirlpool ARMO7NP, sonicador-degasificador Branson 8510, centrífuga IEC HN-SII, lector de microplacaS BioTek® ELx808, espectrofotómetro de UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 35, espectrofotómetro Hach® DR 5000™, parrillas de calentamiento Barnstead Thermolyne CIMAREC®, vórtex Barnstead International type 16700 Mixer e IKA® vórtex 3, rotavapor Heidolph Laborota 4000 efficient, bomba de vacío Vacuubrand MZ2C, recirculador de agua SEV Eco 10, Mio™ Moov M400, placas de 96 pozos Costar de media área, celdas de cuarzo de 3 mL, micropipetas de volumen ajustable, micropipeta multicanal Labnet/BioPette, tamiz del #60, potenciómetro Conductronic pH10, cronómetro Cole-Parmer®, campana de extracción Manufacturera metálica Argos, balanzas granatarias, material de vidrio en general.

Ácido gálico monohidratado 98%, metanol 99.8%, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), ácido acético glacial 99.8%, rutina hidratada 94%, (±) ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico 97% (trolox), (marca Sigma-Aldrich®); etanol 99.9%, cloruro de aluminio en cristales 97.8%, cloroformo 99.9%, ácido clorhídrico 37.65%, sulfato de sodio anhidro granular 100%, cloruro de sodio en cristales 96.5%, sulfato ferroso heptahidratado granular 99.5%, cloruro férrico en

trozos 97%, ácido cítrico, (marca J. T. Baker®); (+)-catequina hidratada 96%, reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) granular 99%, (marca Fluka); hidróxido de sodio en lentejas 99%, marca Merck; carbonato de sodio anhidro en polvo 99%, nitrito de sodio granular 97%, acetato de sodio en cristales 99%, (marca Productos Químicos Monterrey); éter dietílico anhidro 99%, marca Reactivos Analíticos; cinconina, marca MC & B; verde de bromocresol en polvo, marca May & Baker LTD Dagenham; fosfato dibásico de sodio anhidro, marca Wako Pure Chemical Industries, LTD; tiras para medir pH 0-14, marca Fermont.

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron grado analítico. Los disolventes incluido el agua, fueron destilados y degasificados antes de ser usados.

3.2 Obtención de la muestra

La recolección se realizó a finales del mes de noviembre de 2010 en el campus de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Carretera a Acatlima km 2.5 (latitud norte 17.8319, longitud oeste -97.8035 y altitud 1789 msnm), Huajuapán de León, Oaxaca, México, donde existen varios ejemplares de *Ipomoea murucoides*.

El muestreo se enfocó en identificar especímenes completamente sanos o mínimamente enfermos. La recolección de muestras se dificultó debido a que la mayoría de los árboles presentaron ácaros en las hojas. Pocos fueron los ejemplares exentos de plagas, así que las hojas recolectadas fueron las exentas de plagas y las que tenían la menor cantidad de ácaros. Los árboles muestreados fueron señalados con una etiqueta y para el corte se empleó una tijera de podar. Con el material recolectado se preparó una muestra homogénea. En la Tabla 3 se muestran las coordenadas de los árboles muestreados.

Por las características propias del terreno, el acceso a todos los especímenes de *I. murucoides* fue restringido y las principales razones fueron:

- Árboles que perdieron la mayor parte de sus hojas
- Completamente infestados por ácaros
- Localizados en matorrales de difícil acceso
- Con hojas muy quemadas por el sol
- Con hojas roídas por insectos

Tabla 3. Coordenadas de árboles muestreados de *I. murucoides*.

Latitud	Longitud	Altitud
17.829	-97.805	1767
17.832	-97.805	1801
17.832	-97.803	1789
17.825	-97.803	1726
17.826	-97.802	1750
17.826	-97.801	1741
17.827	-97.801	1730
17.827	-97.802	1762
17.828	-97.806	1788

Las hojas frescas recolectadas pesaron 495.10 g, para secarlas fueron colocadas en papel periódico a temperatura ambiente. Se hicieron recambios de papel cada 3 días por 2 semanas. Se usaron 2 hojas de periódico entre cada capa de hojas.

El peso de las hojas secas fue de 171.90 g, se trocearon manualmente y se obtuvo 169.00 g con un rendimiento aproximado del 98.30%. Se utilizó un molino ciclónico para reducir el tamaño de partícula de las hojas y los polvos obtenidos se hicieron pasar a través de un tamiz de malla #60, estos fueron almacenados en frascos ámbar a -20°C hasta su análisis.

3.3 Determinación de humedad en hoja fresca y seca

Para determinar la humedad de las hojas en fresco y en seco se tomaron réplicas de 5 g, se cortaron finamente, se distribuyeron en la termobalanza a 60°C y se

registró el porcentaje de humedad, Tabla 4. Con estos datos se calcularon las concentraciones de los compuestos de interés en base seca.

Tabla 4. Contenido de humedad en hoja fresca y seca de *I. murucoides*.

Número de réplica	Masa inicial (g)	Humedad hoja fresca (%)	Humedad hoja seca (%)
1	4.99	77.65	6.12
2	4.99	68.45	4.80
3	5.00	71.67	5.59
Promedio	4.99 ± 0.01	72.59 ± 4.67	5.50 ± 0.66

3.4 Análisis químico

3.4.1 Obtención de los extractos metanólicos. Se pesó 1 g de polvo de hoja seca molida y tamizada y se le adicionó MeOH (3 x 20 mL), la mezcla se sonicó por 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm. Los sobrenadantes se combinaron, filtraron a través de papel filtro Whatman #1 y evaporaron a 40°C en un rotavapor al vacío.

3.4.2 Remoción de clorofilas. Al extracto metanólico evaporado (E₀), Apéndice 1a, se le adicionaron 10 mL de agua y HCl 1 M, hasta alcanzar un pH 2 y se realizó una extracción líquido-líquido en un embudo de separación utilizando Et₂O (3 x 10 mL) para eliminar las clorofilas.

Al extracto libre de clorofilas (E₁), Apéndice 1b, se le cuantificaron alcaloides, fenoles y flavonoides totales, así como FRAP y actividad antirradicalar.

3.4.3 Separación de alcaloides de compuestos fenólicos. La fase acuosa ácida libre de clorofilas, se basificó con NaOH 1 N hasta alcanzar un pH 12 para extraer los alcaloides, los cuales se extrajeron con CHCl₃ (3 x 15 mL) separándose de los compuestos fenólicos. Los extractos clorofórmicos se combinaron, secaron con

Na₂SO₄, filtraron y evaporaron en el rotavapor al vacío hasta sequedad, para obtener un residuo incoloro viscoso. Este extracto libre de clorofilas y compuestos fenólicos (E₃), Apéndice 1c, se utilizó para cuantificar alcaloides totales.

La fase acuosa básica libre de alcaloides, se aciduló con HCl 1 M hasta un pH 5, y se aforó a un volumen de 25 mL con MeOH. Este extracto libre de clorofilas y alcaloides (E₂), Apéndice 1c, se empleó para cuantificar fenoles totales, flavonoides totales, FRAP y actividad antirradicalar.

3.4.4 Cuantificación de alcaloides totales. *Preparación de disoluciones.* Ácido cítrico 0.2 M: se pesaron 840 mg de ácido cítrico, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 50 mL con agua. Buffer de fosfato (p/v): Se pesaron 7.16 g de Na₂HPO₄, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 100 mL. Se ajustó el pH a 4.7 con ácido cítrico y se llevó a la sobresaturación con NaCl. NaOH 1 N: Se pesaron 400 mg de NaOH, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 10 mL. Verde de bromocresol (p/v/v): se pesaron 34.9 mg de verde de bromocresol, se midieron 0.25 mL de agua y 0.15 mL de NaOH 1 N, se disolvieron en agua, se aforó a un volumen de 50 mL y se llevó a baño María hasta su completa disolución. Estándares de cinconina de 2, 4, 6, 8 y 10 ppm: Para la curva de calibración se preparó una disolución patrón de cinconina de 1000 ppm disolviendo 1 mg de cinconina en agua, se aforó a un volumen de 10 mL y se llevó a baño María hasta disolverse completamente. A partir de ella se prepararon los estándares antes mencionados.

Cuantificación. La cuantificación se realizó modificando el método colorimétrico de Shamsa *et al.* (2008). Al residuo del extracto clorofórmico o al estándar, se le adicionaron 5 mL de buffer de fosfato, 5 mL de disolución de verde de bromocresol y 2 mL de CHCl₃ y se mezclaron. Esta mezcla se trasvasó a un embudo de separación para realizar extracciones líquido-líquido. La fase clorofórmica se separó y se colocó en un matraz Erlenmeyer para ser combinada con las extracciones subsecuentes. A la fase acuosa tamponada se le adicionaron 2 mL

de CHCl_3 , se agitó y se realizó la segunda extracción. Se agregó CHCl_3 (2 x 3 mL) para las siguientes extracciones hasta ocupar 10 mL de CHCl_3 la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , filtró y aforó a un volumen de 10 mL con CHCl_3 . La absorbencia del extracto y del estándar se leyó a 420 nm en un espectrofotómetro Hach. Para la curva de calibración se utilizó cinconina como estándar y a partir de ella se obtuvo la cuantificación de alcaloides totales expresada como mg equivalentes de cinconina ECCN/100 g de muestra seca (ms). Se utilizó CHCl_3 como blanco de la muestra. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, Apéndice 2.

3.4.5 Cuantificación de fenoles totales. *Preparación de disoluciones.* EtOH acuoso al 90% (v/v): se mezclaron 90 mL de EtOH con 10 mL de agua. Na_2CO_3 al 0.5% (p/v): se pesaron 50 mg de Na_2CO_3 , se disolvieron en agua y se aforó a 10 mL. Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M: se midieron 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M, se disolvieron en agua en ausencia de luz y se aforó a 10 mL. Ácido gálico 100 ppm: se pesó 1 mg de ácido gálico, se disolvió en EtOH al 90% hasta un volumen de 10 mL. Los estándares de ácido gálico de 5, 10, 15, 20 y 25 ppm se prepararon a partir de la disolución de ácido gálico de 100 ppm.

Cuantificación. La cuantificación se realizó modificando ligeramente el método colorimétrico que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (Julián-Loaeza *et al.*, 2011). A 40 μL de extracto o del estándar se le adicionaron 40 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M en una microplaca. La mezcla se dejó en reposo por 3 minutos a temperatura ambiente en el lector de microplacas y se agitó por 15 segundos a baja velocidad. Pasado este tiempo, a la mezcla anterior se le adicionaron 40 μL de Na_2CO_3 al 0.5% que se incorporaron mediante succión (tres veces) con la micropipeta multicanal. La mezcla se dejó reposar 30 minutos a 40°C y se agitó por 1 minuto a velocidad media en el lector de microplacas. La absorbencia de la muestra y de los estándares se leyó con un filtro a 630 nm. Al blanco de la muestra o del estándar se le adicionó agua en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu. El estándar de 25 ppm se utilizó para el blanco del estándar. Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico como estándar y a partir de ella se

obtuvo el contenido de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico GAE/100 g ms. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Apéndice 3.

3.4.6 Cuantificación de flavonoides totales. *Preparación de las disoluciones.*

NaNO₂ al 1.5% (p/v): se pesaron 375 mg de NaNO₂, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 25 mL. AlCl₃ al 3% (p/v): se pesaron 300 mg de AlCl₃•6H₂O, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 10 mL. NaOH 1 N: se pesaron 400 mg de NaOH, se disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 10 mL. Catequina 1000 ppm: se pesaron 10 mg de (+)-catequina, se disolvieron en MeOH y se aforó a un volumen de 10 mL en ausencia de luz. Los estándares de catequina utilizados fueron de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm y se prepararon a partir de la disolución de 1000 ppm.

Cuantificación. La cuantificación se realizó según lo descrito por Julián-Loaeza *et al.* (2011). A 1 mL del extracto o del estándar contenido en un tubo ámbar se le agregó 1 mL de NaNO₂ al 1.5%. La mezcla se agitó por 5 minutos en un vórtex a temperatura ambiente. De esta mezcla se midieron 50 µL que se colocaron en una microplaca. A esta mezcla se le agregaron 50 µL de AlCl₃ al 3% y se agitó por 1 minuto a temperatura ambiente y velocidad media en el lector de microplacas. Pasado este tiempo a la mezcla anterior se adicionaron 50 µL de NaOH 1 N que se incorporaron mediante succión (tres veces) con la micropipeta multicanal. Se agitó por un minuto a temperatura ambiente y velocidad media en el lector de microplacas. La absorbencia de la muestra y de los estándares se leyó con un filtro a 490 nm. Al blanco de la muestra o del estándar se le adicionó agua en lugar del reactivo de AlCl₃. El estándar de 50 ppm se utilizó para el blanco del estándar. Para la curva de calibración se utilizó catequina como estándar a partir de ella se obtuvo el contenido de flavonoides totales expresados como mg equivalentes de catequina CE/100 g ms. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Apéndice 4.

3.4.7 Cuantificación del poder antioxidante expresado como reducción férrica (FRAP). *Preparación de disoluciones.* Buffer de acetato 400 mM: Se pesaron 103 mg de $\text{AcONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, se midieron 0.532 mL de AcOH glacial y disolvieron en agua y se aforó a un volumen de 25 mL. TPTZ 30 mM: se pesaron 93.6 mg de TPTZ, se midieron 6 mL de agua y 0.1 mL de HCl concentrado, se disolvieron y se aforó a un volumen de 10 mL con agua. La disolución de TPTZ se filtró a través de un embudo con algodón. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 60 mM: se pesaron 162 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y disolvieron en agua a un volumen de 10 mL. Reactivo FRAP (v/v/v): se midieron 10 mL de buffer de acetato, 1 mL de TPTZ 30 mM y 1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 60 mM se agitaron en el vórtex. Este reactivo se preparó antes de iniciar cada ensayo. Trolox 5 mM: se pesaron 12.5 mg de trolox, se disolvieron en EtOH y se aforó hasta un volumen de 10 mL. Los estándares de trolox 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 mM se prepararon a partir de esta disolución. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1000 mM: se pesaron 2.75 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se disolvieron en agua y se aforó hasta un volumen de 10 mL. Los estándares de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 150, 200, 300, 400 y 500 mM se prepararon a partir de esta disolución. Disoluciones metanólicas: E_1 (extractos metanólicos libres de clorofilas): 40 000, 20 000, 10 000, 5 000 $\mu\text{g/mL}$ y E_2 (extractos metanólicos libres de alcaloides): 40 000, 8 000, 5 714, 3 636, 3 077 y 2 667 $\mu\text{g/mL}$ para obtener linealidad.

Cuantificación: La cuantificación se realizó según lo descrito por Ghasemzadeh *et al.*, (2012) con ligeras modificaciones. A 30 μL del extracto o del estándar se adicionaron 110 μL del reactivo FRAP en una microplaca. Se mezclaron mediante succión (3 veces) con la micropipeta multicanal, se incubaron por 4 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz y se mezclaron con velocidad media por 1 minuto en el lector de microplacas. La absorbencia de la muestra y de los estándares se leyó con un filtro a 630 nm. Al blanco de las muestras se le adicionó MeOH en lugar del reactivo FRAP y al blanco del estándar se le adicionó agua. Como blanco del estándar se utilizó el estándar de menor concentración. A partir de la curva de calibración del estándar y la curva generada por la muestra, se obtuvo la capacidad antioxidante basada en la reducción de iones férricos de la

muestra expresada como mmoles equivalentes de trolox/g ms. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Apéndices 5 y 6.

3.4.8 Cuantificación de la actividad antirradicalar. Preparación de disoluciones.

Se preparó un patrón de DPPH• al 0.1% (p/v), se pesaron 10 mg de DPPH•, se disolvieron en MeOH y se aforó a un volumen 10 mL en ausencia de luz. De esta disolución se preparó DPPH• al 0.004%, que se resguardó de la luz y dejó en refrigeración entre mediciones. Estándares de ácido gálico: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 ppm. Se preparó un patrón de 100 ppm de ácido gálico: Se pesó 1 mg de ácido gálico, se disolvió en EtOH al 90% y se aforó a un volumen de 10 mL. De esta disolución se prepararon los estándares en las concentraciones ya mencionadas. Estándares de rutina: 5, 10, 15, 20 y 25 ppm. Se preparó un patrón de 2000 ppm de rutina: se pesaron 12.2 mg de rutina hidratada y se disolvieron en MeOH y se aforó a un volumen de 10 mL. De esta disolución se prepararon los estándares en las concentraciones antes mencionadas. Disoluciones metanólicas: E₁ (extractos metanólicos libres de clorofilas): 40 000, 6 667, 3 636, 1 905 y 1 290 µg/mL y E₂ (extractos metanólicos libres de alcaloides): 40 000, 10 000, 5 715, 4 000 y 2 667 µg/mL.

Cuantificación. La cuantificación se realizó según lo descrito por Julián-Loaeza *et al.* (2011). A 70 µL del extracto o del estándar se le agregaron 70 µL de DPPH• al 0.004% en una microplaca, quedaron en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz y se mezclaron con velocidad media por un minuto en el lector de microplacas. El porcentaje de disminución de la absorbencia se graficó para cada concentración y el porcentaje del DPPH• consumido se calculó con base en el decremento observado en la absorbencia del radical DPPH•. Los cambios en la absorbencia de las muestras se leyeron con un filtro a 515 nm en el lector de microplacas. La disolución de DPPH• al 0.004% más MeOH se usó como blanco de DPPH•. El blanco de las muestras o del estándar contenía MeOH en lugar de DPPH•. Para el blanco del estándar se utilizó el estándar menos

concentrado. La actividad antirradicalar se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó usando la fórmula siguiente, Ecuación 2:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}\bullet} - A_{\text{EXT}}}{A_{\text{DPPH}\bullet}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde:

$A_{\text{DPPH}\bullet}$ = valor de la absorbencia del blanco con DPPH•

A_{EXT} = valor de la absorbencia del extracto a evaluar

El valor EC_{50} se reporta como g de muestra/kg de DPPH•. Las determinaciones se realizaron por triplicado (Gramza *et al.*, 2005). Apéndices 7 y 8.

3.4.9 Cinética de eficiencia antirradicalar. *Preparación de disoluciones.* Las disoluciones empleadas en este ensayo fueron las mismas que las utilizadas para la cuantificación de la actividad antirradicalar.

Cuantificación. La cuantificación se realizó según lo descrito por Julián-Loaeza *et al.* (2011). A 70 μL del extracto o del estándar se le adicionaron 70 μL de DPPH• 0.004% en una microplaca, quedaron en reposo por 60 minutos a temperatura ambiente, en ausencia de luz y se mezclaron con velocidad media por un minuto en el lector de microplacas. Este método se adaptó a un lector de microplacas. El porcentaje de disminución de la absorbencia se graficó para cada concentración y el porcentaje del DPPH• consumido se calculó con base en el decremento observado en la absorbencia del radical DPPH•. El porcentaje de DPPH• remanente se leyó al minuto 30 para cada curva de DPPH•, el cual fue graficado contra el tiempo para obtener la concentración al 50% de inhibición del DPPH• (EC_{50}). Por otra parte, utilizando la curva más cercana al 50% de inhibición, se identificó el tiempo en el cual inició el estado estable. Ese punto se denominó $T_{\text{EC}_{50}}$. Con los valores de EC_{50} y $T_{\text{EC}_{50}}$ se calculó el valor de la eficiencia antirradicalar (AE o *efficient antiradical*) expresada como kg de DPPH•/g de antioxidante•min (Gramza *et al.*, 2005), de acuerdo a la fórmula, Ecuación 1:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}}$$

Ecuación 1

Las absorbencias se leyeron a 515 nm cada 0.5 minutos a partir del minuto cero hasta el minuto 60. La absorbencia de la muestra y de los estándares se leyó a 515 nm. La disolución de DPPH• al 0.004% más MeOH se usó como blanco de DPPH•. El blanco de las muestras o del estándar llevó MeOH en lugar de DPPH•. Para el blanco del estándar se utilizó el estándar menos concentrado. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5 Análisis estadístico

Los valores presentados son un promedio $\pm$ la desviación estándar ($\bar{\sigma}$) de tres réplicas obtenidas con el programa Microsoft Excel. Se realizó un análisis de comparación de medias aplicando la prueba *t* de Student de dos muestras para un $\alpha < 0.05$ (Harris, 2007).

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Obtención de los extractos

Los extractos metanólicos de las hojas de *I. murucoides* se obtuvieron con la asistencia de ultrasonido. Algunas ventajas de emplear ultrasonido son el uso de temperaturas bajas (20-30°C) y tiempos cortos de extracción (20 min). Esto evita la degradación de los compuestos fenólicos, en especial de los flavonoides que son compuestos termolábiles.

Para la extracción de los compuestos fenólicos se seleccionó como disolvente al MeOH debido a su naturaleza polar y consecuente afinidad con los compuestos de interés. A este extracto se le denominó E₀; y de este, se obtuvieron extractos libres de clorofilas (E₁), extractos libres de clorofilas y alcaloides (E₂) y extractos libres de clorofilas y fenoles (E₃), Apéndice 1, Tabla 5, Figura 10.

Tabla 5. Tipos de extractos conteniendo clorofilas y metabolitos secundarios.

Nombre del extracto	Clasificación	Características
Extracto metanólico crudo	E ₀	Clorofilas, alcaloides y compuestos fenólicos
Extracto libre de clorofilas	E ₁	Alcaloides y compuestos fenólicos
Extracto libre de clorofilas y alcaloides	E ₂	Compuestos fenólicos
Extracto libre de clorofilas y compuestos fenólicos	E ₃	Alcaloides

A los extractos E₀, E₁ y E₂ se les cuantificó fenoles y flavonoides totales, así como FRAP, actividad antirradicalar expresada como EC₅₀ y eficiencia antirradicalar.

Mientras que al extracto E₃ se le determinó alcaloides totales. Para hacer eficiente la extracción, se realizaron tres extracciones secuenciales y al final los extractos se combinaron.

En el extracto E₀, las bandas espectrales de absorción de las clorofilas en las regiones del rojo y azul (Gitelson *et al.*, 1999) generan interferencias durante la cuantificación de fenoles y flavonoides totales. Para eliminarlas, se llevó a cabo una remoción de clorofilas utilizando éter dietílico. Este tratamiento permitió la cuantificación de fenoles y flavonoides totales en E₁ y E₂.

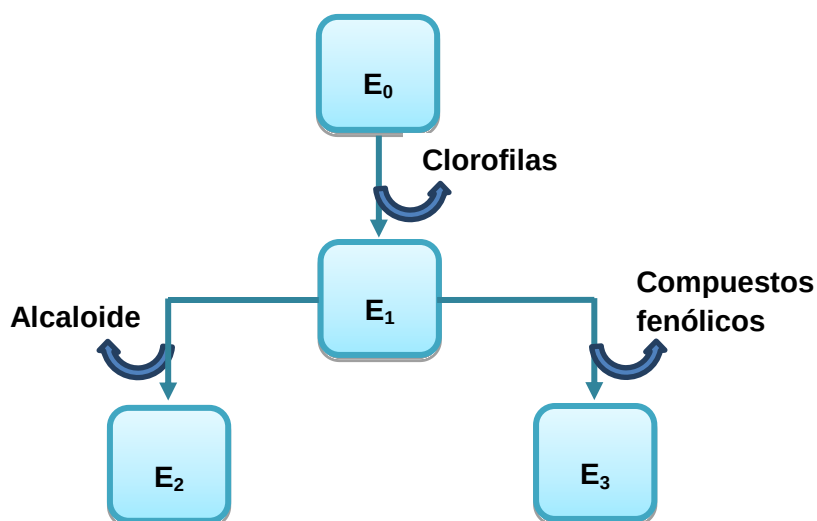


Figura 10. Obtención de extractos E₁, E₂ y E₃.

4.2 Cuantificación de alcaloides, fenoles y flavonoides totales

Las cantidades de alcaloides, fenoles y flavonoides totales contenidas en los diferentes extractos se enlistan en la Tabla 6.

4.2.1 Alcaloides totales. Actualmente no se cuenta con reportes sobre la cuantificación de alcaloides totales en el género *Ipomoea*. En ciertas especies solo se ha reportado la cuantificación de alcaloides específicos como en el caso de *I. muricata* donde se aislaron y cuantificaron al lisergol, 52.6 μ moles/100 g de

semillas, y la chanoclavina, 49.4 μ moles/100 g de semillas (Maurya & Srivastava, 2009), con un total de 102 μ moles/100 g de semillas. Esta cantidad corresponde a 4 veces la cantidad encontrada en las hojas de *I. muruoides*, 25 μ moles equivalentes de cinconina (ECCN)/100 g de hoja, Tabla 6. Según Zamora-Natera *et al.* (2009), en las semillas hay mayor concentración de alcaloides por ser éstos una fuente de reserva de nitrógeno que es utilizada durante la germinación, además protegen a las semillas contra depredadores preservando la regeneración natural de la especie.

Tabla 6. Contenido de alcaloides y compuestos fenólicos en extractos de hojas secas de *I. muruoides*.

Extracto	Alcaloides totales (μ moles ECCN/100 g ms)	Fenoles totales (FT) (mg GAE/100 g ms)	Flavonoides totales (FVT) (mg CE/100 g ms)
E ₁	---	114.89 $\pm$ 5.15	62.29 $\pm$ 2.22
E ₂	---	100.20 $\pm$ 2.64	45.15 $\pm$ 2.25
E ₃	28.90 $\pm$ 1.10	---	---

Las concentraciones son el promedio de tres mediciones $\pm$ desviación estándar. E₁ y E₂ son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se usó la prueba *t* de Student para el análisis estadístico. ECCN, equivalentes de cinconina. GAE, equivalentes de ácido gálico. CE, equivalente de catequina., ms, muestra seca.

4.2.2 Fenoles totales (FT). Una vez cuantificados los fenoles totales en los extractos E₁ y E₂, se utilizó la prueba *t* de dos muestras a un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$, Apéndice 9, y se encontró que dichos extractos son estadísticamente diferentes. Esta diferencia puede atribuirse a que el extracto E₁ utilizado para obtener el E₂ requiere de una etapa de extracción para remover los alcaloides. Esto puede inducir una degradación de fenoles en E₂. También, los alcaloides presentes en E₁, reaccionan con el tungsteno para formar precipitados (Arango, 2008), y estos últimos dispersan la luz induciendo una lectura de absorbencia mayor que la esperada. Cabe mencionar que el tungsteno es un constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu, usado para la cuantificación de FT.

El contenido de FT expresados como mg GAE/100 g ms (masa seca) encontrados en *I. murucoides* se compararon con los reportados en hojas de plantas del género *Ipomoea*. El extracto E₂ presenta 100.20 ± 2.64 mg GAE/100 g ms y está dentro del intervalo reportado para especies de este género, tales como *I. aquatica*, *I. batatas Composite* y *Tis 3030* (Lako, et al., 2007), e *I. batatas Centennial* (Ghasemzadeh et al., 2012). La cantidad de FT encontrada en *I. aquatica*, indica que tiene aproximadamente menos de la mitad que *I. murucoides* y ésta a su vez, tiene aproximadamente cuatro veces menos que *I. batatas Centennial*, Figura 11.

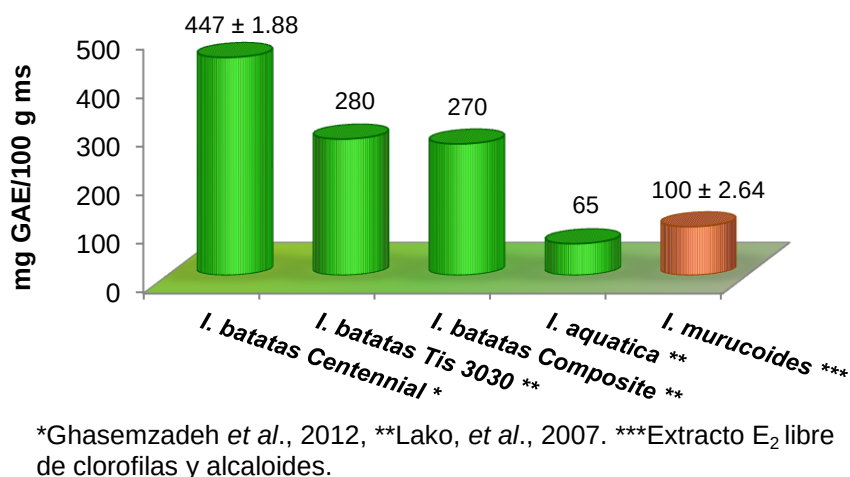
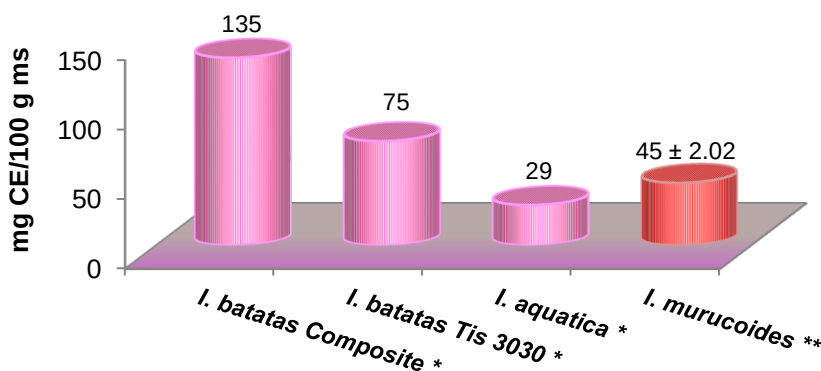


Figura 11. Contenido de fenoles totales en especies del género *Ipomoea*.

Estas diferencias pueden atribuirse a que en *I. batatas*, planta de cultivo, no se han detectado alcaloides en sus hojas. Anaya-Lang et al. (2001), afirman que las plantas cultivadas pasaron por un proceso de domesticación. Este proceso de selección artificial provocó cambios genéticos en las plantas conduciendo a una reducción de sus defensas naturales, como los alcaloides. Para compensar esta pérdida, es posible que las plantas cultivadas incrementaran la cantidad de compuestos fenólicos, tal como en variedades de *I. batatas*. Contrariamente, en especies silvestres como *I. aquatica* e *I. murucoides*, conservan todos sus mecanismos de defensa (Meira et al. 2012), incluyendo a los alcaloides y compuestos fenólicos.

Por otra parte, la preparación de la muestra pudo contribuir a la variabilidad en el contenido de FT entre especies. En el caso de *I. batatas Centennial*, que presentó el mayor contenido de FT, las hojas se deshidrataron por liofilización minimizando la degradación de los FT. Cabe recordar que la liofilización es un método de deshidratación que minimiza las pérdidas de compuestos fenólicos (Ghasemzadeh *et al.*, 2012). Para *I. batatas Tis 3030* y *Composite* e *I. aquatica* (Lako, *et al.*, 2007), el método de preparación incluyó calentamiento por vapor lo que pudo degradar a los compuestos fenólicos. Por último, en *I. muruoides* se realizaron extracciones por ultrasonido, minimizando las pérdidas de metabolitos, pero sin la interferencia de otros compuestos.

4.2.3 Flavonoides totales (FVT). En la Tabla 6 aparecen las cantidades correspondientes a FVT para los extractos E₁ y E₂. El análisis comparativo de medias determinó que estos extractos son significativamente diferentes, Apéndice 9. La explicación es igual que en el caso de fenoles, debido a que los flavonoides son parte de los compuestos fenólicos. Así mismo, se realizó un comparativo del contenido de FVT expresados como equivalentes de catequina (CE)/100 g ms de *I. aquatica*, *I. batatas Composite* y *Tis 3030* (Lako, *et al.*, 2007) con *I. muruoides*, Figura 12. De igual manera que en el caso de FT, el contenido de los FVT están en el intervalo reportado para especies del género *Ipomoea*.



*Lako, *et al.*, 2007. **Extracto E₂ libre de clorofilas y alcaloides.

Figura 12. Contenido de flavonoides totales en especies del género *Ipomoea*.

A partir del cálculo del cociente FVT/FT se observó una relación entre *I. aquatica* e *I. murucoides*, presentando un cociente de 0.45, Tabla 7. Cabe recordar que los flavonoides son un subgrupo de compuestos fenólicos. Por lo que al tener dos especies del mismo género con cocientes FVT/FT iguales o muy parecidos, esto nos puede dar indicios que los flavonoides presentes en esas dos especies son estructuralmente muy parecidos y en cantidades similares.

Tabla 7. Relación flavonoides-fenoles totales en especies de *Ipomoea*.

<i>Ipomoea</i>	Relación FVT / FT	Cociente
<i>aquatica</i> *	29 / 65	0.45
<i>batatas Composite</i> *	136 / 270	0.50
<i>batatas Tis 3030</i> *	75 / 280	0.27
<i>murucoides</i>	45 / 100	0.45

*Lako, et al., 2007

4.3 Evaluación de la actividad antioxidante

En esta investigación se emplearon métodos de tipo indirecto para obtener la actividad antioxidante. El ensayo FRAP y el radical DPPH• se utilizaron para determinar la transferencia de electrones o de radicales hidrógeno a los radicales libres respectivamente. Los valores están contenidos en las Tablas 8 y 9.

4.3.1 FRAP. Se realizó un análisis comparativo de medias de los extractos E₁ y E₂ y se encontró una diferencia significativa, a un nivel de significancia $\alpha < 0.05$, Apéndice 9. El extracto E₁ reporta menor poder antioxidante que el extracto E₂, esto se podría explicar debido a la existencia de un efecto antagónico entre los alcaloides y los compuestos fenólicos. Lo que significa que las aminas en el medio de reacción y en presencia de TPTZ, oxidan al Fe²⁺ a Fe³⁺. También pueden competir con la TPTZ por el Fe²⁺, disminuyendo el valor de absorbencia. Cabe señalar que en la literatura no se menciona la remoción de alcaloides al realizar el ensayo FRAP en otras especies de *Ipomoea*.

Tabla 8. Valores FRAP en extractos de hojas secas de *I. muruoides*.

Extracto	ppm		mM	
	(TE/g ms)	(Fe ²⁺ /g ms)	(TE/g ms)	(Fe ²⁺ /g ms)
E ₁	67.05 ± 2.32	2.51 ± 0.07 × 10 ⁴	0.27 ± 0.04	450.47 ± 20.05
E ₂	92.00 ± 4.31	3.88 ± 0.09 × 10 ⁴	0.37 ± 0.01	695.48 ± 31.15

Las concentraciones son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. E₁ y E₂ son significativamente diferentes (p<0.05). Se usó la prueba *t* de Student para el análisis estadístico. TE, equivalentes de trolox. ppm, partes por millón. ms, masa seca.

4.3.2 Actividad antirradicalar frente al DPPH• En la Tabla 9 se muestran los valores correspondientes a la actividad antirradicalar para los extractos E₁ y E₂ y se comprobó mediante la prueba *t* de dos muestras a un nivel de significancia $\alpha < 0.05$, que ambos extractos son diferentes. Esto se puede evidenciar con el comportamiento de las curvas de DPPH• inhibido vs concentración de extracto E₁ y E₂, las cuales presentaron tendencias logarítmica y lineal, respectivamente, Figura 13. En la curva del extracto E₁, se observa que a concentraciones mayores a 3 636 ppm de extracto se presenta un cambio drástico en la reacción entre el extracto y el DPPH•. En base a los resultados obtenidos, este comportamiento se atribuye a los alcaloides, quienes participan en la etapa de propagación de radicales. Por tanto, los compuestos fenólicos contenidos en el extracto son insuficientes para inhibir a los radicales libres presentes en el medio de reacción. Esto es evidente al observar en la curva que el % máximo de DPPH• inhibido fue del 89%.

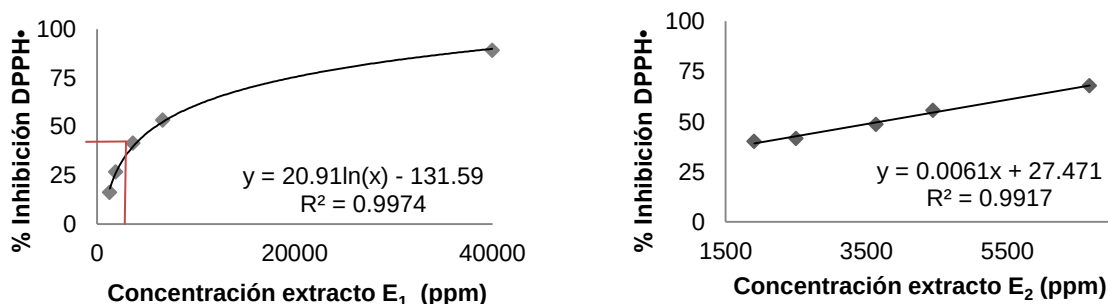


Figura 13. Curvas del radical DPPH• inhibido en los extractos E₁ y E₂.

Esto puede evidenciarse calculando la estequiometría antioxidante, n , que se refiere al número de moles de DPPH• que se reducen por cada mol de antioxidante (Villaño *et al.*, 2006). Este valor se calcula con la Ecuación 3. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Cabe mencionar que los cálculos de n para los E₁ y E₂, se realizaron con los valores de fenoles totales expresados como moles equivalentes de ácido gálico.

$$n = \frac{1}{EC_{50} \times 2} \quad \text{Ecuación 3}$$

Tabla 9. Estequiometría antioxidante, n , de extractos de hojas secas de *I. murucoides* y de algunos compuestos fenólicos representativos.

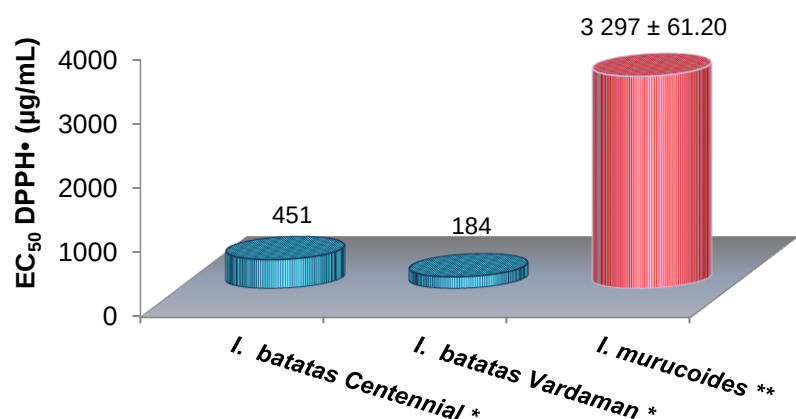
Compuesto	n (moles DPPH•/moles de antioxidante)
E ₁ ^a	0.56
E ₂ ^a	1.45
Ácido ferúlico ^b	1.30
Kampferol ^b	1.60
Ácido gálico ^c	5.00
Rutina ^c	4.80

^aMoles equivalentes de ácido gálico (GAE). ^bValores de referencia (Villaño *et al.*, 2006). ^cControles de la muestra.

Los resultados indican que el extracto E₂ transfiere aproximadamente el triple de átomos de H al radical DPPH• que el extracto E₁. Cabe la posibilidad que en el extracto E₁ existan alcaloides como la chanoclavina, o lisergol. Los cuales se han aislado en plantas del género *Ipomoea*. Estos alcaloides por la posición de sus grupos amino, pueden convertirse en radicales en la etapa de propagación. Como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos existentes en el extracto serían insuficientes para inhibir a los radicales.

De acuerdo con la Tabla 9, el extracto E₂ tiene valores n aproximados al ácido ferúlico y kampferol.

Las actividades antirradicales de los extractos E₁ y E₂ presentaron valores de EC₅₀ de $136.63 \pm 0.04 \times 10^5$ y $142.86 \pm 0.02 \times 10^5$ µg de hoja seca/mL de disolución, respectivamente. Estas actividades antirradicales son del orden de diez veces menores para E₁ y veinte veces para E₂ que las reportadas para *Ipomoea batatas Centennial*, Figura 14.



*Ghasemzadeh et al., 2012. **Corresponde al extracto E₂ libre de clorofilas y alcaloides.

Figura 14. Actividad antirradicalar en especies del género *Ipomoea*.

Al asociar la actividad antirradicalar con el contenido de fenoles totales en los extractos de *I. murucoides* de alguna manera justifican la actividad antirradicalar obtenida en los extractos E₁ y E₂. Siendo posible que las hojas contengan poca cantidad de compuestos fenólicos por recolectarse en el período de defoliación, que los compuestos fenólicos existentes aun cuando son potentes estén en baja concentración o que la capacidad antioxidante es baja, Tabla 10.

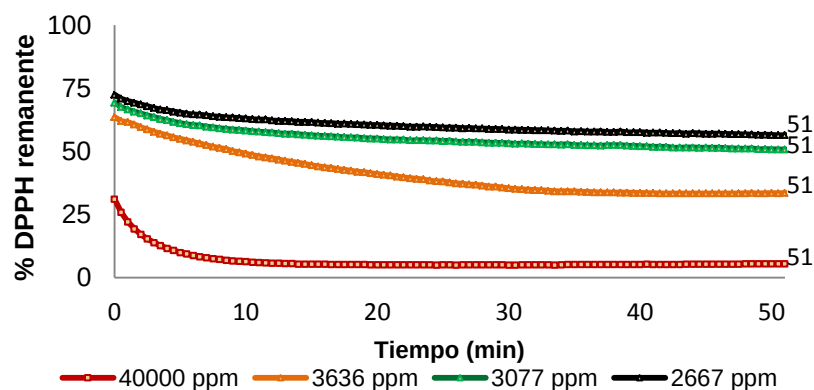
4.3.3 Eficiencia antirradicalar (AE). Se calcularon las eficiencias antirradicales a partir de los valores de EC₅₀ y T_{EC50} para los extractos E₁ y E₂, Tabla 10. Los valores de T_{EC50} se obtuvieron a partir de las curvas de tiempo vs DPPH• remanente, Figura 15.

Tabla 10. Valores de actividad antirradicalar en extractos de hojas secas de *I. murucoides*.

Extracto	EC ₅₀	
	($\mu\text{g/mL}$)	(g de extracto metanólico $\cdot\text{kg}^{-1}$ de DPPH $\cdot$)
E ₁	$136.63 \pm 0.04 \times 10^5$	$2\,712.20 \pm 37.08$
E ₂	$142.86 \pm 0.02 \times 10^5$	$1\,236.22 \pm 22.95$
Ácido ferúlico ^a	4.79 ± 0.07	163.00 ± 10.00
Kampferol ^a	5.38 ± 0.00	269.00 ± 0.00
Ácido gálico ^b	1.75 ± 0.01	87.59 ± 0.50
Rutina ^b	10.16 ± 0.07	508 ± 3.50

Las concentraciones son el promedio de tres mediciones $\pm$ desviación estándar. E₁ y E₂ son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se usó la prueba *t* de Student para el análisis estadístico. ^aValores de referencia (Villaño *et al.*, 2006). ^bControles de la muestra.

Los valores *n* del extracto E₂ están muy próximos a valores reportados para el ácido ferúlico y el kampferol, Tabla 9. Sin embargo, los valores de EC₅₀, T_{EC50} y AE son distintos entre ellos. Esto depende de mecanismos complejos involucrados en cada reacción, como la concentración y estructura de los analitos involucrados, así también la energía de activación. Así mismo, el T_{EC50}, asegura que la reacción no continúe más allá del punto de equilibrio. (Villaño *et al.*, 2006), Figura 15.



Las cantidades en ppm corresponden a las concentraciones del extracto E₂.

Figura 15. Determinación gráfica de los tiempos T_{EC50} para el extracto E₂.

Por otro lado, también es posible que en la matriz del extracto E₂, existan compuestos que estén causando interferencia en la determinación de la actividad antirradicalar.

Por último, de acuerdo a la clasificación de la eficiencia antirradicalar reportada por Gramza *et al.* (2005), los extractos E₁ y E₂ se consideran de baja eficiencia.

Tabla 11. Valores de la eficiencia antirradicalar usando radical DPPH• en extractos metanólicos de hojas secas de *I. murucoides* y controles.

Extracto	T _{EC50}	AE x10 ⁻³
	(minutos)	(kg DPPH•/g*min)
E ₁ ^a	48	0.0077 ± 0.52
E ₂ ^a	51	0.0016 ± 0.85
Ácido ferúlico ^b	53	0.80 ± 0.00
Kampferol ^b	6	8.90 ± 0.01
Ácido gálico ^c	9	1.27 ± 0.22 ³
Rutina ^c	29	0.07 ± 0.01

^aLas concentraciones son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. E₁ y E₂ son significativamente diferentes (p<0.05). Se usó la prueba *t* de Student para el análisis estadístico. ^bValores de referencia (Villaño *et al.*, 2006). ^cControles de muestra.

5. CONCLUSIONES

Ipomoea es un género conocido por su contenido de alcaloides y compuestos fenólicos entre otros, en *I. murucoides* se esperaba encontrar este tipo de metabolitos. Al término de este trabajo, puede concluirse que en las hojas de *Ipomoea murucoides* se presentan cantidades de fitoquímicos, específicamente alcaloides, fenoles y flavonoides, equiparables a las reportadas para otras especies del género *Ipomoea*. Los resultados indican que la presencia de los alcaloides disminuye la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, siendo necesario removerlos.

El contenido de alcaloides totales encontrados, no se pudieron comparar con otras especies del género *Ipomoea*, ya que hasta el momento no hay reportes en la literatura de esta cuantificación. En el caso de los fenoles totales y flavonoides totales, la comparación con otras especies de este género, nos indica que están dentro del intervalo de lo esperado. La actividad y eficiencia antirradicalar, *I. murucoides*, fueron bajas. Así que la hipótesis planteada en esta investigación se retiene.

6. PERSPECTIVAS

Dentro de las recomendaciones para el seguimiento de esta investigación están:

Separar y determinar la estructura de los alcaloides y compuestos fenólicos presentes en *I. muruoides*.

Comparar las concentraciones de alcaloides y compuestos fenólicos en plantas libres o infestadas de ácaros.

Comparar las concentraciones de alcaloides y los compuestos fenólicos en plantas en distintas estaciones del año.

Determinar las concentraciones de alcaloides y compuestos fenólicos en decocciones de hojas de *I. muruoides*.

7. REFERENCIAS

- Anaya-Lang, A. L. **2001**. Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Editor Plaza y Valdes. México. 607-632.
- Arango, A. G. J. **2008**. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. 31-32.
- Argueta, A., Gallardo, V. M. C. **1994**. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. *Instituto Nacional Indigenista*. México. 1, 351-352.
- Barrera, V., Tapia, C., Monteros, A. Valverde, F. **2004**. *Raíces y tubérculos andinos: alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador*. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 4. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Quito, Ecuador-Lima, Perú. pp. 91-116.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. **1996**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70-76.
- Carranza-González, E., Zamudio-Ruíz, S., Murguía-Sánchez, G. **1998**. Una especie nueva de *Ipomoea* (Convolvulaceae) de los estados de Guanajuato, Hidalgo y Querétaro, México. *Acta Botánica Mexicana*. 45, 31-42.
- Cruz-Gallegos, J. A. **2012**. Relación flavonoides totales-actividad antidiabética (*in vitro por difusión de glucosa*) en extractos de *Colubrina elliptica*. *Tesis de licenciatura de la Carrera de Ingeniería en Alimentos*. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca. México.
- Díaz-Pontones, D. M. **2009**. *Ipomoea*: un género con tradición. *Contactos*. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México. 73, 36-44.
- Drago-Serrano, M. E., López-López, M., Sainz-Espuñes, T. R. **2006**. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37 (004), 58-68.
- Emendörfer, F., Emendörfer, F., Bellato, F., Noldin, V. F., Niero, R., Cechinel-Filho, V. **2005**. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants

- in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 8 (1), 63-68.
- Flieger, M., Wurst, M., Shelby, R. **1997**. Ergot alkaloids—sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiologica*. 42 (1), 3-29.
- Ghasemzadeh, A., Omidvar, V., Jaafar, H. Z. E. **2012**. Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6 (15), 2971-2976.
- Gitelson, A. A., Schalles, J. F., Rundquist, D. C., Schiebe, F. R., Yacobi, Y. Z. **1999**. Comparative reflectance properties of algal cultures with manipulated densities. *Journal of Applied Phycology*. 11, 345-354.
- Gramza, A., Pawlak-Lemańska, K., Korczak, J., Wasowicz, E., Rudzinska, M. **2005**. Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*. 14 (6), 861-867.
- Gutiérrez-Avella, D. M., Ortíz-García, C. A., Mendoza-Cisneros, A. **2008**. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología 2008. Santiago de Querétaro, Qro.* 1108, 1-5.
- Harris, D. C. **2007**. Análisis químico cuantitativo. Tercera edición. Editorial Reverté. 61-75.
- Herrera-Ruiz, M., Gutiérrez, C., Jiménez-Ferrer, E., Tortoriello, J., Mirón, G., León, I. **2007**. Central nervous system depressant activity of an ethyl acetate extract from *Ipomoea stans* roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 112 (2), 243-247.
- Hueza, I. M., Fonseca, E. S. M., Paulino, C. A., Haraguchi, M., Górniak, S. L. **2003**. Evaluation of immunomodulatory activity of *Ipomoea carnea* on peritoneal cells of rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 87 (2-3), 181-186.
- Jenett-Siems, K., Weigl, R., Kaloga, M., Schulz, J., Eich, E. **2003**. Ipobscurines C and D: macrolactam-type indole alkaloids from the seeds of *Ipomoea obscura*. *Phytochemistry*. 62 (8), 1257-1263.
- Julián-Loaeza, A. P., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B. S., Salas-Coronado, R. **2011**. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*. 34 (2), 1262-1268.
- Julkunen-Tiitto, R. **1985**. Chemotaxonomical screening of phenolic glycosides in northern willow twigs by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 324, 129-139.

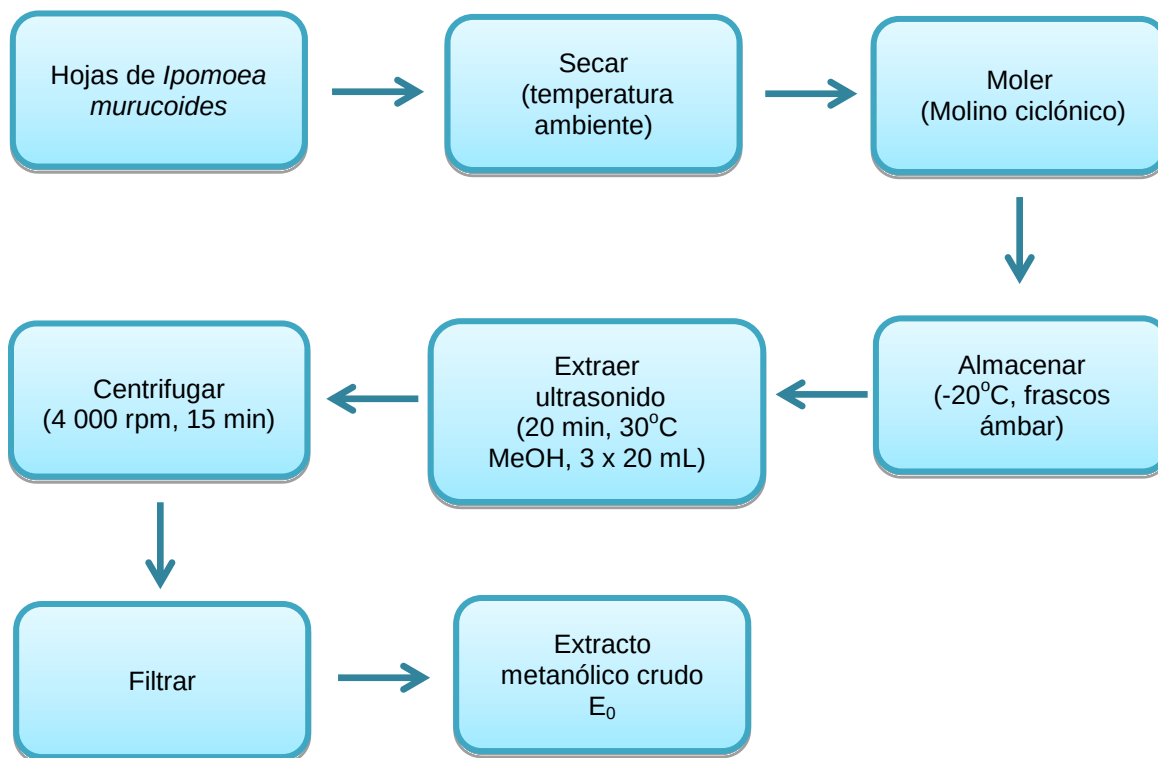
- Jung, J.-K., Lee, S.-U., Kozukue, N., Levin, C. E., Friedman, M. **2011**. Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plants and in home processed roots. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 29-37.
- Konczak, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., Yamakawa, O. **2004**. Caffeoylquinic acids generated in vitro in a high-anthocyanin-accumulating sweet potato cell line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 5, 287-292.
- Lako, J., Trenerry, V. C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., Premier, R. **2007**. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*. 101, 1727–1741.
- Lina-García, L. P. **2006**. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Ipomoea intrapilosa* en luz y oscuridad para la producción de sustancias con actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* Smith, (Lepidoptera: noctuidae), plaga de interés agrícola. *Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos*. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.
- Lobaina-Rodríguez, T., Rodríguez-Martínez, C., Zhurbenko, R. **2007**. Caracterización de un extracto de *Ipomoea batatas* para ser utilizado en calidad de base nutritiva en medios de cultivo. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 59 (3), 218-226.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Ros, G. **2000**. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50 (1), 5-18.
- Maurya, A., Srivastava, S. K. **2009**. Large-scale separation of clavine alkaloids from *Ipomoea muricata* by pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*. 877, 1732-1736.
- Mehul, K. B., Kishore, D. K., Ajay, K. S. **2010**. *Ipomoea reniformis*: a scientific review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2 (4), 22-23.
- Meira, M., Silva, E. P., David, J. M., David, J. P. **2012**. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22 (3), 682-713.
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F. C. **1993**. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*. 76 (9), 2812-2823.
- Montgomery, D. C. **2006**. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Limusa Wiley. México. 21-59.

- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., Krishna, D. R. **2001**. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33 (1), 2-16.
- Pereda-Miranda, R., Bah, M. **2003**. Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 3 (2), 111-131.
- Peterson, G. L. **1979**. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*. 100 (2), 201-220.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. **2005**. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 53 (10), 4290-4302.
- Rajendraprasad, N., Basavaiah, K., Vinay, K. B. **2010**. Sensitive spectrophotometric determination of lamotrigine in bulk drug and pharmaceutical formulations using bromocresol green. *Eclética química*. 35 (1), 55-66.
- Rey, B. L. **1999**. El cultivo del ajonjolí, producción y utilización. *Boletín técnico* Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Ibagué Tolima, Colombia. 143.
- Roberts, M. F., Wink, M. **1998**. Alkaloids: Biochemistry, ecology, and medicinal applications. New York, N. Y. 1-6.
- Rojas-Barquera, D., Narváez-Cuenca, E. C., Restrepo-Sánchez, L. P. **2008**. Evaluación del contenido de vitamina C, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades pera, regional roja y regional blanca. *Memorias Red-Alfa Lagrotech Comunidad Europea Cartagena*. 49-60.
- Rumbaoa, R. G. O., Cornago, D. F., Geronimo, I. M. **2009**. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chemistry*. 113 (4), 1133-1138.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. **1998**. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76 (2), 270-276.
- Schröder, M. J. A. **2003**. Food quality and consumer value: Delivering Food that Satisfies. *Food quality attributes*. Springer. Edinburgh, UK. 128-129.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-rizi, M. **2008**. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 17-20.

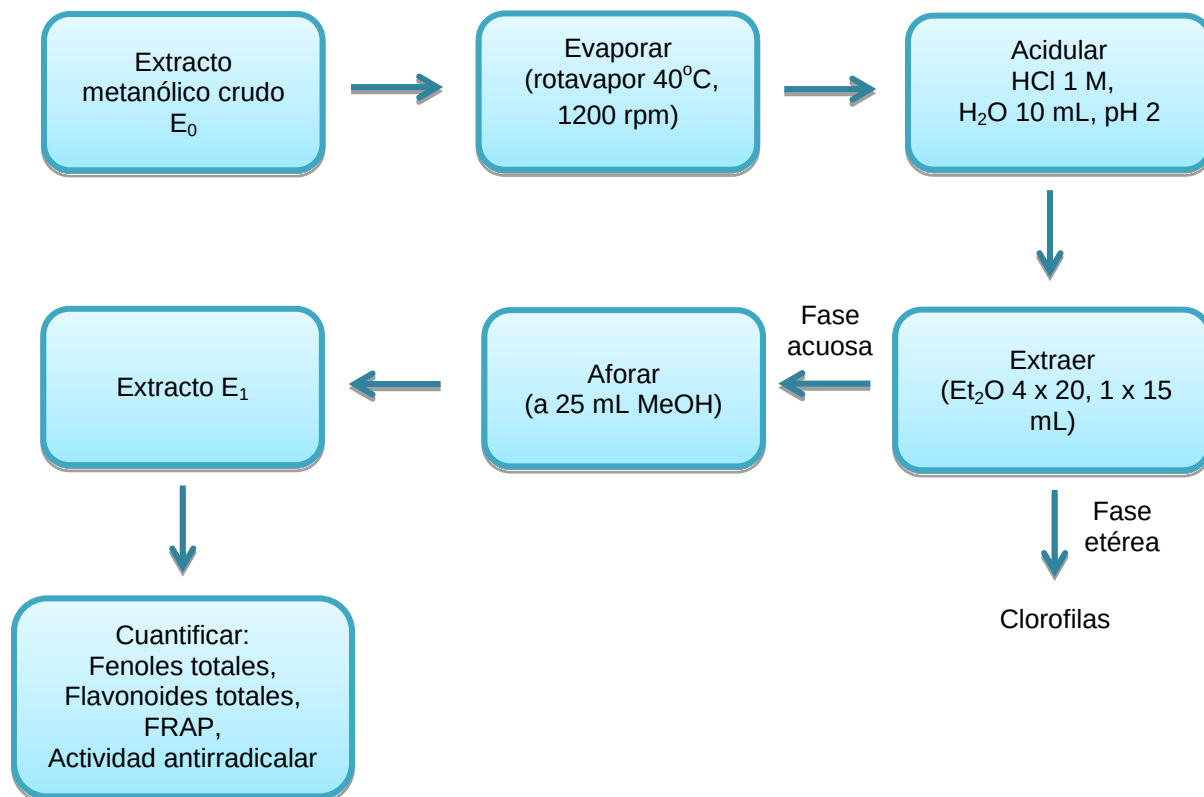
- Tecanhuey-Fernández, L. R. **2005**. Estudio fitoquímico de *Ipomoea murucoides*. *Tesis de Licenciatura de la Carrera en Quimicofarmacobiología*. Departamento de Química y Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas. Puebla, México.
- Thomas, T. G., Rao, S., Lal, S. **2004**. Mosquito larvicidal properties of essential oil of an indigenous plant, *Ipomoea cairica* Linn. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 57 (4), 176-177.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M. García-Parrilla, M. C. **2007**. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds toward DPPH free radical. *Talanta*. 71, 230-235.
- Witters, W. L. **1975**. Extraction and identification of clavine and lysergic acid alkaloids from morning glories. *Ohio Journal of Science*. 75 (4), 198-201.
- Zamora-Natera, F., García-López, P., Rodríguez-Macías, M. R., Salcedo-Pérez, E. **2009**. Composición y concentración de alcaloides en *Lupinus exaltatus* Zucc. durante su crecimiento y desarrollo. *INCI*. 34 (9), 672-676.
- *Instituto de Biología. 1985. "*Ipomoea murucoides* Roem.&Schantz.-IBUNAM:MEXU:OAX408134". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-06-01. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2011-8-2. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX408134>

8. APÉNDICE

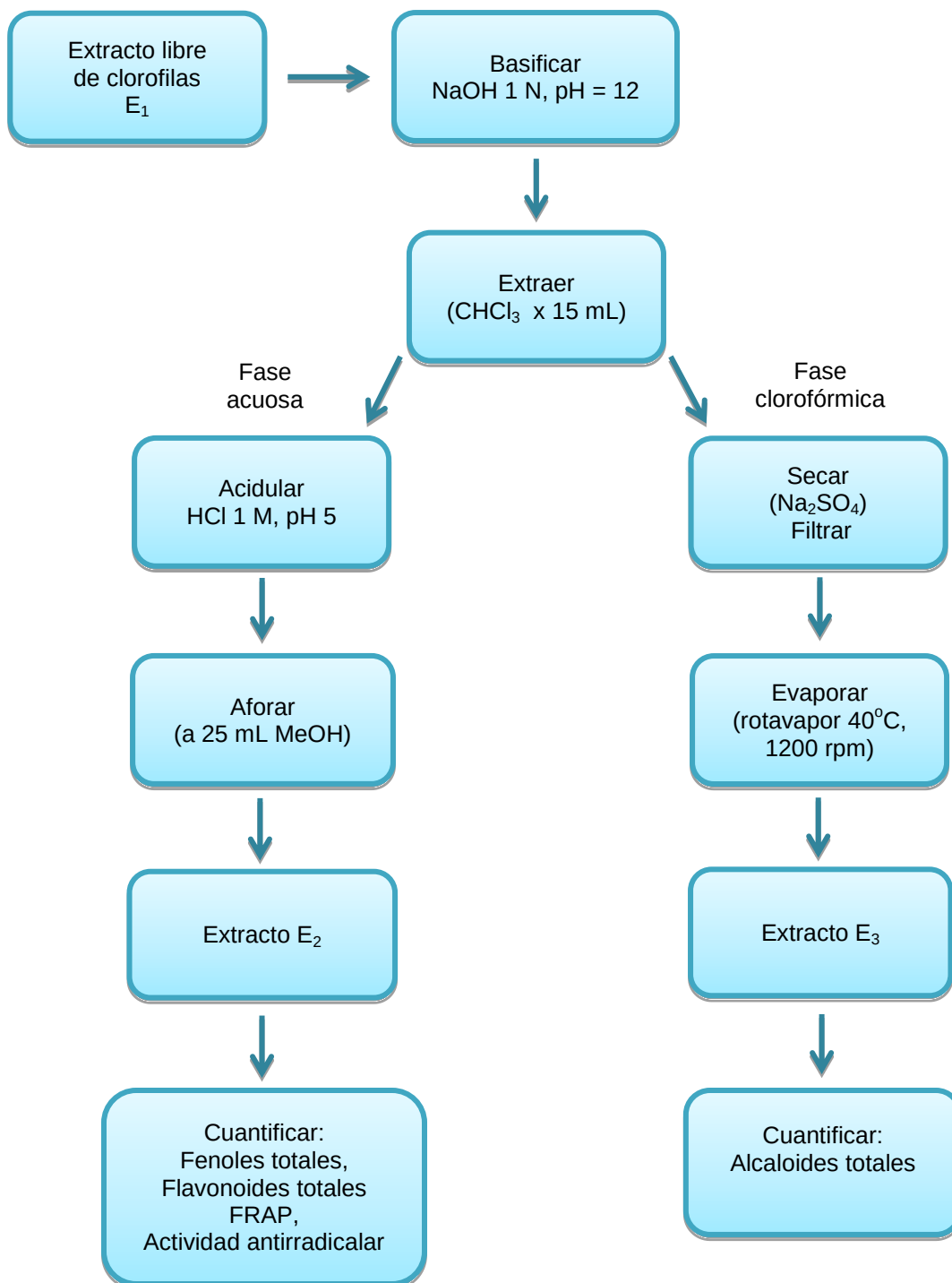
Apéndice 1a. Obtención de extracto metanólico crudo E₀



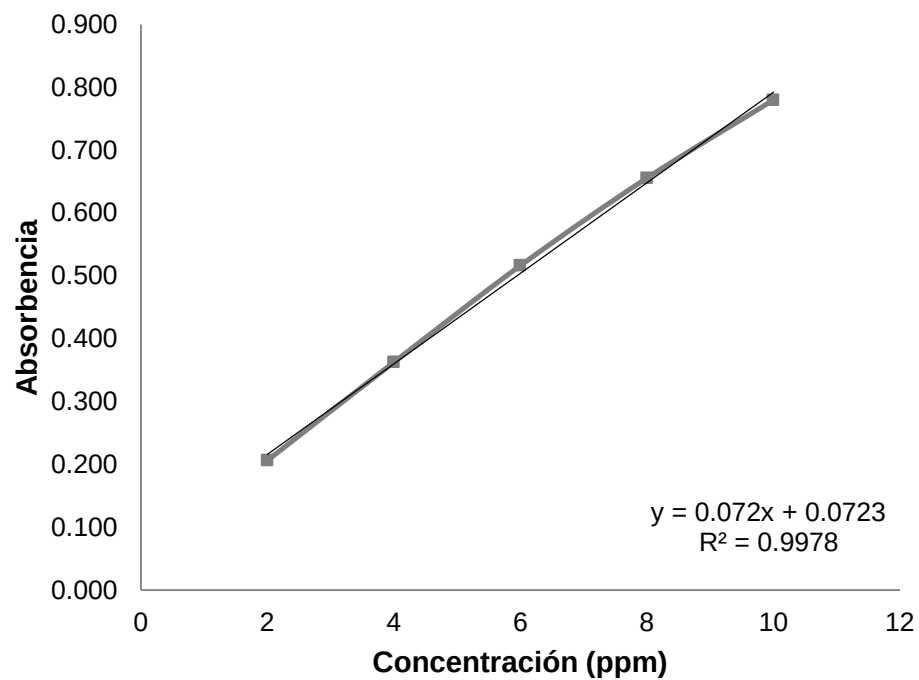
Apéndice 1b. Obtención de extracto libre de clorofilas E₁



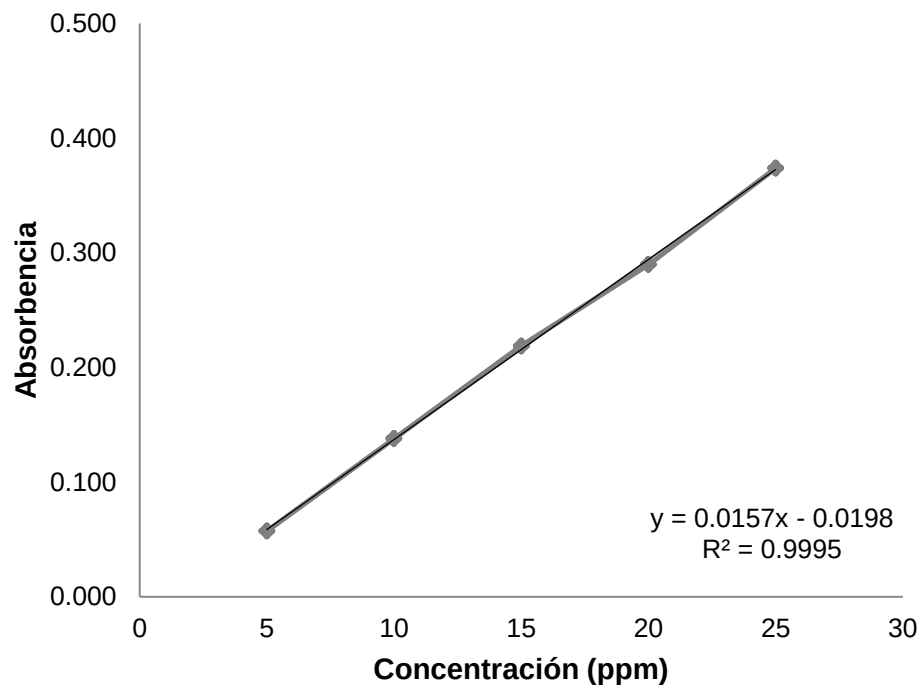
Apéndice 1c. Obtención de extractos E₂ y E₃



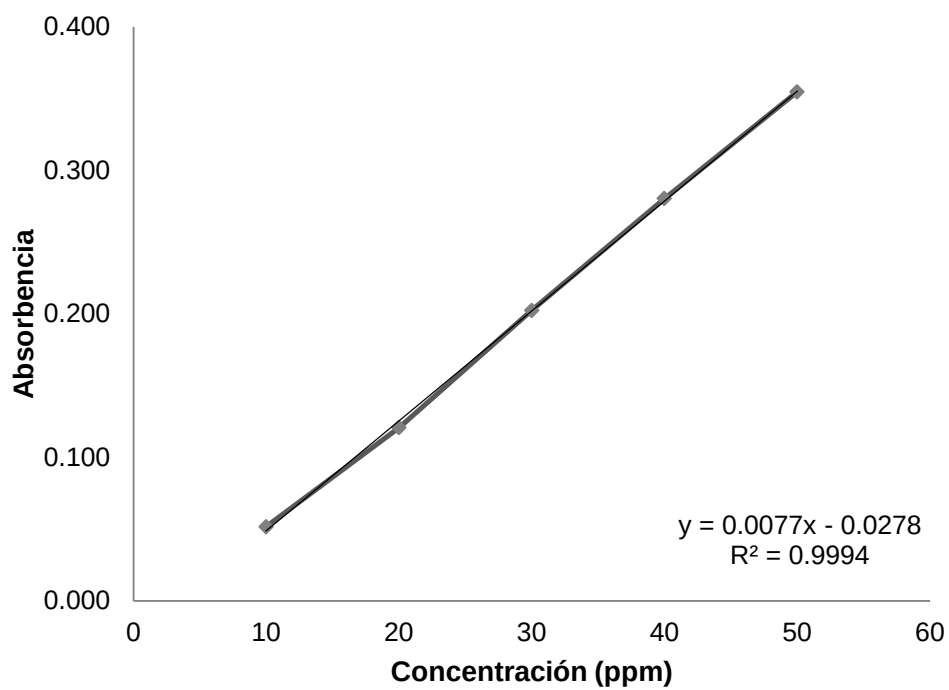
Apéndice 2. Curva de calibración de estándares de cinconina para la cuantificación de alcaloides totales.



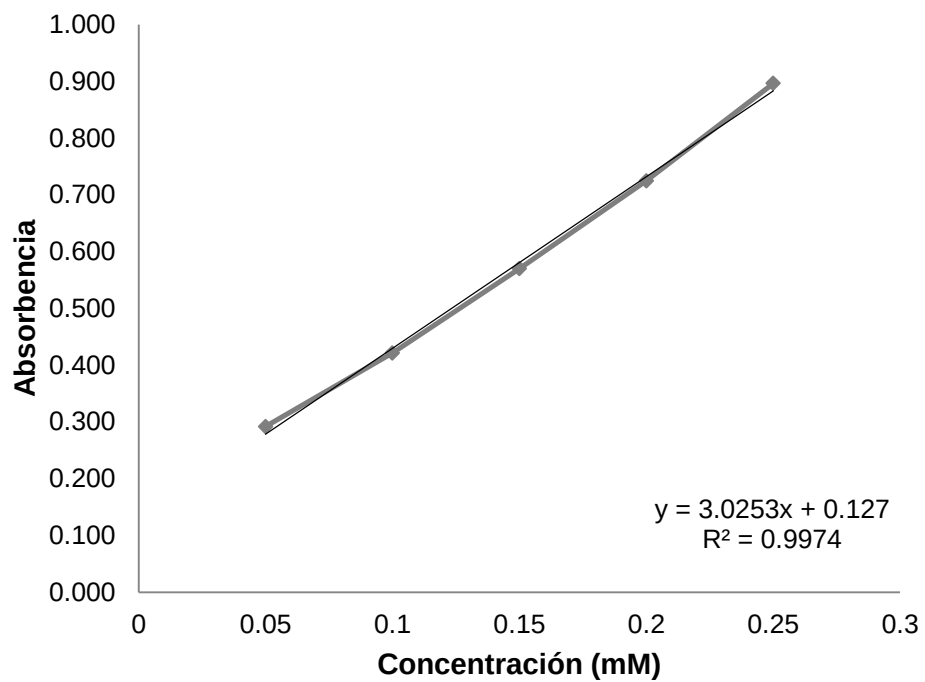
Apéndice 3. Curva de calibración de estándares de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.



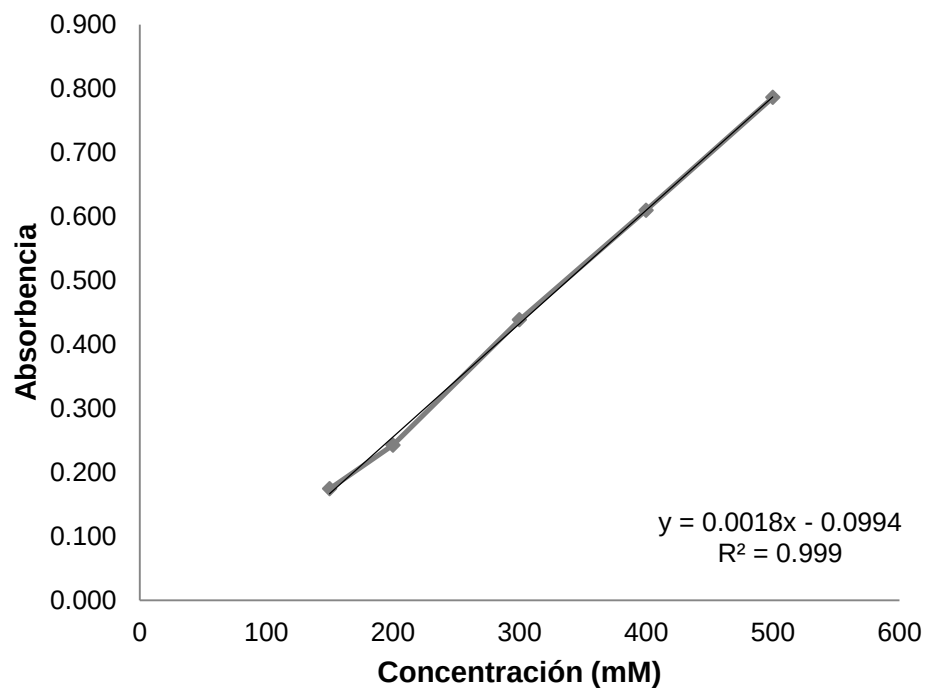
Apéndice 4. Curva de calibración de estándares de (+)-catequina para la cuantificación de flavonoides totales.



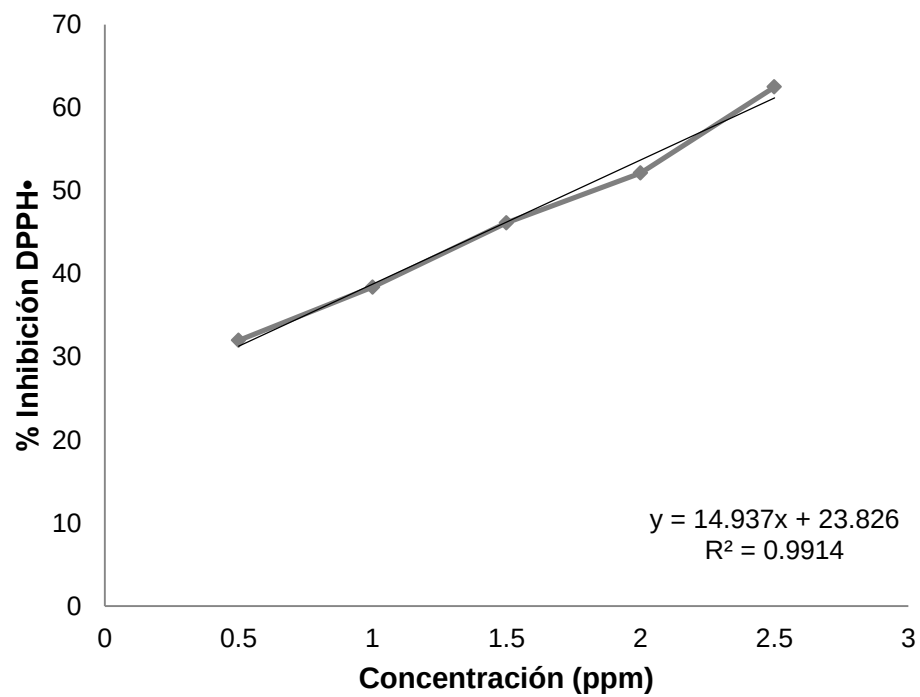
Apéndice 5. Curva de calibración de estándares de trolox para la cuantificación FRAP.



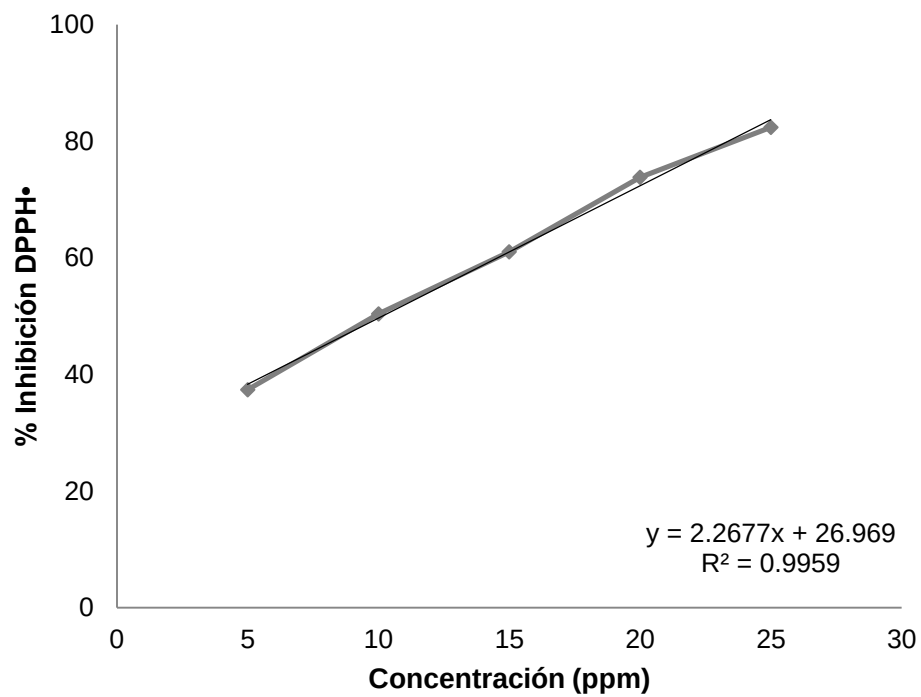
Apéndice 6. Curva de calibración de estándares de Fe_2SO_4 para la cuantificación FRAP.



Apéndice 7. Curva de calibración de estándares de ácido gálico para la cuantificación de DPPH•.



Apéndice 8. Curva de calibración de estándares de rutina para la cuantificación DPPH•.



Apéndice 9. Análisis estadístico.

En las determinaciones de este trabajo se compararon dos valores promedios. Se utilizó la prueba t de Student, empleada cuando las mediciones son menores a 30, para comprobar si había diferencias significativas entre ellos. Existen tres casos en los cuales se puede aplicar un comparativo de medias utilizando la prueba t de Student:

- Caso 1. Comparación de un resultado medido con un valor conocido.
- Caso 2. Comparación de medidas replicadas.
- Caso 3. Comparación de pares de medidas.

Los datos de esta investigación corresponden al Caso 2, porque se tienen dos valores promedio con tres réplicas cada uno ($n = 3$): $\bar{x}_1$ (E_1 , extracto libre de clorofilas) y $\bar{x}_2$ (E_2 , extracto libre clorofilas y alcaloides).

Posteriormente, se definió la hipótesis nula H_0 , “La presencia de alcaloides en el extracto E_1 no afecta la cuantificación de antioxidantes y su actividad”.

$$H_0: E_1 = E_2$$

$$H_1: E_1 \neq E_2$$

La prueba de hipótesis se realizó a un nivel de confianza del 95%, mediante la determinación del valor de $t_{calculada}$ a partir de la Ecuación 4 ó 6 y su comparación con el valor de $t_{tabulada}$. Si $t_{calculada} < t_{tabulada}$ la H_0 se retiene. La Ecuación 4 se utiliza cuando las desviaciones estándares s_1 y s_2 son estadísticamente iguales.

$$t_{calculada} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{combinada}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Siendo:

$\bar{x}_1$ = valor promedio 1

$\bar{x}_2$ = valor promedio 2

n_1 = 3 mediciones

n_2 = 3 mediciones

$S_{combinada}$ = desviación estándar combinada

La $S_{combinada}$ se obtiene a partir de la ecuación 5.

$$S_{combinada} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1) + (n_2-1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Para comparar a la $t_{calculada}$ con la $t_{tabulada}$, es necesario obtener los grados de libertad ($gl = n_1 + n_2 - 2$) y utilizar las tablas de valores críticos de t .

Cuando las desviaciones estándar s_1 y s_2 son estadísticamente diferentes, la $t_{calculada}$ se obtiene con la ecuación 6.

$$t_{calculada} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Mientras que los grados de libertad (gl) se calculan con la Ecuación 7. Este valor se utiliza para obtener la $t_{tabulada}$. Esta última se utiliza específicamente para compararla con la $t_{calculada}$, obtenida con la Ecuación 6.

$$gl = \left\{ \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} \right\} - 2 \quad \text{Ecuación 7}$$

Valores críticos de t

α	.40	.25	.10	.05	0.025	.01	.005	.0025	.001
v									
1	.325	1.0000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	318.31
2	.289	.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	23.326
3	.277	.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.213
4	.271	.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.73

v = grados de libertad. α = nivel de significancia. Datos tomados del Apéndice II (Montgomery, 2006).

Para determinar si las s_1 y s_2 eran estadísticamente iguales o diferentes, se utilizó la prueba F , la cual consiste en obtener una $F_{\text{calculada}}$ con la Ecuación 8 y compararla contra una F_{tabulada} . Si $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tabulada}}$, las desviaciones estándar son significativamente diferentes.

$$F_{\text{calculada}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Ecuación 8}$$

La F_{tabulada} se obtiene a partir de una tabla que relaciona los grados de libertad (gl = $n-1$) para s_1 y s_2 con valores críticos de F .

Valores críticos de $F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$ para un nivel de confianza del 95%.

Grados de libertad s_2	Grados de libertad de s_1								
	2	4	6	8	10	12	15	20	∞
2	19,0	19,2	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5
3	9,55	9,28	8,94	8,84	8,79	8,74	8,70	8,66	8,53
4	6,94	6,39	6,16	6,04	5,96	5,91	5,86	5,80	4,36

Datos tomados de la tabla 4.5 (Harris, 2007).