



Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Química

“DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Laguncularia racemosa*”

Presentado por:

Maricarmen Batista Zambrano.

Profesor (es) Asesor (es):

Dr. Sergio Martínez-Luis (INDICASAT-AIP)

Dra. Lilia Chérigo (Departamento de Química Orgánica)

Trabajo de Graduación para optar al grado de Licenciada en Química.

Ciudad de Panamá, República de Panamá.

Segundo semestre del 2023

JURADO EVALUADOR

Dr. Sergio Martínez-Luis

Dra. Lilia Chérigo

Mgtr. Vielza Domínguez

Mgtr. Guillermo Domínguez

DEDICATORIA

A Valerio Batista,

Mi padre, el hombre que durante su vida
solo supo hacer la mía maravillosa.

A Paula Zambrano,

Mi madre, quien posee una inexplicable bondad y
un infinito amor.

A Elvira Otero,

Mi abuela, gracias por no dejar de rezar
por mí.

A Alejandro Del Cid,

Por darme luz, apoyo y palabras de ánimo
en mis peores y mejores momentos.

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi amor, a mis padre, por permitir el acceso a la más grandes de las oportunidades “ la educación”, gracias por su amor, apoyo y dedicación a que las más pequeñas de mis metas se sientan como el más grande éxito. Tenerlos es el más grande orgullo de mi vida.

A mis hermanos: Sandra, Eloy, Edgar, Jairo, Maribel. Por siempre acudir y saber escuchar mis preocupaciones y atender mis necesidades, haciendo mis metas las suyas propias.

A Alejandro, por tomar mi mano, acompañarme, algunas veces empujarme y otras arrastrarme en este camino, no dejarme sola, pero sobre todo siempre tener paciencia, compartiendo mis alegrías y tristezas.

A la familia Del Cid, Gracias por brindarme un espacio en su hogar y corazón, su apoyo me ha brindado la seguridad y confianza en los momentos más duros de mi vida para cumplir esta meta.

A la familia que yo escogí: Víctor, Brenda, Elvis, Gracias por cada tarea, explicación, risa, preocupación, estrés, quejas y frustraciones compartidas por 5 años.

A mis amigos y compañeros de tesis: Dayreth, Carlos, María. Por brindarme su apoyo, guía y respaldo durante todo este proceso.

A Juan Fernández, por sus consejos, apoyo, comprensión y paciencia en el laboratorio.

A Javier Liao, por su guía, paciencia y puntualidad incuestionable.

A mis asesores Dr. Sergio Martínez-Luis y la Dra. Lilia Chérigo, por la oportunidad, tiempo y confianza en este proyecto.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado (VIP) por financiar parte de la investigación a través del proyecto VIP-CEIP-01-04-04-2023-03 ganador a los fondos de investigación universitaria 2023.

Al Instituto de Investigación Científicas y Servicios de Alta tecnología (INDICASAT AIP) por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.

Por ultimo. Gracias a cada persona que directa o indirectamente hizo posible esto.

INDICE

	Pagina
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE TABLA	vii
INDICE DE ILUSTRACIONES	viii
RESUMEN.....	xi
1. MARCO INTRODUCTORIO	2
1.1-Marco teórico	2
1.2- MANGLARES	3
1.2.1- Manglares y su distribución geográfica en Panamá	4
1.2.2-Importancia de los manglares.....	5
1.3- MANGLE BLANCO O <i>Laguncularia Racemosa</i>.....	6
1.4.1-ASPECTOS MORFOLÓGICOS	7
1.4.1.1-Raíces	7
1.4.1.2- Árbol	8
1.4.1.3- Hojas	9
1.4.1.4- Flores.....	9
1.4.1.5- Fruto	10
1.4.2- FITOQUÍMICA DE <i>Laguncularia racemosa</i>	11
1.4.3- FITOQUÍMICA DE LA FAMILIA <i>Combretaceae</i>.....	12

2.	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	15
3.	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	17
	3.1 OBJETIVOS GENERALES	17
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	4.1- CRISTALERIA	19
	4.2- REACTIVOS QUÍMICOS	20
	4.2.1- Solventes	20
	4.2.2- Reactivos	21
	4.3- EQUIPO	21
	4.3.1- Equipo para preparación de extracto crudo	21
	4.3.2- Equipo para bioensayos	21
	4.3.3- Equipo para para determinación la composición química	22
	4.4- METODOLOGÍA	23
	4.4.1- Etapa 1: Obtención y tratamiento de la materia prima.	23
	4.4.2- Etapa 2: Preparación del extracto crudo.	23
	4.4.3- Etapa 3: Elaboración de bioensayos	23
	4.4.3.1- Ensayo de fitotoxicidad con <i>Raphanus sativus</i>.	24
	4.4.3.2- Ensayo de citotoxicidad con <i>Artemias salinas</i>.	26
	4.4.3.3- Ensayo inhibidor de la enzima alfa-glucosidasa.	28

4.4.3.4-Ensayo de actividad antioxidante.....	31
4.4.3.5-Determinación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu.	33
4.4.3.4-Determinación de actividad antiparasitaria contra <i>Plasmodium falciparum</i> y <i>Leishmania donovani</i>	34
4.4.4.1- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1- Preparación de extractos crudos	37
5.2-Ensayo de fitotoxicidad con semillas de <i>Raphanus sativus</i>	38
5.3-Ensayo de citotoxicidad con <i>Artemia salinas</i>	41
5.4- Ensayo de inhibición de enzima alfa-glucosidasa	44
5.5-Ensayo de actividad antioxidante.....	47
5.6-Determinación de fenoles totales por método de Follin-Ciocalteu	49
5.7-Determinación de actividad antiparasitaria contra <i>Leshmania donovani</i> y <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i>	51
5.8- Caracterización química de los extractos	52
5.8.1-Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	52
5.8.1.1-Extracto de hexano	52
5.8.1.2-Cromatograma de diclorometano	54
5.8.1.3- Estudio de diversidad química.	55
5.8.1.4-Actividades biológicas de los compuestos más abundantes observados en cromatograma de masas	57

5.8.1.4.1- Esteroles.....	58
5.8.1.4.2- Triterpenoides	60
6-CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	64
6.1- Conclusiones:	64
6.2-Recomendaciones:	65
7-REFERENCIAS.....	67
8-ANEXOS.....	84

INDICE DE TABLA

	Página
Tabla 1: Especies de manglares más comunes de Panamá y su distribución en las costas.....	5
Tabla 2: Aspectos taxonómicos de <i>Laguncularia racemosa</i>	7
Tabla 3: Ejemplos de compuestos presentes en diferentes especies de la familia <i>Combretaceae</i> . 13	
Tabla 4: Masa de extractos crudos de <i>L. racemosa</i> obtenidos por maceración con hexano, diclorometano, metanol.....	37
Tabla 5: Resultados de ensayo de fitotoxicidad de extracto crudo de <i>L. racemosa</i> contra semillas de rabano.	38
Tabla 6: Resultados de los extractos crudo de <i>L. racemosa</i> en ensayo de citotoxicidad.	42
Tabla 7: Resultados de segunda evaluación de citotoxicidad a los extractos de diclorometano... 42	
Tabla 8: Resultados de screening de ensayo inhibidor de enzima alfa glucosidasa.....	44
Tabla 9: Porcentaje de actividad inhibidora de los extractos crudos de <i>L. racemosa</i> y controles. 45	
Tabla 10: Resultados de screening de actividad antioxidante de los extractos de <i>L. racemosa</i> por el método radical libre DPPH.	47
Tabla 11: Resultados de segunda evaluación de actividad antioxidante e CI50 de extractos de <i>L. racemosa</i> y vitamina C.....	47
Tabla 12: Datos de absorbancia obtenidos espectrofotométricamente de extractos de <i>L. racemosa</i> y ácido gálico.	50
Tabla 13: Resultados de ensayos antiparitarios de <i>L. racemosa</i> contra <i>L. donovani</i> y <i>P. falciparum</i>	51
Tabla 14: Compuestos observados en espectro de masas de hexano	52
Tabla 15: Compuestos presentes en extractos crudo de diclorometano.....	54

INDICE DE ILUSTRACIONES

Página

Ilustración 1: Distribución geográfica de los manglares de Panamá.....	5
Ilustración 2: Ubicación del mangle blanco con respecto a la marea y otras especies.	7
Ilustración 3: Raíces de <i>L. racemosa</i> (mangle blanco).	8
Ilustración 4: Fotografía del tronco de <i>L. racemosa</i>	8
Ilustración 5: A) fotografía de glándulas en pecíolo de una hoja adulta de mangla blanco, B) Hoja de planta adulta de mangle blanco	9
Ilustración 6: Flores de mangle blanco.....	9
Ilustración 7: Frutos de <i>Laguncularia racemosa</i>	10
Ilustración 8: Estructura química de: A) Lupeol, B) Taraxerol.	11
Ilustración 9: Estructura química de A) β -Amirina, B) Betulina , C) Friedelina, D) β -sitoesterol	12
Ilustración 10: Esquema de ensayo de fitotoxicidad.....	25
Ilustración 11: Esquema de ensayo de citotoxicidad.....	27
Ilustración 12: Reacción de la enzima con el p-NPG y los productos p-nitrofenol y glucosa.	29
Ilustración 13: Secuencia de soluciones para ensayo de α -GLC.....	30
Ilustración 14: Cambio de color de la reducción de DPHH A DPPH2 en presencia de un antioxidante.....	31
Ilustración 15: Esquema de ensayo de determinación de actividad antioxidante.	32
Ilustración 16: Esquema de prueba de fenoles totales.....	33
Ilustración 17: Maceración para obtención de extractos crudos de <i>L. racemosa</i> : 1) Materia prima triturada, 2) materia prima sumergida en disolvente. 3) concentración en rotavapor.....	37

Ilustración 18: Gráfico de crecimiento de semillas en función de la concentración ppm de los extractos crudos de <i>L. racemosa</i> en comparación con el control agua.....	39
Ilustración 19: Semillas de rabano germinadas para evaluación de actividades fitotóxica.....	39
Ilustración 20: Visualización de <i>Artemias salinas</i> en placa de 96 pocillos por medio de un estereomicroscopio.	41
Ilustración 21: Gráfico de I50 de la primera evaluación de extracto de diclorometano	43
Ilustración 22: Gráfico de IC50 de la segunda evaluación de extracto de diclorometano	43
Ilustración 23: Placas de 96 pocillos con ensayo inhibidor de enzima alfa glucosidasa, A) Hx, B) DCM , C) MeOH	45
Ilustración 24: Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos de A) Hex , B) DCM , C) MeOH sobre la enzima alfa glucosidasa.....	46
Ilustración 25: Evaluación de actividad antioxidante a diferentes concentraciones de los extractos de <i>L. racemosa</i> y vitamina C.....	48
Ilustración 26: Perdida de color del DPPH a medida que aumenta la concentración (50, 500, 1000) de extracto y vitamina C: A)MeOH , B) DCM ,C) vitamina C	48
Ilustración 27: Visualización de la coloración azul intensa en los extractos <i>L. racemosa</i> a diferentes concentración. A) DCM , B) MeOH a 100, 500, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	49
Ilustración 28: Evaluación de contenido de fenoles totales en los extractos <i>L. racemosa</i> a través de la absorbancia vs concentración.	50
Ilustración 29: Gráfico de % de actividad antiparasitaria de <i>L. racemosa</i> contra <i>L. panamensis</i> y <i>P. falciparum</i>	51
Ilustración 30: Cromatograma de masas obtenido por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de extracto de hexano de <i>L. racemosa</i>	52

Ilustración 31: Cromatograma de masas ampliado de extracto de <i>L. racemosa</i> con los compuestos correspondientes a la mayor abundancia.	53
Ilustración 32: Cromatograma de masas obtenido por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de extracto de diclorometano de <i>L. racemosa</i>	54
Ilustración 33: Cromatograma de masas ampliado de extracto de hexano de <i>L. racemosa</i> con los compuestos correspondientes a la mayor abundancia.	55
Ilustración 34: Visualización general de la red molecular de <i>L. racemosa</i>	56
Ilustración 35:Clusters de la red molecular de <i>L. racemosa</i>	57
Ilustración 36: Elaboración de ensayo de citotoxicidad.	84
Ilustración 37:Espectrófotometro UV/VIS.	84
Ilustración 38:Placa de 96 pocillos de ensayo inhibidor de alfa glucosidasa.	85
Ilustración 39: Estereomicroscopio.....	85

RESUMEN

Los manglares panameños son de los más diversos del continente americano, ya que en el país existen las condiciones adecuadas para que crezca este tipo de plantas. Los manglares de Panamá tienen varios estudios desde el punto de vista biológico y ecológico, sin embargo, son muy pocos los registros sobre la química y las actividades biológicas de los manglares. Un ejemplo de esto es el mangle blanco o *Laguncularia racemosa*, planta perteneciente a la familia Combretácea, que hasta la fecha no existen artículos científicos disponibles en la literatura sobre la especie que crece en Panamá, a pesar de que si existen reportes sobre otras plantas que pertenecen a la misma familia y que se sabe contienen compuestos bioactivos de tipo estilbenoides, alcaloides, terpenoides, polifenoles, entre otros, que también podrían estar presentes en *L. racemosa* y tener actividades biológicas de utilidad. Con base en esto, la presente investigación tiene como objetivo explorar el potencial biotecnológico de la especie *L. Racemosa* colectada en la provincia de Chiriquí, con base en la evaluación de sus fracciones usando un ensayo para determinar su actividad antioxidante (DPPH), su actividad fitotóxica (sobre semillas de rábano), su actividad citotóxica (sobre *Artemia salina*), actividad antiparasitaria contra dos parásitos: *Plasmodium falciparum* y *Leshmania donovani* (responsables dos enfermedades graves: malaria y Leshmaniasis respectivamente) y su efecto sobre la inhibición de la enzima alfa glucosidasa, al igual, que su contenido de compuestos fenólico a través del método de Follin-Ciocalteu.

El presente estudio se inició realizando la extracción de las hojas colectadas de *L. racemosa* mediante un proceso de maceración y el uso de tres disolventes con polaridad creciente (Hexano, Diclorometano, Metanol). Luego, las tres fracciones fueron evaluadas en el ensayo enzimático que se realizó en platos de 96 pozos y se encontró que las tres fracciones presentan inhibición de la enzima siendo los porcentajes inhibición 95 % para la fracción de Hexano a 900 µg/mL (CI₅₀ de

156 µg/mL), 100 % para la de Diclorometano a 300 µg/mL CI_{50} de 28.10 µg/mL) y 98.0 % para la de Metanol a 200 µg/mL (CI_{50} 10 µg/mL). Posteriormente, los tres extractos se sometieron a diferentes ensayos para evaluar su fitotoxicidad en semillas de rábano, su citotoxicidad en *Artemia salina* y su capacidad antioxidante mediante el ensayo de radical libre de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo). El extracto de diclorometano a una concentración de 1000 µg/mL mostró una reducción del 40 % en el crecimiento de las semillas de prueba, junto con una mortalidad del 80 % en las *Artemias* (con una CI_{50} de 316 ppm). Además, exhibió una actividad antioxidante del 95 % (CI_{50} 480 µg/mL). Por otro lado, el extracto de metanol presentó un 98 % de actividad antioxidante (CI_{50} 222 µg/mL) a una concentración de 1000 µg/mL. Estos resultados fueron consistentes con el mayor contenido de fenoles totales en dicha fracción, determinado mediante la prueba de Follin Ciocalteu.

En el screening de actividad antiparasitaria, el extracto de hexano y metanol mostraron una inhibición del 74,0 % y 96,4 %, respectivamente, a una concentración de 10 µg/mL contra el *Plasmodium falciparum*. En el caso de *Leshamnia donovani*, solo el extracto de metanol alcanzó un 75,3 % de inhibición a la misma concentración. Las demás fracciones resultaron inactivas.

En la parte química, se realizó un fraccionamiento primario de la fracción más activa y se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para obtener espectros de las fracciones apolares. Se identificaron compuestos como β -sitoesterol (presente en los extractos de hexano y diclorometano), Lupeol, β -amirona (presentes en el extracto de hexano), cipereno (presente en el extracto de diclorometano) y β -amirina (presente en los extractos de diclorometano y hexano). De acuerdo con los reportes en la literatura, estos compuestos pueden ser responsables de las actividades biológicas reportadas en esta investigación.

CAPÍTULO 1:

MARCO INTRODUCTORIO

1. MARCO INTRODUCTORIO

1.1-Marco teórico

La formación del Istmo de Panamá es considerado uno de los eventos geológicos más notables en la evolución del planeta. Este istmo se convirtió en una franja de tierra que funciona como un corredor natural, dividiendo dos océanos y conectando el norte y el sur de un continente. Este fenómeno trajo consigo cambios globales significativos que propiciaron el surgimiento de una amplia variedad de ecosistemas, los cuales fueron el hogar de diversas especies vegetales.

Panamá se localiza actualmente en una posición geográfica particular, ubicada en la zona tórrida o intertropical, que abarca la región entre el trópico de Cáncer y el trópico de Capricornio. Esta ubicación geográfica se caracteriza por un clima cálido y húmedo a lo largo de todo el año, con temperaturas que oscilan entre los 25 °C y 35 °C, y un breve período de estación lluviosa. Además de esto, su posición como puente biogeográfico facilita el intercambio de especies y nutrientes tanto por vía terrestre como marítima, lo cual ha contribuido a que Panamá albergue una increíble diversidad vegetal única. Se estima que en el país se encuentran aproximadamente 10,444 especies de plantas, distribuidas en diversos ecosistemas como bosques tropicales, islas, archipiélagos, arrecifes de coral y manglares, entre otros.

La biodiversidad vegetal de Panamá no solo es de gran importancia desde un punto de vista natural, sino que también tiene implicaciones a nivel químico. Se sabe que las plantas poseen metabolitos secundarios, los cuales son moléculas generalmente de bajo peso molecular y no están directamente relacionadas con las funciones primarias de la planta (Delgoda, R.,2017), Ejemplo comunes de metabolitos secundarios incluyen alcaloides, terpenoides, fenoles, flavonoides, glucósidos y muchos otros. Estos metabolitos son responsables de grandes avances de la ciencia,

ya que han permitido tener tratamientos a enfermedades como el cáncer a través del taxol proveniente de *Taxus brevifolia* y medicamentos como la morfina, para aliviar los dolores proveniente de *Papaver somniferum*.

La diversidad vegetal en los ecosistemas de nuestro país propicia la presencia de diferentes metabolitos en una misma especie o familia, influenciados por condiciones ambientales, distribución geográfica y otros factores. Además, la constante búsqueda por mejorar tratamientos, productos y nutrientes genera el interés de científicos de diversas disciplinas, como la química, biología y medicina, quienes han llevado a cabo extensas investigaciones fitoquímicas en distintas especies vegetales.

1.2- MANGLARES

Los manglares son ecosistemas marino-costeros que forman parte de los humedales y se localizan en zonas tropicales y subtropicales. Estos ecosistemas representan una transición entre los ambientes terrestres y marinos (Del Cid, F., 2022). Este tipo de ecosistemas son fácilmente reconocibles debido a una serie de características distintivas. Algunas de las más destacadas incluyen:

1. **Adaptación a condiciones ambientales extremas:** Los manglares crecen en zonas marino-costeras y se enfrentan a variaciones diarias en el nivel del agua e inundaciones periódicas. Además, tienen que lidiar con suelos fangosos de baja circulación de aire, escasa presencia de arena, alta salinidad, humedad y precipitación. En estas condiciones, otros tipos de vegetación tendrían dificultades para desarrollarse. Sin embargo, los manglares han desarrollado adaptaciones morfológicas que les permiten prevalecer y proliferarse. Cuentan con sistemas de raíces adventicias, fúlcreas o aéreas que les proporcionan estabilidad en suelos blandos, movedizos o duros, y los ayudan a resistir

corrientes y tormentas. Además, poseen un sistema de respiración a través de neumatóforos ubicados cerca de la superficie del suelo (Srikanth, S., et al., 2016). Como si eso no fuera suficiente, los manglares también actúan como sistemas de filtración. Pueden acumular agua para diluir la sal o incluso retenerla en sus hojas y luego desecharla, o bien, excretarla a través de filamentos y glándulas (Kim, K., et al., 2016).

2. **Diversidad vegetal:** Los manglares no cuentan prácticamente con plantas herbáceas o trepadoras; en algunas regiones se pueden encontrar especies de fanerógamas (plantas con flores) en cambio, su vegetación prevalecte son árboles o arbustos que no alcanzan alturas superiores a 40 metros (Díaz, J.,2006), normalmente se les conoce como “mangle” y su cantidad varía de acuerdo con especies, a lo largo de los años; estas plantas se han adaptado a su entorno, germinan aún unidas al árbol hasta que desarrollan sus primeras raíces y hojas, cuando alcanza un tamaño adecuado, se desprende y flota hasta establecerse en un lugar adecuado para su desarrollo, lo que nos indica su gran capacidad de adaptación (Kim, K., et al, 2016).

1.2.1- Manglares y su distribución geográfica en Panamá

En Panamá, los manglares son una de las formaciones vegetales más predominantes. Podemos encontrar diversas especies de manglares en ambas costas, como se muestra en la ilustración 1, siendo la costa del Pacífico la que presenta una mayor densidad de población, como se indica en la Tabla 1. Según el Ministerio de Ambiente, hasta el año 2022, se estimaba que el territorio nacional contaba con aproximadamente 165,000 hectáreas de manglares. En estas áreas, se pueden encontrar 12 de las 65 especies de manglares verdaderos identificados hasta el momento, lo que convierte a nuestro país en uno de los más diverso en términos de manglares en comparación con otros países de América, esto según el Atlas Mundial de los Manglares (Spalding et al., 2010).

Tabla 1: Especies de manglares más comunes de Panamá y su distribución en las costas.

Especies predominantes	Costas del Atlántico	Costas del Pacífico
Mangle negro (<i>Avicennia germinans</i>)	✓	✓
Mangle salado (<i>Avicennia bicolor</i>)	-	✓
Mangle botón (<i>Conocarpus erectus</i>)	✓	✓
Mangle blanco (<i>Laguncularia racemosa</i>)	✓	✓
Mangle piñuelo (<i>Pelliciera rhizophorae</i>)	✓	✓
Mangle rojo (<i>Rhizophora mangle</i>)	✓	✓
Mangle caballero (<i>Rhizophora racemosa</i>)	-	✓
Mangle Marica (<i>Tabebuia palustris</i>)	-	✓
Mangle colorado (<i>Rhizophora harrisonii</i>)	✓	✓

Ilustración 1: Distribución geográfica de los manglares en Panamá.



1.2.2-Importancia de los manglares.

Cada componente de nuestro planeta cumple una función específica e indispensable para garantizar la sostenibilidad y el bienestar de este. Los manglares no escapan de esta realidad, actualmente sabemos que su existencia nos asegura una gran cantidad de servicios importantísimos, de los cuales muchos de nosotros dependemos.

La existencia de los manglares garantiza la preservación de especies marinas al servir como refugio transitorio durante las primeras etapas de vida de moluscos, peces, crustáceos o incluso aves

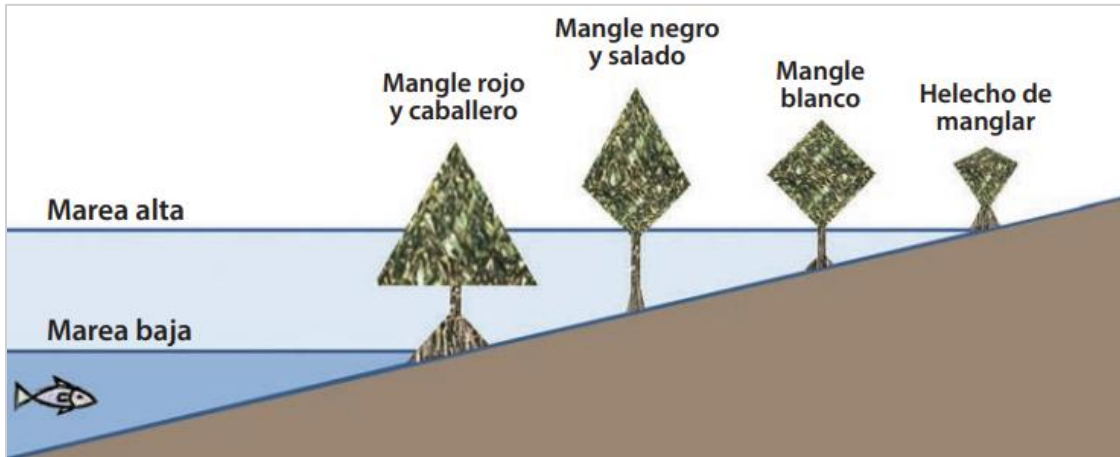
(Friess, D., et al, 2020). De igual manera, los manglares son nuestra primera línea de defensa contra las inclemencias del tiempo que vienen del mar (huracanes, tsunamis, vientos, tormentas, altas mareas, etc) (Twilley, R. et al, 2009) sus densos bosques y raíces entrelazadas retienen el agua evitando inundaciones en áreas costeras, disminuyen la velocidad de los vientos a medida que los atraviesan, evitando la erosión e inundaciones de comunidades costeras, especialmente en estos momentos que el clima y nivel del mar están cambiando (Kathiresan, K.,2012).

Otra función sumamente importante que llevan a cabo los manglares es actuar como purificadores, ya que, como cualquier otro bosque, los manglares capturan grandes cantidades de carbono, almacenándolo en sus raíces, troncos, ramas y hojas, lo que garantiza una mejor calidad del aire, reduciendo los efectos del cambio climático (Rivera, E., et al, 2005). Actúan de manera similar con las aguas residuales, ya que, son filtros naturales del agua que fluye desde el mar hacia la tierra (Twilley, R. et al, 2009), atrapan sedimentos y contaminantes, disminuyendo el contenido de materia orgánica del agua y en consecuencia mejorando su calidad. Adicional a esto, los seres humanos han sabido aprovechar los recursos de los manglares, como: la madera, turismo e incluso usos medicinales. Es importante reconocer la importancia de estos tipos de ecosistemas indispensables para nuestra vida.

1.3- MANGLE BLANCO O *Laguncularia Racemosa*

El mangle blanco es una de las especies predominantes en Panamá, se conoce popularmente como mangle “botola” (en Los Santos), “mariangolo” o “mangle torcido” (en la provincia de Panamá) y “maricqueta” o “mariquita” (en Veraguas) (ANAM-ARAP, 2013). Pertenecce a la familia *Combretaceae* y es la única especie del género monotípico *Laguncularia*. Crece en condiciones %de las costas. Se encuentra distribuido en todo el territorio nacional y su ubicación dentro de los manglares es la zona entre la marea alta y baja (Ilustración 2).

Ilustración 2: Ubicación del mangle blanco con respecto a la marea y otras especies.



Tomada de: ANAM-ARAP, 2013.

Tabla 2: Aspectos taxonómicos de Laguncularia racemosa.

Reino	<i>Plantae</i>
Especie	<i>L. Racemosa</i>
Filo	<i>Tranqueofita</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Myrtales</i>
Genero	<i>Laguncularia C. F. Gaertn.</i>
Familia	<i>Combrataceae</i>

Referencia: (Ellison, A, et al, 2007)

1.4.1-ASPECTOS MORFOLÓGICOS

1.4.1.1-Raíces

Esta especie desarrolla raíces aéreas, no muy largas, conocidas como neumatóforos, que emergen del suelo y se desarrollan a partir de un sistema primario horizontal, son pocas profundas y crecen en dirección ascendente (ilustración 3) (ANAM-ARAP, 2013), son indispensable para el mangle, ya que, ayudan a la planta a obtener oxígeno y sostenerse en las difíciles condiciones (Tomlinson, P. B., 1986).

Ilustración 3: Raíces de L. racemosa (mangle blanco).



Tomada de: <https://www.inatu.../photos/275098317>

1.4.1.2- Árbol

El mangle blanco tiene un rápido crecimiento, su tamaño oscila entre los 15-25 metros del alto con tallo de hasta 60 cm de diámetro, Su corteza es fisurada en forma de vetas color gris y marrón que se desplazan por todo el tronco y de apariencia lisa (ilustración 4). Su madera es dura y muy resistente, las poblaciones vegetales lo utilizan en la construcción de cercas y muelles.

Ilustración 4: Fotografía del tronco de L. racemosa.



Tomada de: <https://herbario.up.ac.pa/node/622844>

1.4.1.3- Hojas

Las hojas del mangle blanco son de lo más interesante, presentan estructuras glandulares en toda su lamina foliar y pecíolo (ilustración 5A), las mismas ayudan a manejar el exceso de sal (Francisco, A., 2019), En aspectos generales, las hojas poseen una coloración amarillo-verdosa y crecen en dirección opuesta a la rama, tiene forma oblongo-elíptica con terminaciones redondeadas desde la base al ápice, miden entre 3 a 11 cm de largo y 3 a 6 cm de ancho. (ilustración 5B)

Ilustración 5: A) Fotografía de ambos pares de glándulas en pecíolo de una hoja adulta de mangla blanco, B) Hoja de planta adulta de mangle blanco

A) Tomada de “ el manual de manglares para estudiantes” B) Tomada de "el manglar , manual para estudiantes



1.4.1.4- Flores

Ilustración 6: Flores de mangle blanco.



Tomada de <https://www.inaturalist.org/photos/285548976>

El mangle blanco posee flores pequeñas pentámeras de color blanco-verdoso, su crecimiento en la planta es de inflorescencias (flores y tallos de tamaño limitado) de 2 a 8 cm de larga (Jiménez , J. s/f) y crecen en las terminaciones de la rama (ilustración 6), al crecer toman la forma de un “tubo” en donde crecen los pétalos de 3 a 4 mm, algo muy característico de las flores de esta especie es que poseen flores masculinas y femeninas, las primeras son no fructificantes, mientras que las segundas si lo son; florecen durante todo el año, incluso se ha observado que la producción de flores se da antes de los dos años de edad y en plantas de menos de 1.5 metros (Holdridge, L.R., 1940).

1.4.1.5- Fruto

Sus frutos son verdes, carnosos y de forma aplanada (ilustración 7), pesan entre 0.4 a 1 gramos, pueden llegar a medir hasta 2.0 cm (Rabinowitz, D. 1978.). En comparación con otras especies el mangle blanco tiene poca incidencia de viviparidad, sus frutos germinan aun unidos al árbol, al caer flotan gracias a un pericarpio grueso. Posteriormente, después de 4 semanas el crecimiento empieza cuando la plántula se encuentra sumergida en un terreno adecuado. (Jiménez, J. s/f)

Ilustración 7:Frutos de Laguncularia racemosa



Tomada de: <https://www.inaturalist.org/photos/294882140>

1.4.2- FITOQUÍMICA DE *Laguncularia racemosa*

En Panamá, existen pocos informes sobre el contenido metabólico de *Laguncularia racemosa*, sin embargo, se han reportado la presencia de triterpenos como el Lupeol y Taraxerol (Ilustración 8A, 8B) aislados de una fracción de hexano de las hojas del mangle blanco (Cedeño, M. A., 2015).

Además, en países como la India, los análisis de extractos de hojas y corteza mostraron la presencia de triterpenos como β -amirina (ilustración 9A), Betulina (ilustración 9B), friedelina (ilustración 9C) y un estero, el β -sitoesterol (ilustración 9D) (Majumdar S.G., et al., 1980). Un análisis cuantitativo reveló la presencia de aproximadamente un 65 % de taninos, 10 % de saponinas, 7 % de flavonoides y 6 % de alcaloides en los extractos de hojas (Yahaya, M.A., 2018).

Ilustración 8: Estructura química de: A) Lupeol, B) Taraxerol.

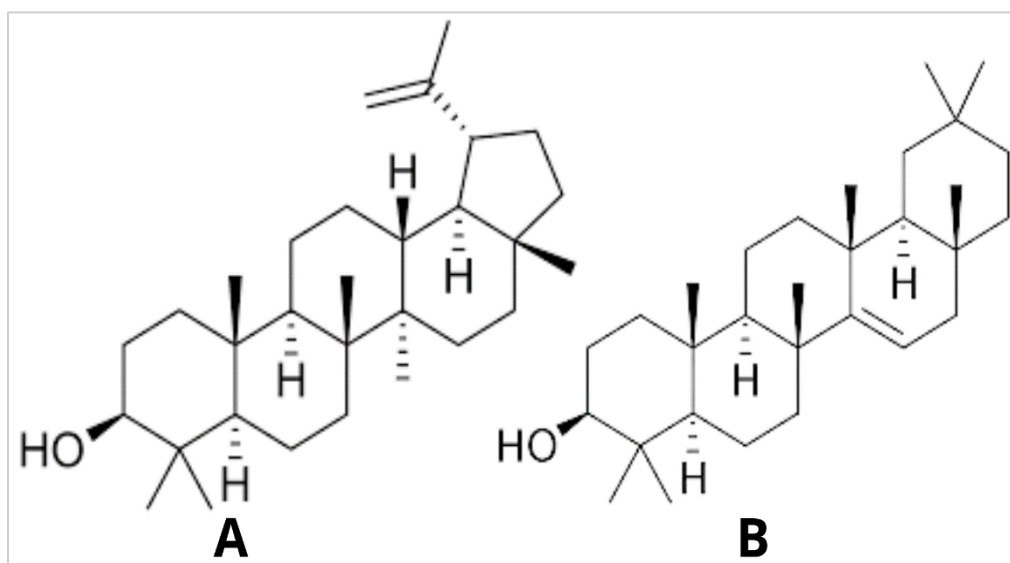
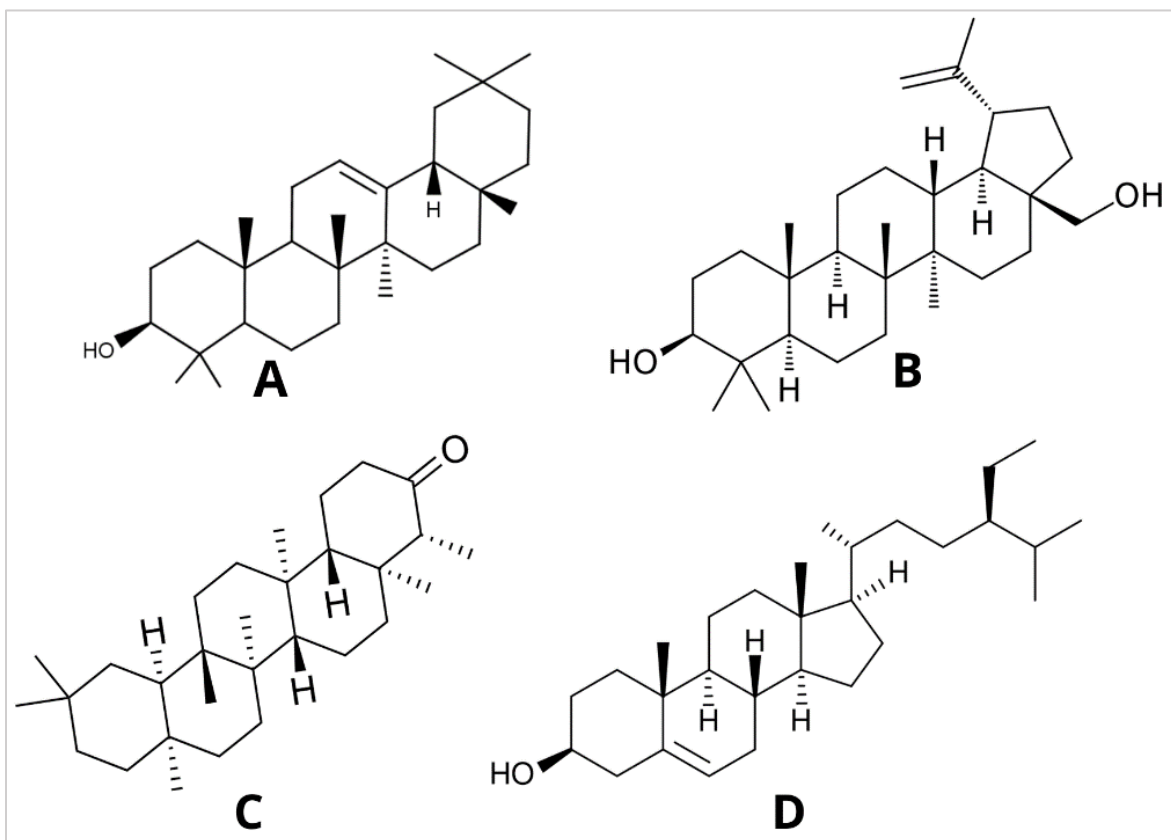


Ilustración 9: Estructura química de A) β -Amirina, B) Betulina, C) Friedelina, D) β -sitoesterol



1.4.3- FITOQUÍMICA DE LA FAMILIA *Combretaceae*

La familia Combretaceae, a la que pertenece *Laguncularia racemosa*, abarca alrededor de 90 géneros y más de 600 especies de árboles, trepadoras, arbustos y maleza. Se distribuye principalmente en zonas tropicales. Esta familia exhibe una amplia variedad de metabolitos secundarios, que incluye terpenoides, flavonoides, taninos, estilbenoides, fenantrenos, alcaloides y esteroides (Dawe, A., 2013) (Tabla 3).

Muchas de estas plantas tienen usos medicinales. Un ejemplo notable es la *Terminalia sericea*, utilizada en Camerún para tratar afecciones como gastroenteritis, dolor abdominal, infertilidad femenina e incluso diabetes. Estos usos se atribuyen a las propiedades conferidas por los metabolitos presentes en partes de la planta como la corteza y las hojas. Sin embargo, el análisis

del contenido metabólico de la familia *Combretaceae* no proporciona información específica sobre los posibles metabolitos con un gran potencial de diversas actividades biológicas que podrían presentarse en el mangle blanco, *Laguncularia racemosa*.

Tabla 3: Ejemplos de compuestos presentes en diferentes especies de la familia *Combretaceae*.

CLASIFICACIÓN	COMPUESTO	ESPECIE	FUENTE
Flavonoides	Kaempferol	<i>Terminalia catappa</i>	Lin, T.C., et al, 1999
	Quercetina	<i>C. leprosum</i>	Cavalcanti, P. M. S., et al, 2019.
Triterpenoides	Lupeol	<i>Terminalia sericea</i> * <i>C. micranthum</i> **	*Abbas, G., et al, 2017 **Cara, R., et al, 2010
	Ácido betulínico	<i>Combretum albopunctatum</i>	Katerere, D. R., et al. 2004
	Ácido mólico	<i>C. mole</i>	Pegel, K. H., et al, 1985.
	Cardamonina	<i>C. apiculatum</i>	Nawaz, J., et al, 2020.
Taninos	Castalagina	<i>Terminalia catappa</i>	Abiodun, O. O., et al, 2016
	Grandinina	<i>Terminalia catappa</i> <i>Terminalia parviflora</i>	Lin, T.C., et al, 1999
	ácido gálico	<i>Terminalia superba</i>	Kougan, G. B., et al, 2013
Esteroides	β -sitoesterol	<i>Terminalia sericea</i>	Abbas, G. et al, 2017
	Estigma-4-eno-3-ol	<i>Terminalia sericea</i>	Abbas, G. et al, 2017

CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las plantas son una de las fuentes más importantes de metabolitos secundarios en el mundo, y su estudio ha llevado a investigaciones cruciales que han impulsado avances significativos en campos que van desde la salud hasta la industria. Esto ha abierto un amplio abanico de posibilidades en áreas como la farmacia y la cosmética, entre otras. Panamá, un país conocido por su impresionante biodiversidad, alberga poblaciones destacadas de especies de mangles y ha demostrado un sólido compromiso con la investigación científica en diversos campos.

En este contexto, es crucial promover investigaciones enfocadas en poblaciones vegetales que han sido poco estudiadas, como es el caso del mangle blanco o *Laguncularia racemosa*. El estudio de esta especie podría ser de gran relevancia en los campos de la química y la biotecnología, al proporcionar información esencial sobre los metabolitos presentes en esta planta. Esto permitiría profundizar en el estudio de actividades ya reportadas, como su potencial antiparasitario contra el *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria) y su actividad antidiabética debido a su capacidad para inhibir la enzima alfa glucosidasa (López, D. et al., 2018). Además, este enfoque podría arrojar luz sobre otras propiedades aún no reportadas o estudiadas a profundidad.

En resumen, a través del estudio fitoquímico del mangle blanco presente en Panamá, con un enfoque especial en sus actividades biológicas y su diversidad química, se busca contribuir con información para una mejor caracterización de la especie *Laguncularia racemosa*. Esto permitirá comprender su variación y similitud con otras especies de plantas de manglar. Además, este estudio destacará la importancia de los manglares dentro de los ecosistemas y sentará una base sólida para futuras investigaciones en diversas áreas científicas.

CAPÍTULO 3:

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

3.1 OBJETIVOS GENERALES

- Explorar el perfil metabólico de la especie del mangle *Laguncularia racemosa*, orientado a la identificación de compuestos bioactivos, que podrían tener un potencial biotecnológico en las áreas de salud y agricultura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos orgánicos utilizando hojas secas de *Laguncularia racemosa*.
- Evaluar las actividades biológicas de interés en los extractos orgánicos de *Laguncularia racemosa*., como la inhibición de la alfa glucosidasa, la actividad antioxidante (utilizando el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)), la actividad antiparasitaria, la actividad fitotóxica (contra semillas de rábano) y fitotóxica (con de la *Artemia salina*)
- Identificar los compuestos mayoritarios bioactivos presentes en algunas fracciones activas del mangle blanco por medio de espectrometría de masas.

CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1-CRISTALERIA

➤ **Cristalería y materiales para preparación de extractos**

- Vaso químico de 500, 350, 200, 80 mL.
- Pipetas pasteur.
- Bulbo de goma.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 mL.
- Embudo.
- Papel filtro
- Balón de vidrio.
- Matraz colector.
- Adaptador trampa para evaporador rotativo.
- Policial.
- Viales 10 mL

➤ **Cristalería y materiales para los bioensayos**

- Micropipetas multicanal y Unicanal (volúmenes variables).
- Platos de cultivos fondo plano de 96 pocillos.
- Puntas de micropipeta 2.0-200 μ L y 1.0-10 mL
- Placas de TLC de aluminio Silica gel, Merck.
- Platos Petri
- Volumétricos de 10,50 mL
- Tubos de ensayo
- Gradilla

- Tubos falcón
- lámparas de luz
- **Cristalería y materiales para fraccionamiento**
- matraz erlenmeyer de 250 mL
- balón de destilación de 250 mL
- Columna de extracción de fase solida
- Cabeza de extracción de fase solida
- Matraz Kitasato de 500 mL
- Parafilm
- Espátula
- Soporte universal
- Anillos

4.2- REACTIVOS QUÍMICOS

4.2.1- Solventes

- Diclorometano
- Cloroformo
- Metanol
- Hexano
- Dimetilsulfóxido
- Etanol absoluto
- Ácido sulfúrico
- Isopropanol
- Agua destilada

4.2.2- Reactivos

- Silica gel, Sigma-Aldrich®
- 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (p-NPG)
- Enzima alfa glucosidasa (32 mU/mL)
- Huevos de Artemias.
- Buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 a pH= 7.0
- DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)
- Reactivo de Folin
- Ácido ascorbico
- Ácido gálico
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Dicromato de potasio

4.3- EQUIPO

4.3.1- Equipo para preparación de extracto crudo

- Evaporador rotatorio, Buchi®
- Balanza analítica, Ohaus ®

4.3.2-Equipo para bioensayos

- Fotómetro de microplacas Multiskan FC, Thermo Scientific™.
- Plato calentador
- Medidor de pH
- Espectrómetro UV-Vis
- Incubadora de laboratorio

- Microestereoscopio
- Vortex
- Sonicador

4.3.3-Equipo para para determinación la composición química

- Sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) 5977B de Agilent.

4.4- METODOLOGÍA

4.4.1-Etapa 1: Obtención y tratamiento de la materia prima.

Las muestras de *Laguncularia racemosa* fueron colectadas en el puerto de Pedregal, provincia de Chiriquí. Se seleccionaron y colectaron hojas adultas y sanas, que fueron guardadas en bolsas plásticas y almacenadas en frío para garantizar su preservación. Posteriormente, previo a la preparación de los extractos crudos, las hojas fueron lavadas con agua, escurridas, secadas y trituradas hasta su pulverización.

4.4.2-Etapa 2: Preparación del extracto crudo.

Para preparar los extractos crudos se utilizó el proceso de maceración, para ello las hojas trituradas fueron sumergidas por 24 horas en disolventes con polaridad crecientes (hexano, diclorometano, metanol) para la extracción de sus principales componentes químicos solubles en los disolventes seleccionados. Posteriormente, se filtró y concentró el disolvente en un rotavapor al vacío hasta sequedad, el extracto seco se colocó en viales. Este procedimiento se repitió continuamente una vez por día, con un mínimo de seis (6) veces por cada disolvente. Para finalizar, los viales fueron puesto a secar hasta que se evaporara por completo el disolvente.

4.4.3-Etapa 3: Elaboración de bioensayos.

En esta etapa se realizaron bioensayos para determinar las capacidades citotóxicas, fitotóxicas, anti-hiperglucemiante, antioxidante, antiparasitaria y la prueba cualitativa para determinación de fenoles totales.

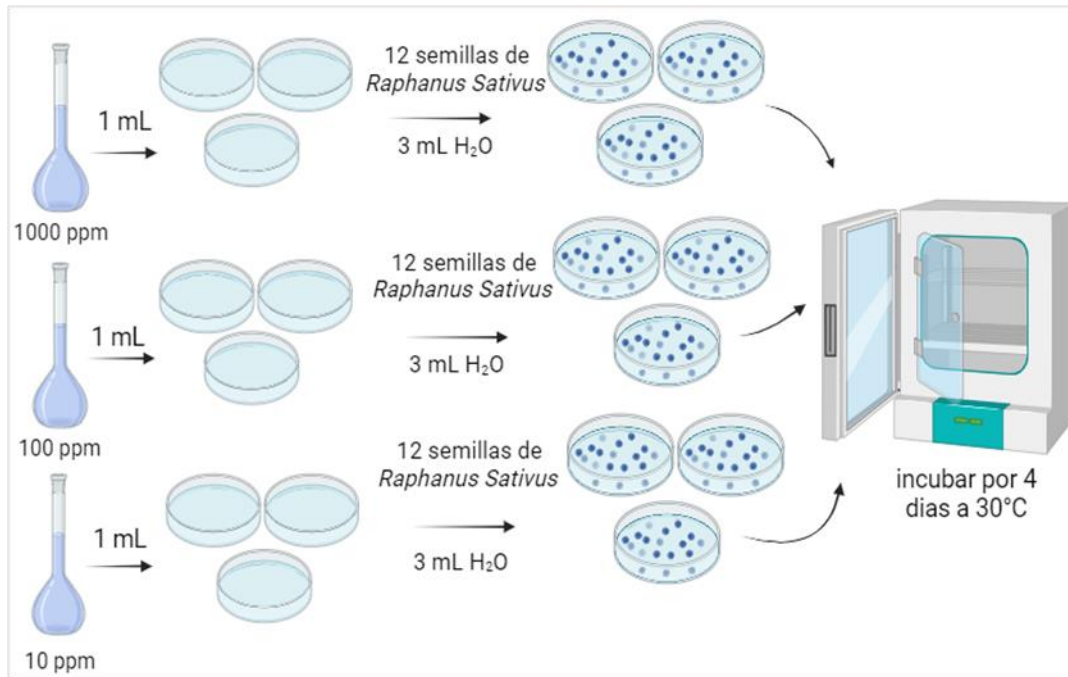
4.4.3.1- Ensayo de fitotoxicidad con *Raphanus sativus*.

El bioensayo de fitotoxicidad se realizó para determinar el grado de toxicidad que podría producir el extracto en una planta, lo cual, se traduce en alteraciones en su aspecto, crecimiento, color, vigor, desarrollo y productividad. (Metroflor, P. 2019). Esta prueba se basa principalmente en el hecho de que existe una relación proporcional entre la reacción tóxica (la respuesta) y la cantidad de sustancia recibida (la dosis) (García, N., et al s/f). Los efectos fitotóxicos pueden ser evaluados con mayor determinación a través de la inhibición de la germinación de las semillas, esto se debe a que en los primeros días del desarrollo de la plántula ocurren etapas de gran sensibilidad (García, N., et al s/f), ya que, ocurren procesos fisiológicos importantes, tales como: la hidratación en donde la semilla absorbe el agua y los nutrientes del medio en el que se encuentra, desencadenando los procesos restantes de crecimiento en los que la presencia de un agente externo puede interferir alterando la supervivencia y crecimiento de la planta.

El modelo de ensayo implementado para analizar el potencial fitotóxico de *Laguncularia racemosa*, sigue pasos muy simples detallados a continuación (Ilustración 10):

- Inicialmente se prepararon soluciones seriadas de 5 mL mínimo a partir de extracto crudo (Hexano, Diclorometano, Metanol) a concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm.
- Se añadieron por triplicado 1 mL de solución de extracto crudo a platos Petri con un papel filtro en el fondo, posteriormente se dejó evaporar el solvente hasta sequedad.
- Se prepararon el control agua (control positivo) y el control de solvente, añadidos por triplicado a platos Petri con el papel filtro, posteriormente se dejó evaporar hasta sequedad.
- Una vez evaporado el solvente, se añadieron doce (12) semillas de *Raphanus sativus* y 3mL de agua destilada a todos los platos. Finalmente, cada plato Petri fue sellado con parafilm e incubado a temperaturas de 30 °C por 4 días.

Ilustración 10: Esquema de ensayo de fitotoxicidad.



Los datos fueron analizados evaluando el promedio de los datos obtenidos, a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición de crecimiento} = \frac{L_{\text{agua}} - L_{\text{extracto}}}{L_{\text{agua}}} \times 100 \%$$

En donde L_{agua} representa el promedio de la medidas de las semillas en agua y L_{extracto} representa el promedio de la medidas de las semillas en extracto a sus respectivas concentraciones.

4.4.3.2- Ensayo de citotoxicidad con *Artemias salinas*.

El modelo de *Artemias salinas* es un ensayo *in vivo* que se utiliza para evaluar la toxicidad de una sustancia química o compuesto en un organismo vivo, en este caso, las larvas de *Artemia salina*, que son crustáceos unicelulares muy sensibles a las sustancias tóxicas. Se debe tener presente que, se trata de un procedimiento que ofrece datos preliminares acerca del potencial tóxico de los extractos vegetales sin especificar mecanismos de acción (Hamidi, M. R., et al, s/f). No obstante, los ensayos de citotoxicidad positivos se consideran como indicadores de posible actividad antitumoral (Diaz., S., 2006), ya que, identificar sustancias que muestren citotoxicidad, podría llevar a investigaciones adicionales sobre su potencial impacto en las células cancerosas (Mongelli, E., et al ,1996).

El protocolo empleado fue tomado de (Sam, T. W., 2008) y adaptado siguiendo el siguiente procedimiento (Ilustración 11): Se inició incubando 140 mg de huevos de *Artemias salinas* en 1 L de solución salina con pH:7-8, luz directa y una bomba de oxígeno a 24°C por 48 horas, hasta su eclosión. Se prepararon soluciones acuosas de 1000, 100,10 ppm de cada extracto a las que, de ser necesario, se le añadió un máximo del 7% de DMSO para ayudar a diluir los extractos. Adicional a esto, se preparó 1 mL de dicromato de sodio a 0.1 mg/mL como control positivo y 1 mL de solución salina como control negativo. Eclosionados los huevos, por triplicado, se añadió a un plato de 96 pocillos 10 *Artemias* por pocillo, junto con 100 µL por concentración de solución de extracto combinado con 100 µL de solución salina. Para el control negativo, se añadió la misma cantidad de *Artemias* en 200 µL de solución salina, mientras que para el control positivo se añadieron a 100 µL de dicromato de sodio y 100 µL de solución salina. Posteriormente, se dejó incubado únicamente con luz directa (usando una lámpara) por 24 horas. Transcurrido este periodo

de incubación, se examinaron en un estereomicroscopio la cantidad de nauplios muertos en cada pocillo, los datos obtenidos se analizaron según el método estadístico de Reed-Muench.

Ilustración 11: Esquema de ensayo de citotoxicidad



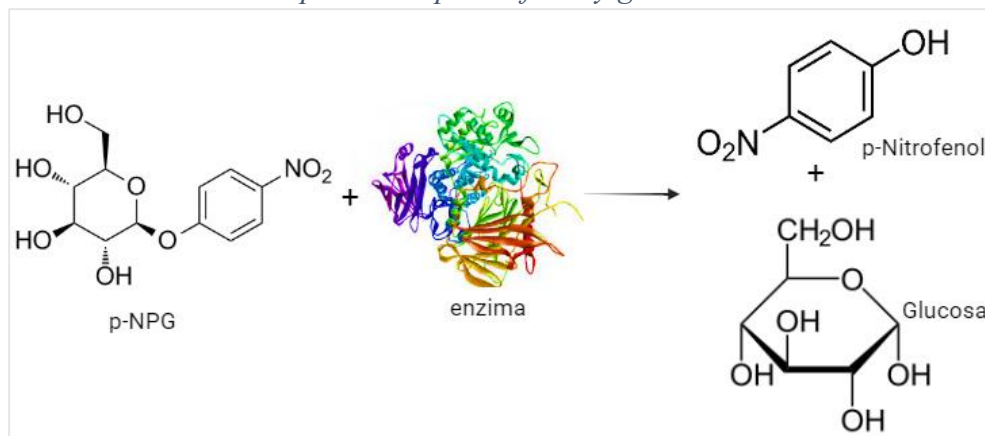
4.4.3.3-Ensayo inhibidor de la enzima alfa-glucosidasa.

La α -glucosidasa es una exoenzima codificada por el gen GAA y se encuentra en dos isoformas en el organismo humano, EC 3.2.1.3 y EC 3.2.1.20. Se localiza específicamente en la superficie interna de las microvellosidades de las células del epitelio intestinal del intestino delgado (Tsunoda, Y., et al., 2002). Su función principal es hidrolizar los enlaces α -1,4 y 1,6 de oligo y disacáridos presentes en los alimentos, liberando unidades de α -D-glucosa como producto de su acción (Moreland et al., 2012; Zeng et al., 2012). Posteriormente, la α -glucosa es absorbida por las células intestinales y liberada al torrente sanguíneo para ser utilizada como fuente de energía. Cuando este proceso no se lleva a cabo correctamente, se produce hiperglucemia postprandial, es decir, niveles elevados de azúcar en la sangre después de comer.

Todo lo mencionado anteriormente convierte a la enzima α -glucosidasa en un objetivo terapéutico de gran interés para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Actualmente, existen agentes inhibidores de α -glucosidasa (AGI) que controlan eficazmente la hiperglucemia posprandial al retrasar la descomposición de los carbohidratos α -D-glucosa, lo que reduce el aumento de los niveles de glucosa en sangre después de las comidas (Hossain, U., et al., 2020).

Los modelos *in vivo* de ensayos inhibidores de la enzima α -glucosidasa (α -GLC) permiten analizar el efecto anti-hipoglucemiante. En el laboratorio, se utilizó un método *in vitro* que implica una reacción de hidrólisis enzimática entre p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido (p-NPG) y la α -GLC. Esta reacción produce glucosa y nitrofenol (ilustración 12), siendo el nitrofenol un compuesto de color amarillo y absorbente a 415 nm. Por lo tanto, a mayor inhibición de la enzima, menor será la cantidad de p-nitrofenol presente y menos intenso será el color amarillo observado (Ortiz, A., et al., 2013).

Ilustración 12: Reacción de la enzima con el p-NPG y los productos p-nitrofenol y glucosa.



El protocolo seguido para el ensayo fue tomado de (Lankatillake, et al, 2021) y modificado, dando como resultado la siguiente metodología (Ilustración 13):

✓ **Preparación de las muestras y controles:**

Se preparó 320 μL por concentración de las muestra a analizar diluidas en DMSO y EtOH (por separado), como control positivo se utilizó acarbosa, como control negativo, el disolvente y como blanco, agua destilada.

-Control negativo: 20 μL de disolvente y 150 μL de enzima.

- Blanco: 20 μL de agua destilada y 150 μL de buffer.

-Muestra: 20 μL de muestra y 150 μL de enzima.

-Control color: 20 μL de muestra y 150 μL de buffer

• **Preparación del ensayo inhibitorio de la enzima alfa glucosidasa:**

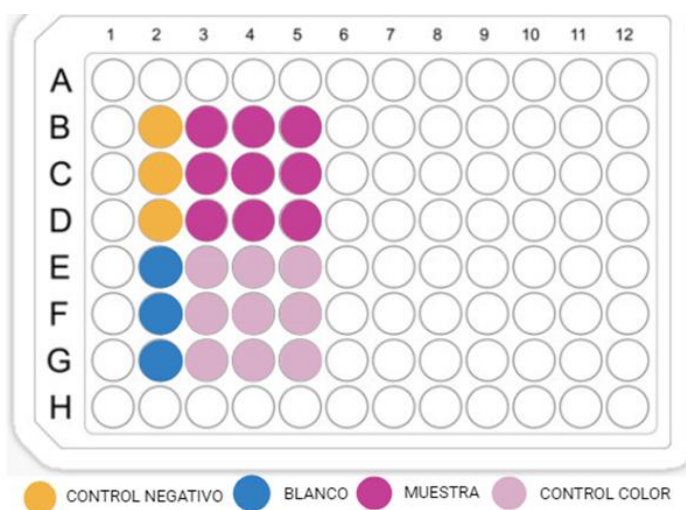
En un plato de 96 pocillos se añadió por triplicado los 20 μL de la muestra, disolvente y agua destilada, seguidamente se les añadió 150 μL de solución Buffer de fosfato (PBS) a pH: 7.0 a 0.1 M. únicamente a los blancos y control color. Mientras que, a la muestras y al control negativo se le añadió 20 μL de enzima (preparada anteriormente añadiendo 32 mU/mL en solución buffer a

100 mM), Inmediatamente acabado este paso, se incubó la placa por 7 minutos a 37° en el espectrofotómetro para microplacas Multiskan FC, previamente seteado. Al terminar el tiempo requerido, se añadió p-NPG en todos los pocillos y nuevamente se incubaron por 20 minutos a 37°C. El porcentaje de inhibición de las muestras se calculó a partir de los datos de absorbancia proporcionados por el equipo y analizados a partir de la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{\Delta A_{muestras} - \Delta A_{control\ color}}{\Delta A_{control\ negativo} - \Delta A_{blanco}}$$

Donde $\Delta A_{muestra,control\ color,control\ negativo,blanco} = A_{final} - A_{inicial}$, tomando en cuenta que el equipo realiza dos lecturas al inicio de los 20 minutos y al finalizarlos.

Ilustración 13: Secuncia de soluciones para ensayo de α -GLC



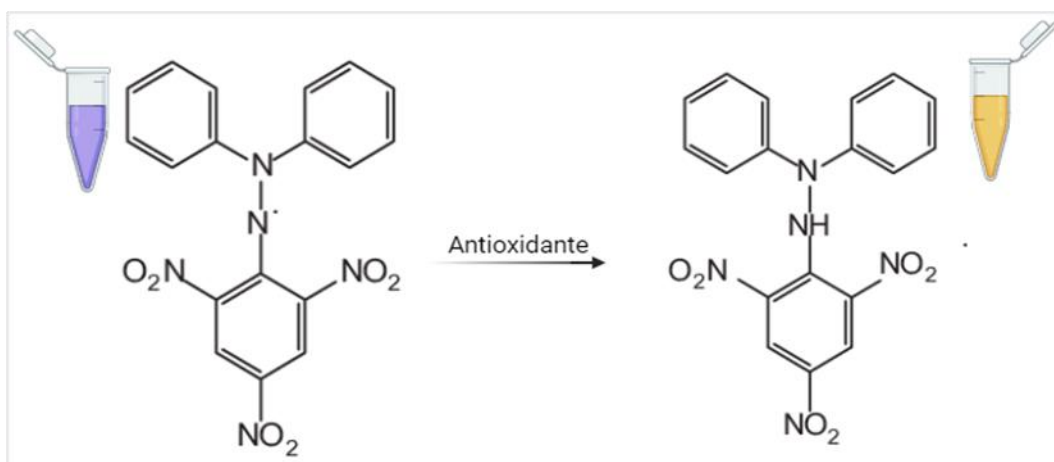
- **Determinación de la CI_{50}**

Se realizaron diluciones seriadas partiendo de una concentración máxima de 900, 350, 200 μ L para los extractos crudos de hexano, 300, 150, 75, 1 μ g/mL diclorometano y 200, 100, 10, 1 μ g/mL para los extractos de metanol respectivamente y con los datos obtenidos se empleó un análisis de regresión.

4.4.3.4-Ensayo de actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de un compuesto se puede determinar a través de muchos métodos, uno de los más implementadas es el método que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), de color violeta que absorbe a 517 nm. Este radical normalmente acepta los electrones de otra sustancia, convirtiéndolo en un agente oxidante, sin embargo, cuando se mezcla con una sustancia antioxidante es capaz de donar un H^+ , el radical se reduce y pierde su color violeta, tomando coloraciones amarillas. Ilustración 14

Ilustración 14: Cambio de color de la reducción de DPPH A DPPH2 en presencia de una antioxidante.

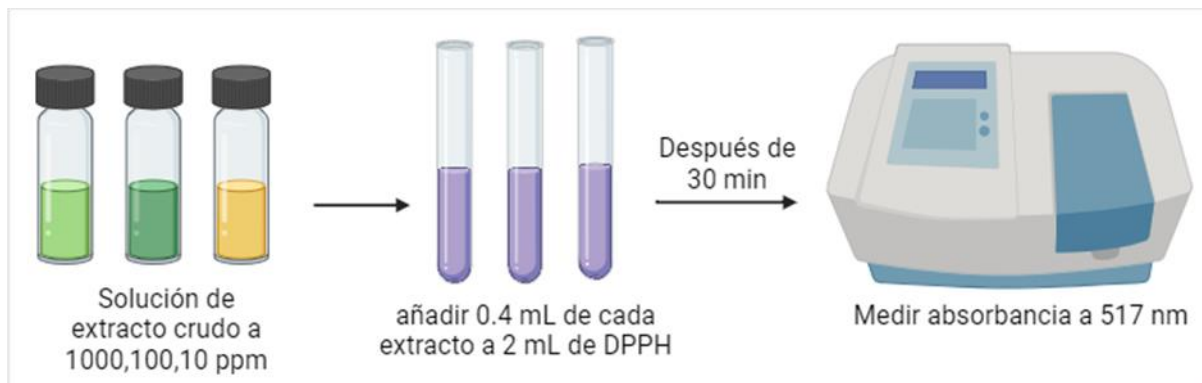


Bajo cualquier método la actividad antioxidante se puede comprobar cuando el daño oxidativo que puede causar un agente oxidante es reducido por la presencia o acción de un antioxidante (Fernández, P., et al, 2006). Sin embargo, la facilidad, rapidez, costos y reproducibilidad que ofrece este método es destacable.

La actividad antioxidante de los extractos crudos se evaluó de acuerdo con el protocolo establecido en el laboratorio (ilustración 15). Se prepararon 5 mL de soluciones de extracto crudo a 1000, 500, 50 $\mu\text{g/mL}$ diluidas en MeOH, junto con una solución de 25 mL de DPPH a 0.1 mg/mL en MeOH. Adicional a esto se preparó una solución de 5 mL de ácido ascórbico como control positivo.

El ensayo se realizó por triplicado, empleando un blanco (0.4 mL de muestra y 2 mL de MeOH), el control de DPPH (2mL de DppH y 0.4 mL MeOH), la Muestra (2 mL DppH y 0.4 mL de muestra). Las muestras se agregan en tubos de ensayos y al añadir el DPPH se dejó reposar por 20 minutos, pasado el tiempo se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a 517 nm.

Ilustración 15: Esquema de ensayo de determinación de actividad antioxidante.



La actividad antioxidante se calculó a partir de los datos de absorbancia obtenidos a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{DPPH} - A_{muestra}}{A_{DPPH}} \times 100 \%$$

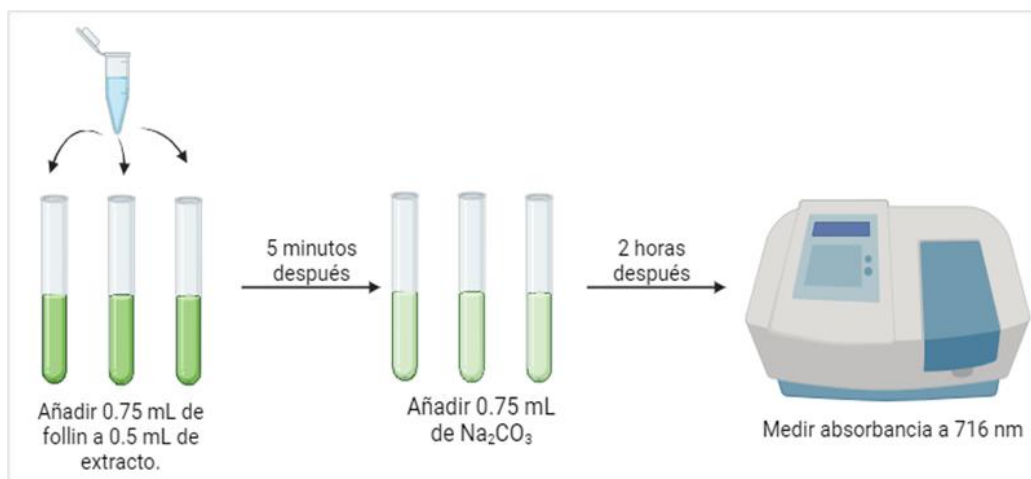
4.4.3.5-Determinación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu.

El método de Follin-Ciocalteu es una prueba de determinación y cuantificación de fenoles totales. Este ensayo se basa en la reacción en medio básico de los fenoles contenidos en la muestra con el reactivo de Follin, el cual está formado por molibdato y tungstato sódico formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, G.L., 1979). El medio básico propicia la formación de óxidos de color azul, siendo proporcional la intensidad del color a la cantidad de fenoles presentes (Marina, D. et al, 2023).

El ensayo de Follin-Ciocalteu se realizó como prueba cualitativa para determinar la presencia de fenoles en los extractos de *Laguncularia racemosa*, siguiendo la metodología establecida en el laboratorio (Ilustración 16), que incluye los siguientes pasos:

- Se inició preparando 20 mL de Follin a 1N, 15 mL por extracto crudo a concentraciones de 1000, 500, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en MeOH y 20 mL de Na_2CO_3 al 20%.
- Posteriormente, se añadieron por triplicado 0.75 mL de reactivo de Follin 1 N y 0.5 mL de muestra en tubos de ensayo, pasado 5 minutos se añadió 0.75 mL de Na_2CO_3 y se dejó reposar la solución por 2 horas y posteriormente se midió la absorbancia a 716 nm.

Ilustración 16: Esquema de prueba de fenoles totales



4.4.3.4-Determinación de actividad antiparasitaria contra *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donovani*.

Los parásitos son organismos que tienen una relación biológica con otro organismo, actuando como huéspedes y causándoles daño y enfermedad que afecta su salud. Existen numerosos tipos de parásitos que actúan de diferentes maneras en el organismo. En este proyecto, se evaluó la actividad antiparasitaria utilizando dos parásitos:

- *Plasmodium falciparum*: es el parásito responsable de la enfermedad conocida como malaria, que se transmite a través de la picadura de mosquitos hembra del género Anopheles, infectados. Los síntomas de la malaria incluyen fiebre, escalofríos y dolor de cabeza. Los tratamientos actuales se basan en combinaciones de medicamentos que incluyen artemisinina, un compuesto derivado de una planta (Maier, A.G., et al., 2019).
- *Leishmania donovani*: es un parásito transmitido por la picadura de mosquitos de la familia Phlebotominae y es responsable de la leishmaniasis, una enfermedad que puede manifestarse en forma cutánea (con presencia de úlceras en la piel que pueden persistir durante años) o visceral (afectando órganos internos). La leishmaniasis visceral tiene una alta tasa de mortalidad y se utiliza anfotericina B liposomal o miltefosina como tratamiento, mientras que para la forma cutánea se aplican tratamientos tópicos y sistémicos (McGwire, B. S., et al., 2014; Monge-Maillo, B., et al., 2015).

La actividad antiparasitaria de los extractos de *L. racemosa* se evaluó a una concentración de 10 µg/mL, siguiendo la metodología establecida por el ICBG Panamá, en los laboratorios del Centro de Biología Celular y Molecular de Enfermedades de INDICASAT AIP, a los cuales se les proporcionó las soluciones a la concentración mencionada.

4.4.4- CARACTERIZACIÓN

4.4.4.1- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Para la identificación de los compuestos de bajo peso molecular, las muestras apolares (ML-LR-HEX, ML-LR-DCM) se analizaron mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en equipo GC/MS Agilent Serie 5977B.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1- Preparación de extractos crudos

Para preparar los extractos se partió de 1.16 kilogramos de la hojas de la especie *Laguncularia racemosa*, que fueron trituradas para su extracción, en la Tabla 4 se detallan las cantidades obtenidas de cada extracto.

Tabla 4: Masa de extractos crudos de L. racemosa obtenidos por maceración con hexano, diclorometano, metanol.

Disolvente	No. Total, de extracciones	No. de vial	Masa (g)
ML-LR-HEX	6	A1	6.4949
		A2	7.1805
		A3	1.924
Peso total de extracto crudo de hexano			15.59
ML-LR-DCM	6	B1	7.0536
		B2	7.9419
		B3	2.7212
		B4	1.7154
Peso total de extracto de diclorometano			19.4321
ML-LR-MeOH	6	C1	7.8091
		C2	5.0041
		C3	8.1231
		C4	2.9077
		C5	3.4002
Peso total de extracto de metanol			27.2442

Ilustración 17: Maceración para obtención de extractos crudos de L. racemosa: 1) Materia prima triturada, 2) materia prima sumergida en disolvente. 3) concentración en rotavapor.



5.2-Ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Raphanus sativus*

Los resultados del ensayo de fitotoxicidad se analizaron utilizando ciertos parámetros establecidos previamente en nuestro laboratorio, donde se consideró que la actividad es baja cuando está en el rango de 0-39% de Inhibición, moderada en el rango de 40-59 % de inhibición, buena en el rango de 60-69% de inhibición y significativa cuando es mayor a 70 % de inhibición. Según esta métrica, se observaron actividades moderadas de toxicidad en los extractos crudos de diclorometano, los cuales inhibieron el crecimiento de las semillas en un 40 % a una concentración de 1000 ppm. Por otro lado, los extractos de hexano y metanol mostraron actividades bajas a la misma concentración, logrando inhibir solo un 21 % y 22 % del crecimiento, respectivamente. Los valores obtenidos a concentraciones de 100 y 10 ppm se encuentran en la Tabla 5, donde se observa un aumento en el crecimiento a medida que disminuye la concentración de los extractos. Estos resultados se pueden visualizar de manera más clara en la ilustración 18.

Tabla 5: Resultados de ensayo de fitotoxicidad de extracto crudo de L. racemosa contra semillas de rabano.

Extracto	Hexano			Diclorometano			Metanol		
	Concentración (ppm)	1000	100	10	1000	100	10	1000	100
Medida promedio (cm)	4.65	5.06	5.50	4.34	5.88	6.38	4.64	5.03	6.14
Medida promedio de control agua (cm)	5.93			7.23			5.93		
% de inhibición de crecimiento	21	15	7	40	19	12	22	15	-4

Ilustración 18: Gráfico de crecimiento de semillas en función de la concentración ppm de los extractos crudos de *L. racemosa* en comparación con el control agua.

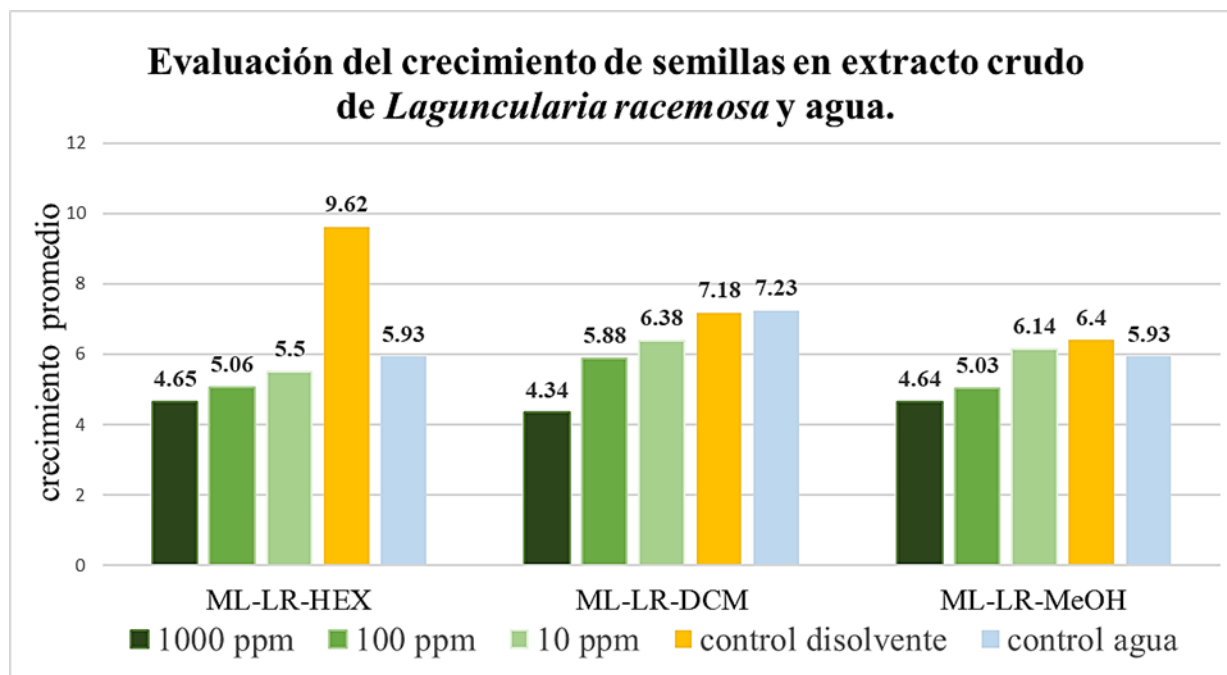
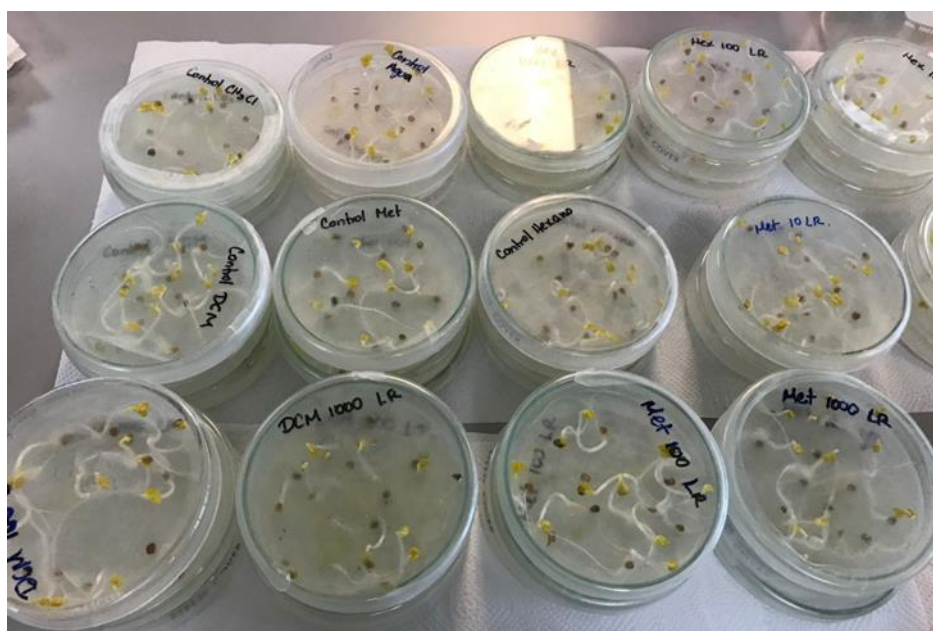


Ilustración 19: Semillas de rabano germinadas para evaluación de actividades fitotóxica.



En la literatura no se cuenta con trabajos publicados sobre la actividad fitotóxica de *Laguncularia racemosa* en extractos apolares. Sin embargo, se pueden encontrar reportes para otras especies de mangle como *Conocarpus lancifolius* sobre todo para extractos de diclorometano y metanol

(Saadullah, M., et al, 2016), así como para extractos acuosos de *Conocarpus erectus* (Alsharekh, A., et al, 2022), especies pertenecientes a la familia *Combretaceae*; en ambas plantas esta actividad se reporta que la actividad se debe a los compuestos fenólicos. Es probable que este mismo tipo de compuestos también este presente en *Laguncularia racemosa* (ya que pertenecen a la misma familia), sin embargo, hay que tomar en cuenta que algunos factores como las condiciones ambientales de crecimiento de la planta, el procesamiento de las semillas utilizadas, la región de estudio y la variación entre especies sean factores que pueden influir en el nivel de toxicidad que se presente.

5.3-Ensayo de citotoxicidad con *Artemia salinas*

Los resultados del ensayo de citotoxicidad con *Artemia salina* fueron evaluados por el método de Reed-Muench. Los datos de un primer ensayo nos indican niveles altos de toxicidad en el extracto crudo de diclorometano, al alcanzar un 77 % de mortalidad a una concentración máxima de 1000 ppm, mientras que para los extractos crudos de hexano y metanol la actividad no fue significativa, ya que, a la misma concentración solo se logró alcanzar un 42 % y 33 % de mortalidad respectivamente (Tabla 6). No obstante, un segundo ensayo realizado únicamente para el extracto crudo total de *Laguncularia racemosa* presentó un 83 % de mortalidad a la concentraciones máxima de 1000 ppm (Tabla 7).

Ilustración 20: Visualización de Artemias salinas en placa de 96 pocillos por medio de un estereomicroscopio.

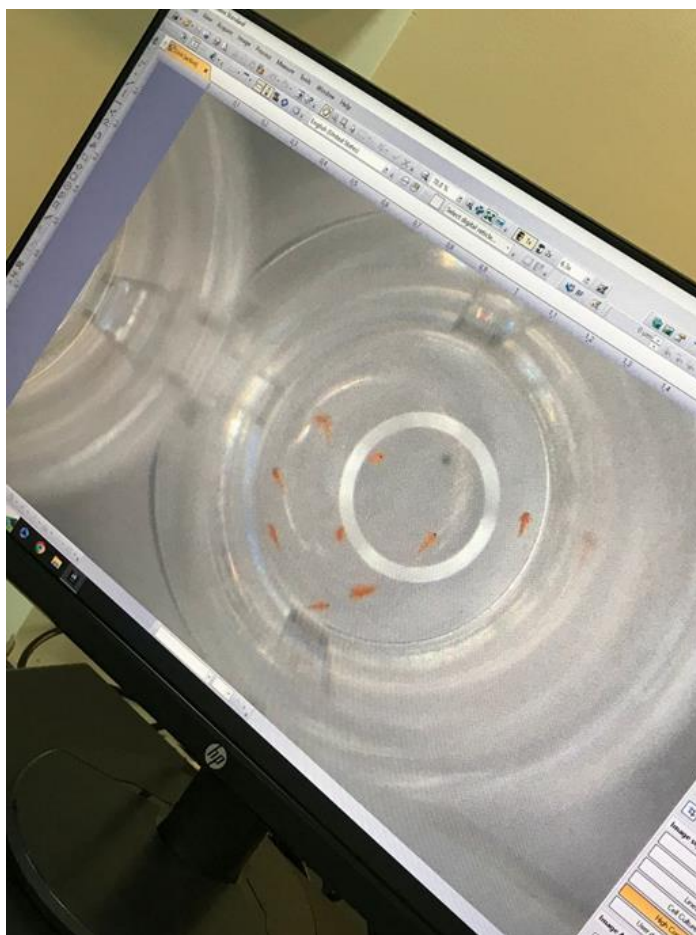


Tabla 6: Resultados de los extractos crudo de L. racemosa en ensayo de citotoxicidad.

Extracto	ML-LR-HEX			ML-LR-DCM			ML-LR-MeOH		
Concentración (ppm)	1000	100	10	1000	100	10	1000	100	10
Log de concentración	3	2	1	3	2	1	3	2	1
Total, de organismos	10								
Vivas en control positivo	0								
Vivas en control negativo	10								
Promedio de vivas	7	9	9	3	8	9	8	9	9
Promedio de muertas	3	1	1	7	2	1	2	1	1
Muertas acumuladas	5	2	1	10	3	1	4	2	1
Vivas acumuladas	7	16	24	3	11	20	8	17	18
% de mortalidad	42	11	5	77	21	5	33	11	5

Tabla 7: Resultados de segunda evaluación de citotoxicidad a los extractos de diclorometano.

Extracto	ML-LR-DCM		
Concentración (ppm)	1000	100	10
Log de concentración	3	2	1
Total, de organismos	10		
Vivas en control positivo	10		
Vivas en control negativo	0		
Promedio de vivas	2	8	10
Promedio de muertas	8	2	0
Muertas acumuladas	10	2	0
Vivas acumuladas	2	10	18
% de mortalidad	83	17	0

De manera adicional, analizando el punto de encuentro en los gráficos de muerto y vivos acumulados *versus* el logaritmo de concentración se pudo obtener que para el extracto crudo de

diclorometano se presentaba CI_{50} de 323 ppm en un primer análisis y para el segundo análisis una CI_{50} de 316 ppm (ilustración 21 y 22) valores muy similares. Es importante mencionar que previamente se han realizado algunas evaluaciones sobre el potencial citotóxico de la especie *Laguncularia racemosa* a 1000, 500, 250 y 125 ppm en donde no se encontró actividad citotóxica (Martínez-Luis, S. et al , 2017). Sin embargo, el contenido metabólico de la especie recolectada en la región de Chiriquí puede contener mayor variabilidad metabólica (triterpenos o polifenoles) responsables de esta actividad en niveles moderados que presenta el mangle blanco.

Ilustración 21: Grafico de IC_{50} de la primera evaluación de extracto de diclorometano

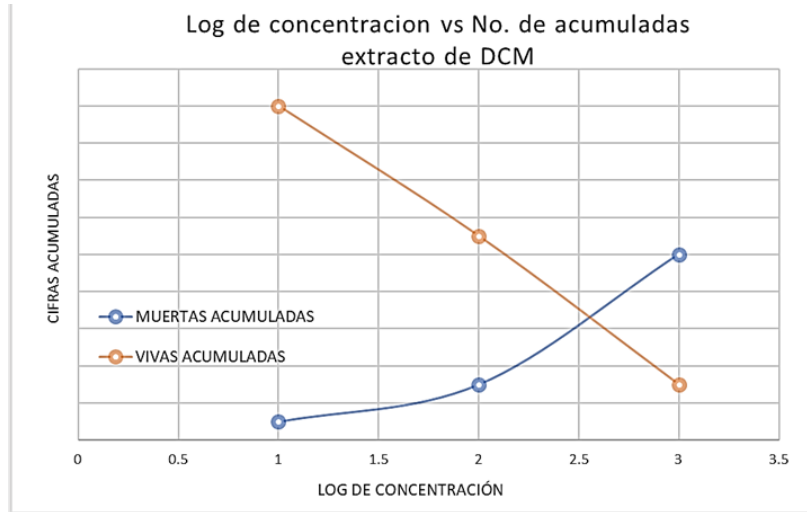
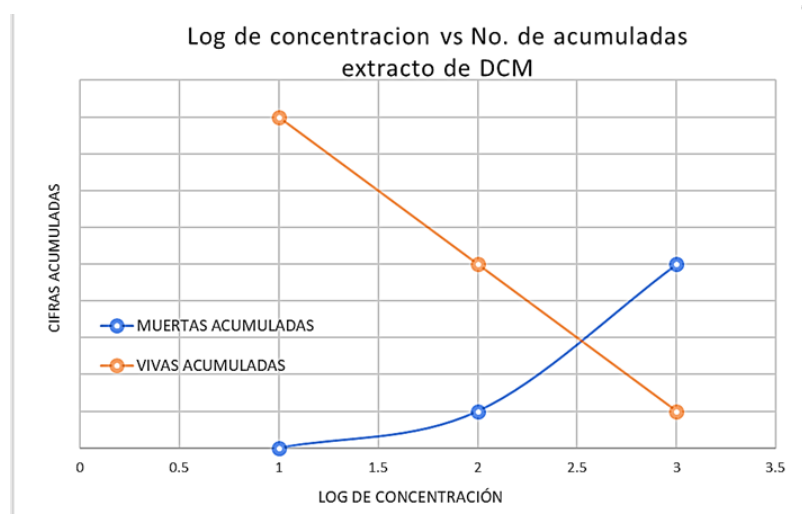


Ilustración 22: Grafico de IC_{50} de la segunda evaluación de extracto de diclorometano



5.4- Ensayo de inhibición de enzima alfa-glucosidasa

Los extractos de *Laguncularia racemosa* fueron evaluados a diferentes concentraciones para sortear aspectos como solubilidad, turbidez, coloración, que podían afectar a los resultados del ensayo, por lo que se tomaron concentraciones en las que dichas condiciones fueran las más optimas posibles. Para un primer análisis se obtuvieron altos niveles de inhibición de enzima alfa glucosidasa con porcentajes de inhibición >70 % en todos los extractos, tanto en DMSO, como en EtOH usados como disolventes, así como también para el agua que fue utilizada únicamente para los extractos de metanol (tabla 8).

Tabla 8: Resultados de screening de ensayo inhibidor de enzima alfa glucosidasa.

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (MG/ML)	% DE ACTIVIDAD POR DISOLVENTE		
		DMSO	EtOH	H ₂ O
ML-LR-HX	900	90.3	100	*
ML-LR-DCM	300	73.9	96.3	*
ML-LR-MEOH	100	99.2	95.9	80.00

*= no evaluado

A partir de estos datos previos se seleccionó a los disolventes que presentaron mayor solubilidad, menor turbidez y coloración para la evaluación de la CI_{50} a través de una curva de calibración realizada para cada uno de los extractos, obteniendo valores de inhibición >80 % para los tres extractos (Tabla 9) y valores de CI_{50} de 156 $\mu\text{g/mL}$ para extracto de HEX en DMSO (Figura 24A), 28.10 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de DCM en EtOH (Figura 24B), 10 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de MeOH en DMSO (Figura 24C). Estos datos preliminares nos indican que los extractos de DCM y MeOH

tienen una mayor potencia en su capacidad para reducir la enzima debido a sus bajas concentraciones para alcanzar una inhibición del 50 %. En la literatura ya existen reportes que corroboran nuestros hallazgos sobre la actividad de anti-hiperglucemiante de *Laguncularia racemosa* a través de la inhibición de la enzima alfa glucosidasa (Martínez-Luis, et al, 2018), así como también, ensayos con ratas utilizando extractos metanólicos que presentan actividad *in vivo* (Bokani, M. , 2021); Todos estos resultados indican que *Laguncularia racemosa* posee gran potencial como planta antidiabética.

Ilustración 23: Placas de 96 pocillos con ensayo inhibidor de enzima alfa glucosidasa, A) Hx , B) DCM , C) MeOH

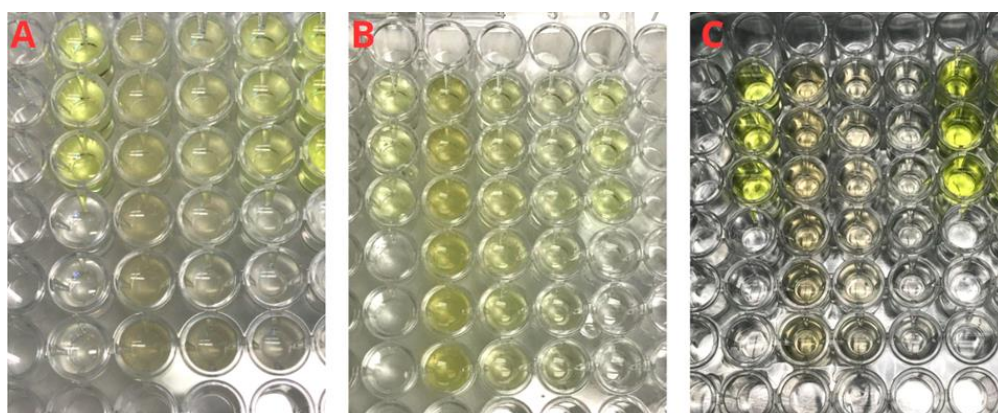
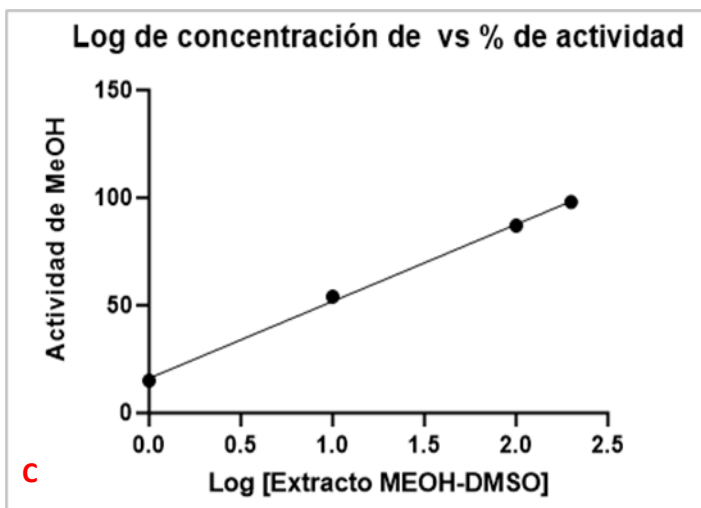
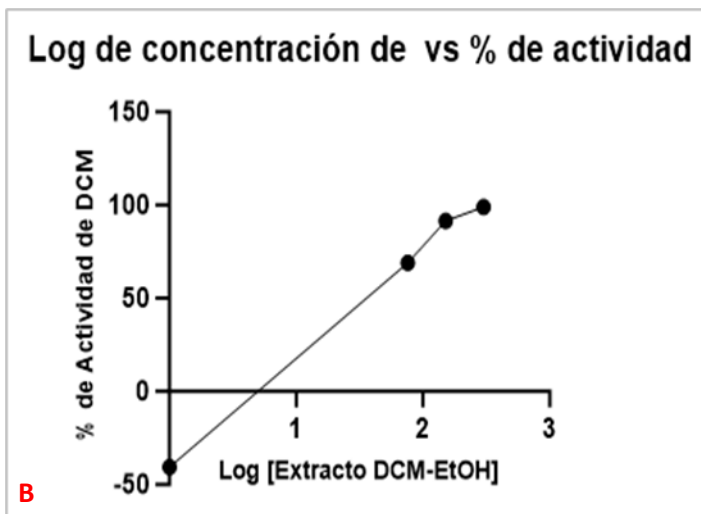
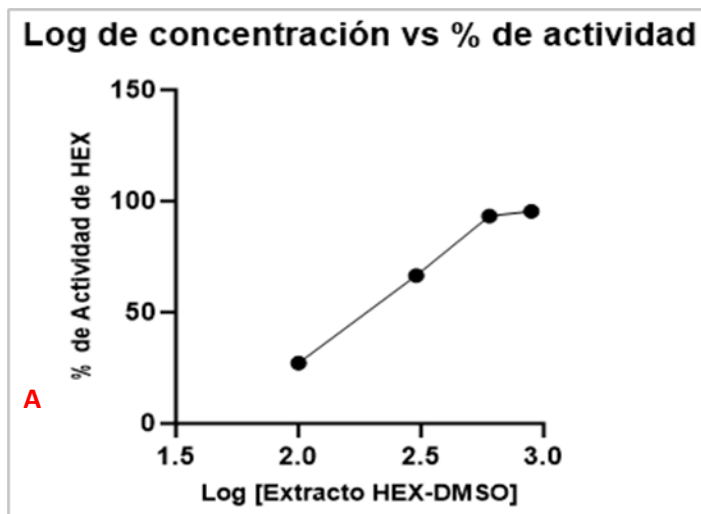


Tabla 9: Porcentaje de actividad inhibidora de los extractos crudos de *L.racemosa* y controles.

Muestra	Concentración (µg/mL)	% de actividad por disolvente		CI 50 (µg/mL)
		DMSO	EtOH	
ML-LR-HX	900	95	-	156
	600	93	-	
	300	66	-	
	100	27	-	
ML-LR-DCM	300	-	100	28.10
	150	-	91	
	75	-	69	
	1	-	-40	
ML-LR-MeOH	200	98	-	10
	100	87	-	
	10	54	-	
	1	15	-	

Ilustración 24: Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos de A) Hex , B) DCM , C) MeOH sobre la enzima alfa glucosidasa.



5.5-Ensayo de actividad antioxidante

En un ensayo inicial a 1000 $\mu\text{g/mL}$, los extractos de MeOH y DCM de *Laguncularia racemosa* presentaron una potente actividad antioxidante al mostrar un porcentaje de inhibición del DPPH mayor al 90 % a la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el extracto de hexano mostro una baja actividad, ya que solo presentó un valor <50 % (Tabla 10).

Tabla 10: Resultados de screening de actividad antioxidante de los extractos de L. racemosa por el método radical libre DPPH.

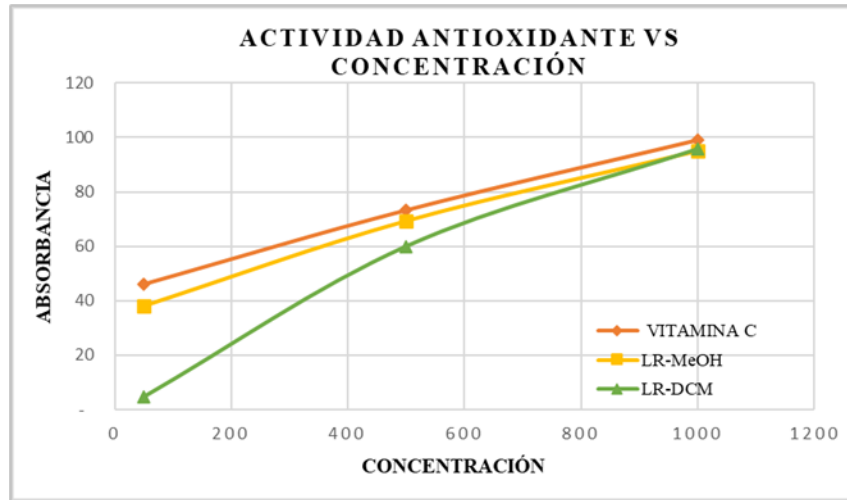
Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia promedio	% de actividad
ML-LR-HEX	1000	3.5880	33
ML-LR-DCM		0.1010	96
ML-LR-MeOH		0.1030	98
DPPH	0.1	2.4040	-

Para corroborar los datos se realizó una segunda evaluación donde los extractos activos alcanzaron una actividad antioxidante de 96, 60 y 5 % y una CI_{50} de 480 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos de DCM y 95, 69.38% y una CI_{50} de 222 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos de MeOH a concentraciones de 1000, 500 y 50 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 11). Estos resultados muestran que el extracto crudo del mangle blanco presenta una actividad alta similar a la del ácido ascórbico (control positivo) que alcanza un 100% de inhibición del DPPH (Figura 25).

Tabla 11: Resultados de segunda evaluación de actividad antioxidante e CI_{50} de extractos de L. racemosa y vitamina C.

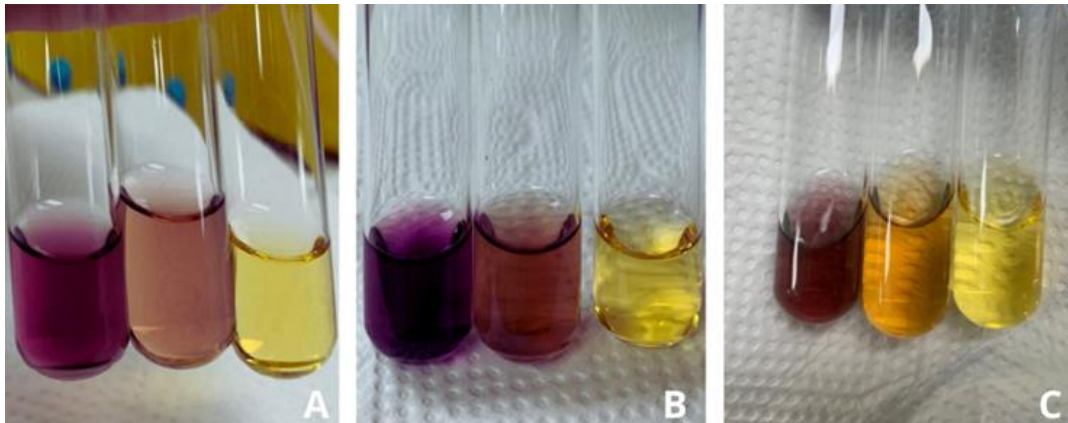
Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia promedio	% de actividad	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
ML-LR-DCM	1000	0.1067	96	480
	500	0.987	60	
	50	2.350	5	
ML-LR-MeOH	1000	0.1175	95	222
	500	0.753	69	
	50	1.523	38	
DPPH	0.1	2.465	0	

Ilustración 25: Evaluación de actividad antioxidante a diferentes concentraciones de los extractos de *L. racemosa* y vitamina C.



Como se puede observar en la Ilustración 26, la actividad antioxidante se puede visualizar a medida que se pierde el color morado del DPPH y toma una coloración amarilla.

Ilustración 26: Perdida de color del DPPH a medida que aumenta la concentración (50,500,1000) de extracto y vitamina C: A) MeOH, B) DCM, C) vitamina C



En la literatura existen reportes que señalan que los extractos etanólico (Cruz, S., et al 2019) y acuoso (Do Nascimento Santos, D. et al, 2021) de las hojas de *L. racemosa* contiene una gran cantidad de compuestos del tipo de los fenoles y los triterpenos, los cuales le otorgan la actividad antioxidante, esta información corrobora nuestros resultados e incrementa el uso potencial como antioxidante de esta planta.

5.6-Determinación de fenoles totales por método de Follin-Ciocalteu

La determinación de fenoles totales se realizó por el método de Follin-Ciocalteu de forma cualitativa. Este método permite la determinación de la presencia de fenoles totales en los extractos de *Laguncularia racemosa*, de manera complementaria al ensayo de actividad antioxidantes. Los resultados visuales del ensayo nos permitieron determinar que los extractos de *L. racemosa* en DCM y MeOH contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos, debido a la presencia de un color azul que se volvía más intenso a medida que aumentaba la concentración (Ilustración 27). Esto se pudo corroborar espectrofotométricamente al obtener absorbancias elevadas a concentraciones máximas de 1000 $\mu\text{g/mL}$, las cuales fueron disminuyendo hasta la concentración mínima de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 12). Al comparar nuestros resultados con los del ácido gálico (control positivo) se observa un comportamiento muy similar, lo que es indicativo de la alta concentración de compuestos fenólicos en los extractos analizados (Ilustración 28).

*Ilustración 27: Visualización de la coloración azul intensa en los extractos *L. racemosa* a diferentes concentración. A) DCM, B) MeOH a 100, 500, 50 $\mu\text{g/mL}$*

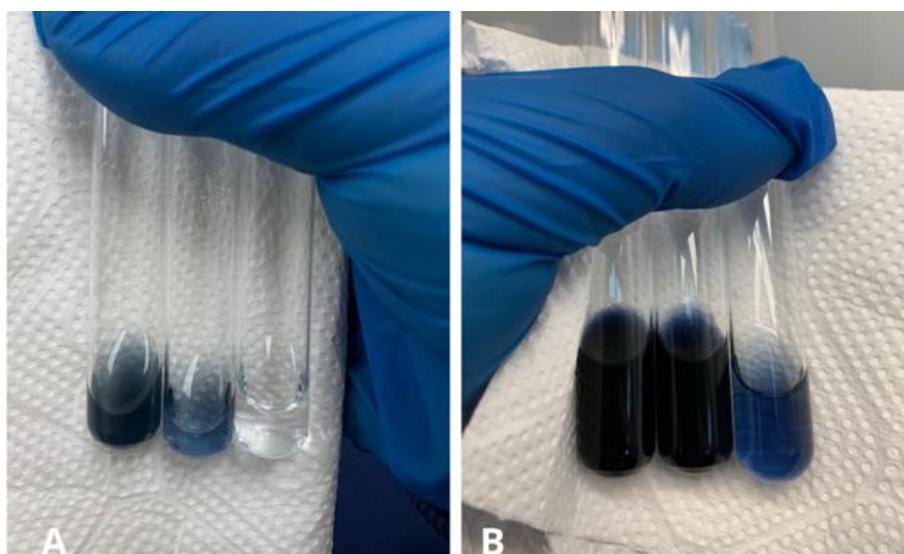
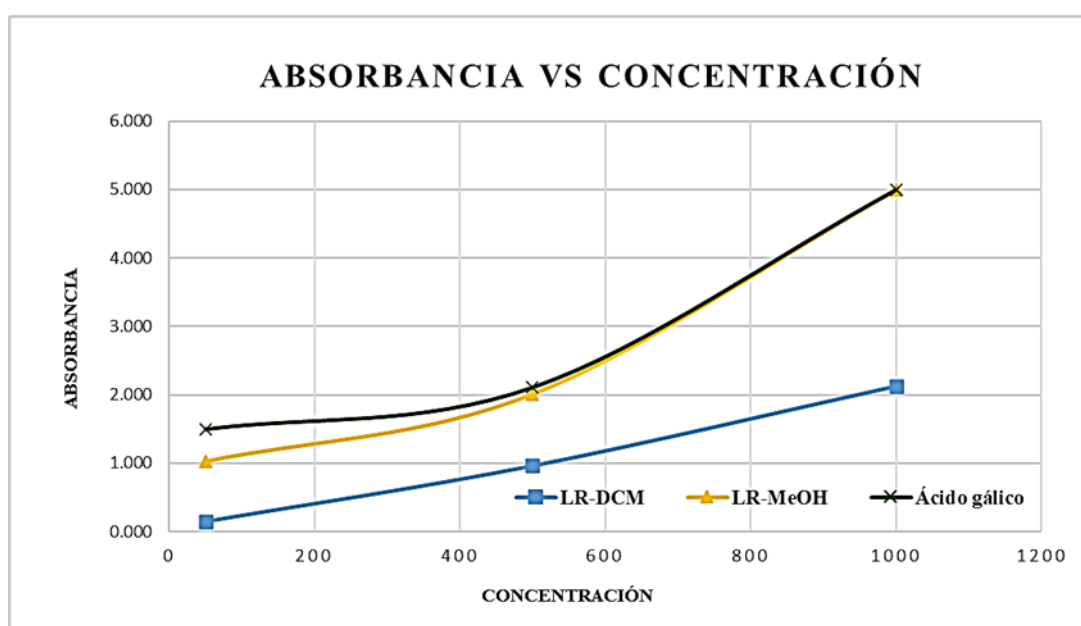


Tabla 12: Datos de absorbancia obtenidos espectrofotométricamente de extractos de L. racemosa y ácido gálico.

Concentración	Absorbancia de las muestras		
	ML-LR-DCM	ML-LR-MeOH	Ácido gálico
1000	2.123	5.000	5.000
500	0.962	2.011	2.039
50	0.149	1.025	1.513

Ilustración 28: Evaluación de contenido de fenoles totales en los extractos L. racemosa a través de la absorbancia vs concentración.



Algunos reportes de la literatura destacan la presencia abundante de taninos (compuestos polifenólicos) en *Laguncularia racemosa* (Yahaya, M, et al, 2018), su cantidad estuvo muy por encima de otros compuestos como los flavonoides o alcaloides. Este hecho coincide con la determinación de fenoles totales en las muestras de extracto en DCM y MeOH, que poseen una coloración azul intensa y que correlaciona con la actividad antioxidante mostrada por los mismos extractos.

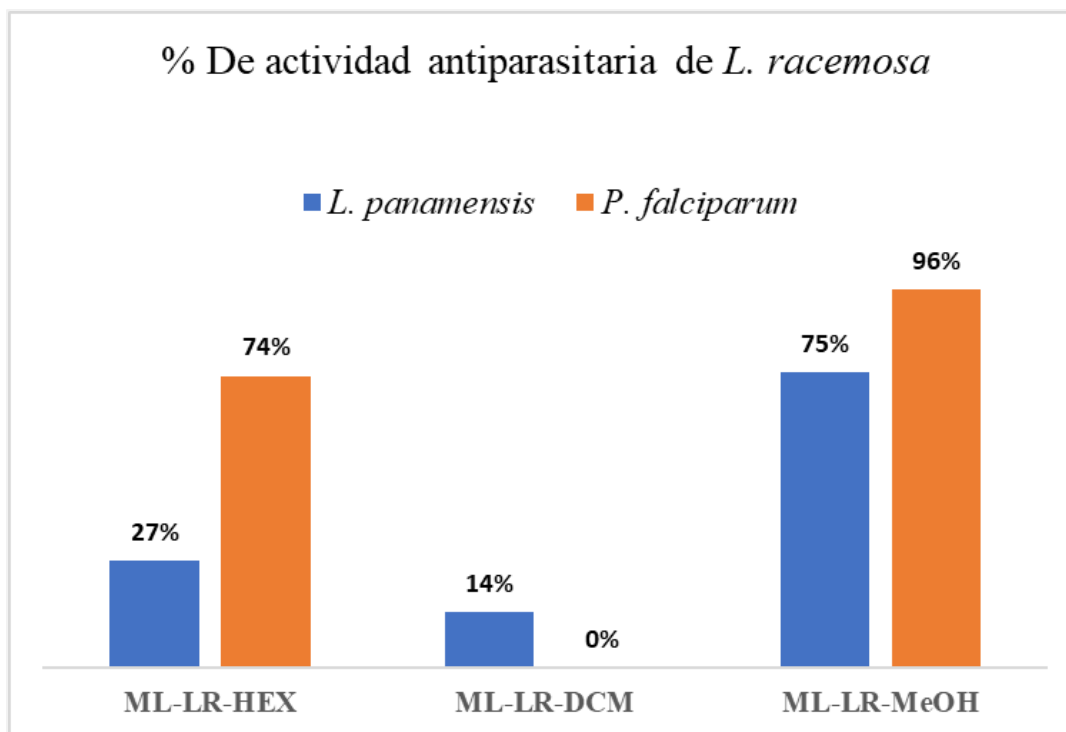
5.7-Determinación de actividad antiparasitaria contra *Leshmania donovani* y *Plasmodium falciparum*

El análisis de la actividad antiparasitaria de los extractos de *Laguncularia racemosa* arrojó valores de porcentajes de inhibición superiores al 70 % en los extractos de metanol contra *Leshmania donovani* y *Plasmodium falciparum*, mientras que los extractos de hexano presentaron actividad (>70 %) únicamente contra *Plasmodium falciparum*. Los extractos de diclorometano no presentaron actividad. (Tabla 13)

Tabla 13: Resultados de ensayos antiparasitarios de *L. racemosa* contra *L. donovani* y *P. falciparum*

Parasito	% de Actividad de los extractos a 10 μ g/mL		
	ML-LR-HEX	ML-LR-DCM	ML-LR-MeOH
<i>Plasmodium falciparum</i>	73.8	0.0	96.4
<i>Leshmania donovani</i>	27	1.4	75.3

Ilustración 29: Gráfico de % de actividad antiparasitaria de *L. racemosa* contra *L. panamensis* y *P. falciparum*



5.8- Caracterización química de los extractos

5.8.1-Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

5.8.1.1-Extracto de hexano

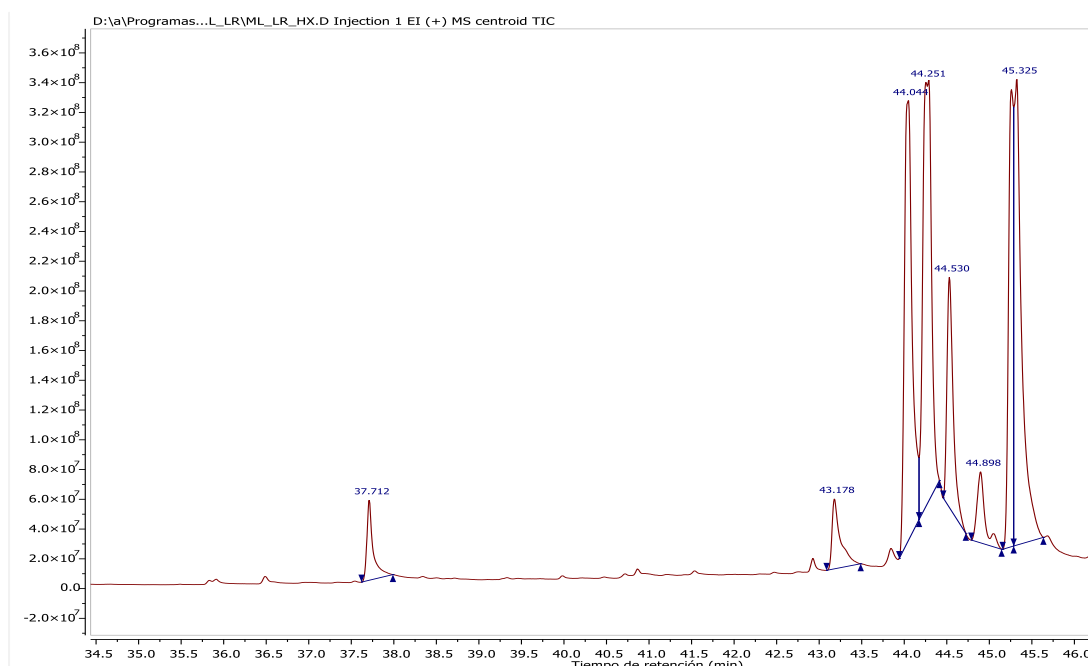
El análisis del extracto de hexano de *Laguncularia racemosa* mediante cromatografía de masas acoplado a un espectrómetro de masas (GS/MS Agilent Serie 5977B), permitió la detección de algunos compuestos presentes en este extracto. En el cromatograma (Ilustración 29) se puede observar la presencia de pocos compuestos en una región específica (Tabla 14).

Tabla 14: Compuestos observados en cromatograma de masas de hexano

Nº pico	% de área	RT	compuesto	Masa molecular (g/ml)	% de reconocimiento
1	2.95	37.712	nonacosano	408,6	99
2	3.54	43.178	Estigmasterol	412,6	99
3	16.76	44.044	β -sitoesterol	414,7	99
4	11.16	44.530	β -amirina	426,7	91
5	3.85	44.898	β -amirona	424.7	84
6	17.81	45.325	Lupeol	426.7	99

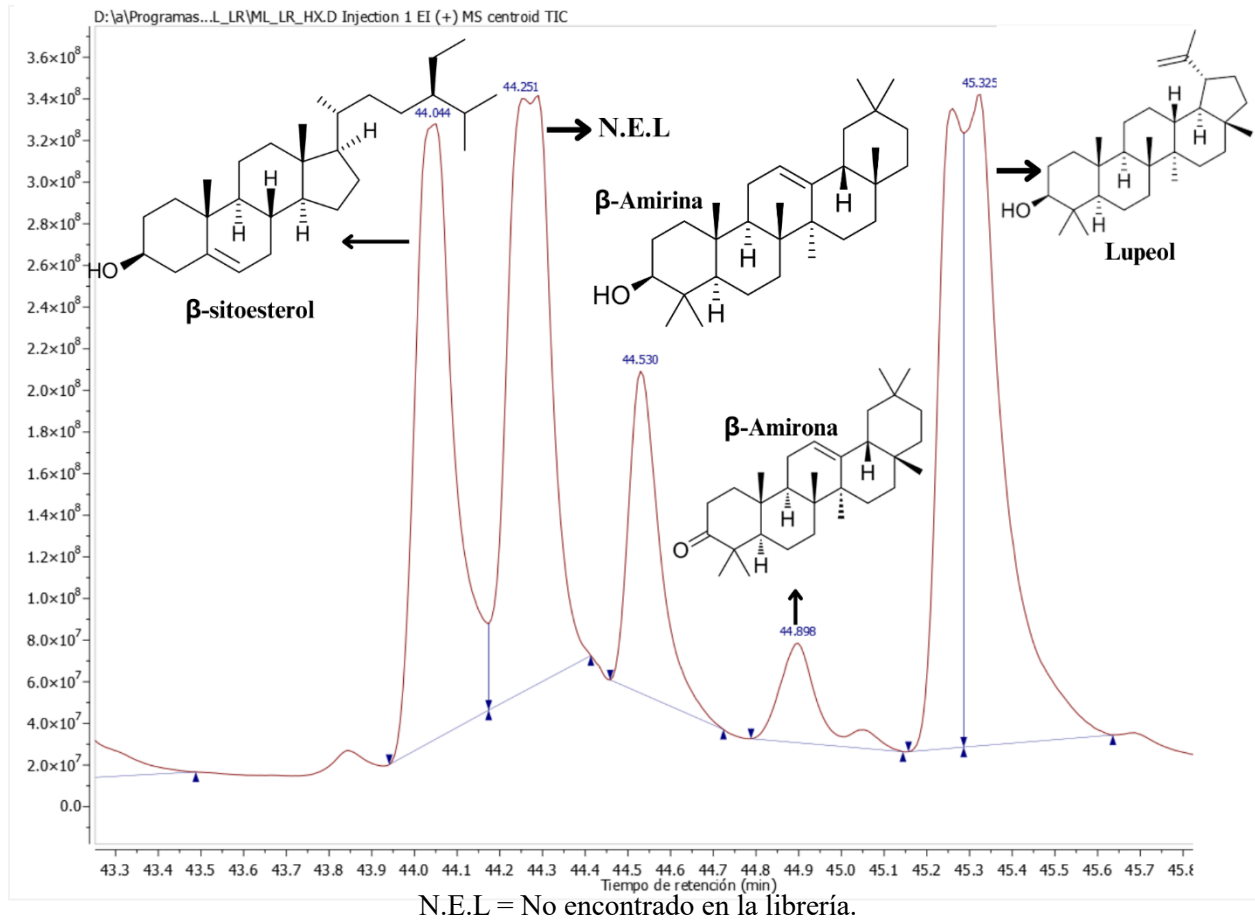
Espectro

Ilustración 30: Cromatograma de masas obtenido por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de extracto de hexano de L. racemosa



Al ampliar esta sección observamos que los picos de gran abundancia corresponden a compuestos de gran interés como: Lupeol , β -sitoesterol, β -amirina. (Ilustración 31)

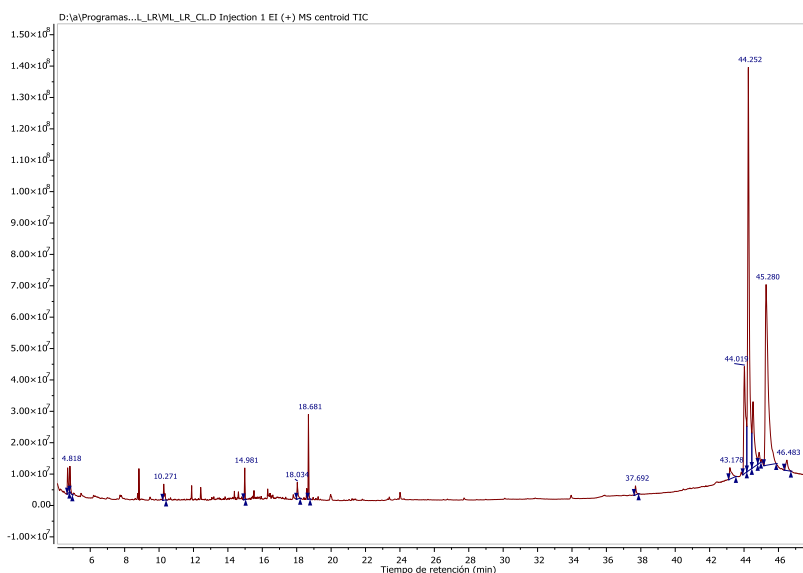
Ilustración 31: Cromatograma de masas ampliado de extracto de *L. racemosa* con los compuestos correspondientes a la mayor abundancia.



5.8.1.2-Cromatograma de diclorometano

El cromatograma de masas del extracto de diclorometano de *Laguncularia racemosa* es muy similar al cromatograma del extracto de hexano, es decir, se encontraron señales de mayor abundancia en zonas similares, tal como se puede ver en la Ilustración 32.

Ilustración 32: Cromatograma de masas obtenido por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de extracto de diclorometano de L. racemosa.

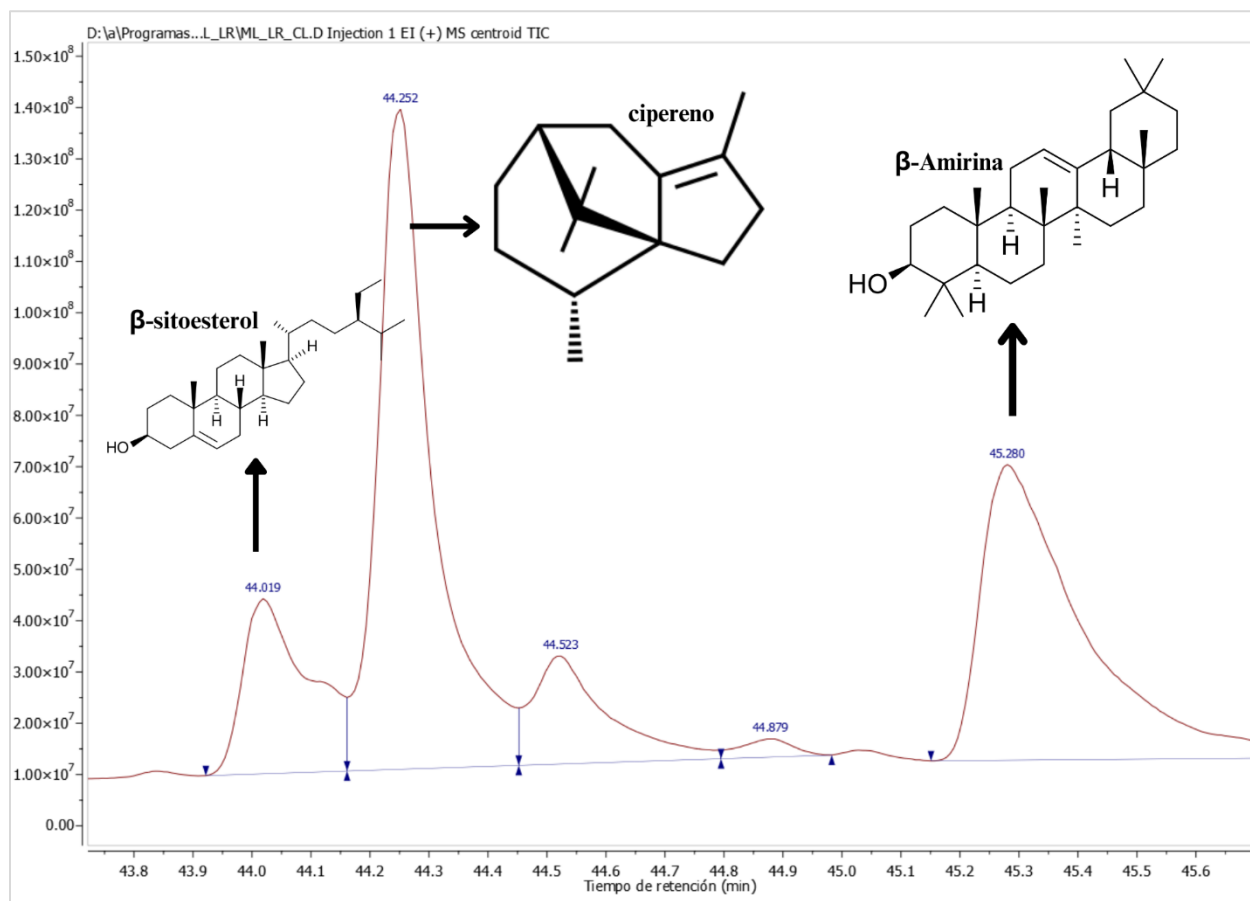


Al comparar con el blanco y tomando en cuenta solo los compuestos mayoritarios, encontramos que el extracto de diclorometano presento pocos picos (Tabla 15). Es importante mencionar que la muestra fue inyectada solubilizándola en Hexano, por lo que pudo existir la posibilidad de que este factor haya contribuido a la aparición de menos compuestos.

Tabla 15: Compuestos presentes en extractos crudo de diclorometano.

Nº pico	% de área	RT	compuesto	Masa molecular (g/ml)	% de reconocimiento
1	9.36	44.019	β -sitoesterol	414,7	99
2	28.14	44.252	cipereno	204.3	99
3	29.01	45.280	α -amirina	426,7	99

Ilustración 33: Cromatograma de masas ampliado de extracto de hexano de L. racemosa con los compuestos correspondientes a la mayor abundancia.

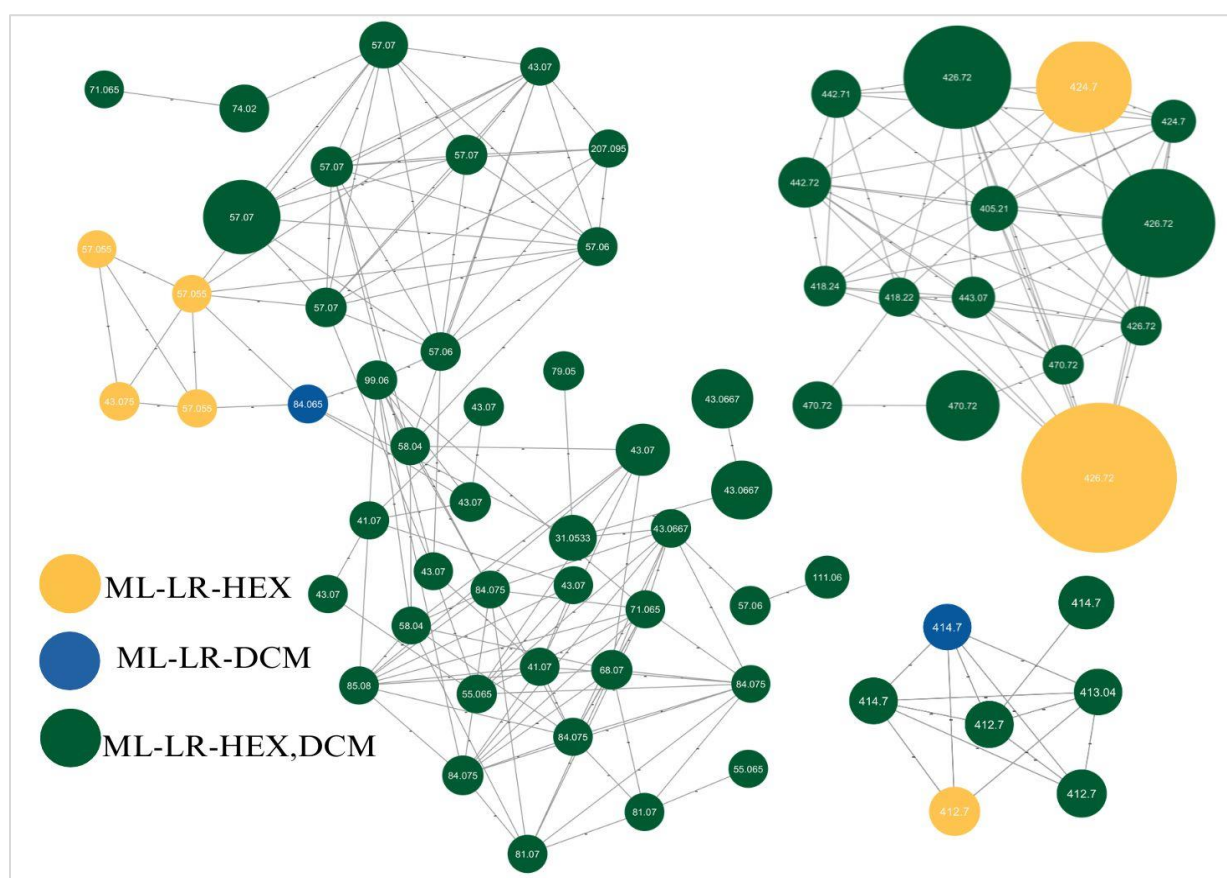


5.8.1.3- Estudio de diversidad química.

A partir de la data experimental obtenida por cromatografía de masas acoplada a espectrometría de masas se realizó un estudio de diversidad química, una herramienta muy reciente para el análisis de datos que contribuye a la comprensión de la química de productos naturales agrupando compuestos similares en redes moleculares, de las cuales, se puede inferir relaciones estructurales en función de sus similitudes espectrales, lo que ayuda en la identificación de metabolitos desconocidos. Para este proyecto la red molecular se elaboró con la “Global Natural Products Social Molecular Networking” (GNPS).

La red molecular de *Laguncularia racemosa* a primera vista nos indica similitud espectral entre los extractos apolares de hexano y diclorometano; en la red mostrada en la ilustración 34 se observa que la mayor parte de los compuestos se agrupan en secciones diferentes, pero están presentes en ambos extractos (color verde), con una minoría de compuestos individuales para cada extracto (azul para diclorometano, amarillo para hexano).

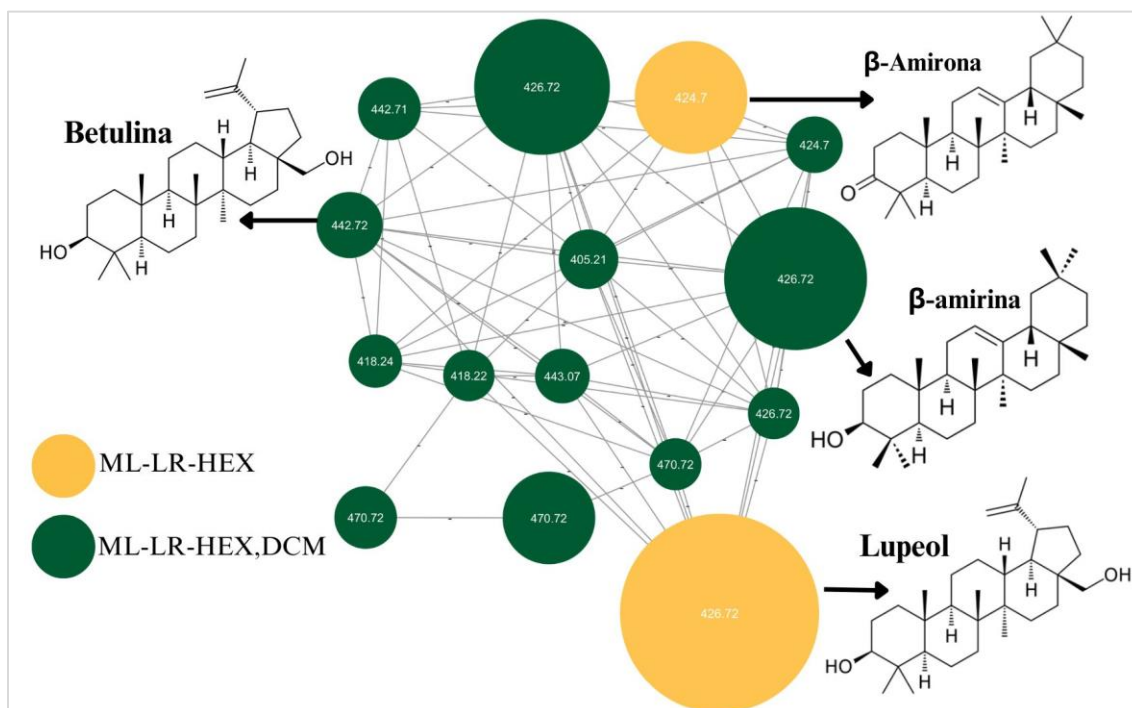
Ilustración 34: Visualización general de la red molecular de L. racemosa.



La visualización de compuesto a través de este tipo de herramientas ayuda a representar las relaciones químicas entre los diferentes metabolitos presentes en una muestra, un ejemplo, de esto es que al seleccionar en una agrupación específica o clusters (Ilustración 35) podemos observar los compuestos mayoritarios en nuestros cromatogramas anteriormente visualizado, tales como:

triterpenoides como lupeol , β -amirina, β -amirona, agrupados por su peso molecular que varía entre 200-400 g/mol, esto podría indicar que se trata de isómeros de estos compuestos u otros diferente.

Ilustración 35: Clusters de la red molecular de L. racemosa.



En general, la visualización de compuestos a través de una red molecular es una herramienta poderosa que puede simplificar y facilitar la interpretación de datos complejos de espectrometría de masas, proporcionando una visión integrada de las relaciones químicas en una muestra compleja, como lo es un planta que posee un gran contenido metabólico.

5.8.1.4-Actividades biológicas de los compuestos más abundantes observados en cromatograma de masas

Los compuestos detectados por espectrometría de masas pertenecen a grupos de compuesto importantes (esteroles y triterpenos), que poseen actividades biológicas de gran interés.

5.8.1.4.1- Esteroles

✓ β -sitoesterol

El β -sitoesterol es uno de los fitoesteroles más conocidos. De modo general, es un esterol que se encuentra muy bien distribuido en diversas especies vegetales y su estructura es muy similar a la del colesterol.

Se han reportado diversas actividad biológicas, tales como:

- ✓ Antidiabética: El β -sitoesterol ha demostrado su capacidad antidiabética en diversas investigaciones *in vivo* al mostrar inhibición de 78,2% de la enzima alfa glucosidasa en ratones diabéticos (Babu, S., et al, 2020). Del mismo modo, nuevos hallazgos indican que el β -sitoesterol mejora el control glucémico mediante la activación de los receptores de insulina y el transportador de glucosa 4 (proteínas claves en el control de los niveles de azúcar) en el tejido adiposo de ratas con diabetes tipo 2 (Ponnulakshmi, R., et al, 2019). Es muy claro que el β -sitoesterol puede actuar como potente antidiabético, por lo que es un compuesto con interés medicinal debido a que esta enfermedad provoca muchas muertes a nivel mundial y es responsable de complicaciones serias en los pacientes.
- ✓ Antioxidante: Se considera que el β -sitoesterol es un antioxidante moderado (Baskar, AA, et al, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que tiene la capacidad de atrapar radicales libres porque su estructura incluye grupos hidroxilos que pueden donar electrones para neutralizar los radicales libre (Babu, S., et al, 2020). De manera adicional, en un modelo de estudio con larvas de pez cebra el β -sitoesterol protegió del daño oxidativo del CuSO_4 , al promover la expresión de la enzima superóxido dismutasa y el glutatión peroxidasa 4B (Zhang, et al, 2023). Por esta razón, se puede decir que la actividad antioxidante del β -sitoesterol es de suma importancia porque nos permite utilizar este compuesto para

proteger las células y tejidos del daño causado por el estrés oxidativo que causa la presencia de radicales libres.

- ✓ Anticancerígeno: Varios estudios farmacológicos indican que el β -sitosterol ejerce una actividad antitumoral al promover la activación de señales que promueven la apoptosis, limitando la proliferación de células de cáncer (Bao, X., et al, 2022). Este hecho, ha promovido que los fitoesteroles se puedan usar para tratar diversos tipos de cáncer: como el de mamá, próstata, gástrico, páncreas y otros. De hecho, los datos epidemiológicos indican que al añadir un alto contenido de fitoesteroles a la dieta existe una reducción de los canceres comunes (Saleem, M., 2009)

De manera adicional a las actividades señaladas anteriormente, el β -sitosterol tiene reportes sobre otras actividades secundarias tales como: antiinflamatoria (Paniagua-Pérez R, et al,2016) y efecto protector sobre enfermedades respiratorias (Park, YJ., et al,2019). Actualmente, el β -sitosterol se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica debido a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas únicas.

Nuestro trabajo revela que este compuesto está presente tanto en los extractos de hexano y diclorometano, y al poseer diversas actividades biológicas se puede decir que *Laguncularia racemosa* es una planta con un gran potencial medicinal; actualmente, el β -sitosterol se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica debido a su baja toxicidad, pero múltiples propiedades biológicas y fisicoquímicas únicas. Por tal razón, la planta analizada constituye una fuente natural importante de este compuesto.

5.8.1.4.2- Triterpenoides

Los triterpenoides son terpenos que constan de seis unidades de isopreno, son un grupo de compuesto muy bien distribuidos en el reino vegetal. En los cromatogramas de masas obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se logró observar compuestos como: Lupeol, β -amirona (extracto de HEX), cipereno (extracto de DCM) y β -amirina (extractos de DCM Y HEX)

- Lupeol

Compuesto con estructura química $C_{30}H_{50}O$ presente en alimentos como col blanca, pimientos, pepino, tomate, mango, uvas rojas , entre otras. En los últimos años ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades terapéuticas.

- ✓ Antiparasitario: Diversas investigaciones han reportado el efecto del lupeol y sus derivados contra el *Plasmodium falciparum* en ratas (Singh, A., et al., 2020). El lupeol tiene la capacidad de afectar la membrana del parásito, reduciendo su viabilidad y propagación, lo cual ha sido demostrado de manera similar in vitro (Fotie, J., et al., 2006). Además, también ha mostrado acción contra parásitos como el *Leishmania donovani* al causar daños en la membrana citoplasmática del promastigote, que es la forma transmitida al huésped vertebrado (Das, A., et al., 2017).
- ✓ Antidiabético: Se han informado sobre diversas vías a través de las cuales el lupeol actúa como antidiabético. Por ejemplo, se ha reportado que el lupeol reduce la hiperinsulinemia al regular los receptores de insulina y la proteína GLUT 4 (Soni, L. K., et al., 2018). En ratas con diabetes tipo 2, ha mostrado efectos similares a la metformina, un medicamento utilizado para controlar los niveles de azúcar en la sangre en pacientes con diabetes tipo 2

(Malik, B., et al., 2019). Además, se ha reportado que inhibe la actividad de las enzimas alfa glucosidasa y alfa amilasa, responsables de la degradación de carbohidratos a azúcares (Ortiz-Andrade, R. R., et al., 2007).

- ✓ **Antiinflamatorio:** Se ha investigado el uso del lupeol para tratar la inflamación asociada a diversas enfermedades. Por ejemplo, Geetha et al. señalan en su investigación que el lupeol reduce la inflamación en un modelo de artritis en ratones al modular el sistema inmunológico y la generación de factores inflamatorios (Geetha T, et al., 1999). Además, se ha estudiado que este compuesto, administrado por vía oral a ratones con asma bronquial inducida, reduce los niveles de eosinófilos en los pulmones, así como la producción de moco y la inflamación general en los pulmones (Vasconcelos JF, 2008). Tanto ensayos *in vitro* como *in vivo* indican que el lupeol modula diversas moléculas que participan directa o indirectamente en los procesos de inflamación (Saleem, M., 2009).

El lupeol es un compuesto de suma importancia. Además de las actividades mencionadas anteriormente, existen informes sobre muchas otras actividades, como su capacidad cardioprotector, su actividad antimicrobiana y su acción como agente neuroprotector, entre otras. Estas características le otorgan un gran potencial de uso debido a su baja toxicidad y su abundancia en la naturaleza.

- **Cipereno**

Es un sesquiterpenoide de origen natural presente en diversos aceites esenciales. No hay muchos reportes sobre estudios de actividades biológicas. Sin embargo, algunas investigaciones destacan su poder antibacterial, contra bacterias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus aureus* (Kilani, S et al, 2005).

No se cuenta con reportes de su actividad antidiabética, antioxidante, antiparasitaria, citotoxicidad o fitotoxicidad, sin embargo, esto no descarta que posea algunas de estas actividades y que no se sepa de esto porque no se ha evaluado el compuesto puro en estos ensayos.

- **β -amirina**

Se trata de un triterpenoide pentacíclico de origen natural y se estima que se encuentra en gran abundancia en diversas plantas medicinales. Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han demostrado el papel biológico de la β -amirina, en diversas actividades biológicas como:

- ✓ Antioxidante: Se ha comprobado que la β -amirina es un potente antioxidante, actuando como donador de protones. Esto se ha demostrado en ensayos de DPPH y FRAP, donde se obtuvieron valores de $CI_{50} > 333.3 \mu M$ (Santiago, L. A., et al., s/f).
- ✓ Inhibidor de enzima alfa glucosidasa: Se ha reportado que este compuesto presenta una alta actividad inhibitoria contra la enzima alfa glucosidasa, con un CI_{50} de $32.33 \mu M$ (Thengyai, S., et al., 2020).
- ✓ Citotóxico con potencial antitumoral: Tanto la α -amirina como la β -amirina han mostrado actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas específicas a través de un mecanismo selectivo mediado por apoptosis. Algunas de las líneas celulares afectadas incluyen HL-60 (leucemia), HCT-8 (cáncer de colon) y MDAMB-435 (melanoma) (Neto, S. F., et al., 2021).

Los reportes sobre las actividades biológicas para los triterpenoides anteriormente descritos sugieren que podrían ser los responsables de las actividades biológicas observadas en esta investigación, ya que presentan un gran potencial relacionado a las actividades detectadas.

CAPÍTULO 6:
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

6-CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

6.1- Conclusiones:

Podemos concluir a partir del estudio del potencial biotecnológico de *Laguncularia Racemosa*, que:

- La detección de altos niveles de actividad biológica en los extractos orgánicos preparados con la especie de manglar panameño *Laguncularia racemosa* sugiere que esta planta podría ser una valiosa fuente de compuestos bioactivos con gran potencial biotecnológico y medicinal.
- Las propiedades detectadas en *Laguncularia racemosa* del mangle pueden contribuir para investigaciones futuras y el potencial desarrollo de productos farmacéuticos, suplementos nutricionales y pesticidas naturales, de importancia para la salud humana como en la agricultura, lo que les adhiere un gran valor a los manglares panameños.
- La actividad inhibitoria de la enzima alfa glucosidasa y el potencial antioxidante observados en *Laguncularia racemosa* podrían ser de gran importancia para generar productos que sean de utilidad en la protección contra el estrés oxidativo y el manejo de la hiperglucemia. Es decir, podrían ser de utilidad para la búsqueda de tratamientos de enfermedades metabólicas como la diabetes, el Alzheimer, el Parkinson, entre otras, que son prevalentes en la población panameña.
- La actividad fitotóxica presentada por *Laguncularia racemosa* sugiere que esta especie podría ser una fuente de compuestos bioactivos con propiedades pesticidas. Los cuales podrían ser de beneficio para la agricultura sostenible y la protección de los cultivos contra plagas.
- La presencia de actividad citotóxica en *Laguncularia racemosa*, junto con su actividad antiparasitaria, abre la puerta al desarrollo de terapias naturales contra enfermedades

parasitarias graves y también podría representar un nuevo enfoque en el tratamiento de células anómalas, como las células cancerosas.

6.2-Recomendaciones:

- Se recomienda realizar pruebas biológicas más específicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, para evaluar la eficacia y seguridad de los compuestos extraídos de *Laguncularia racemosa*. Esto es fundamental para comprender su potencial terapéutico y cualquier efecto secundario asociado.
- Es recomendable llevar a cabo investigaciones simultáneas en las que se evalúe la misma especie obtenida de diferentes regiones del país. Esto permitirá caracterizar de manera más completa la especie y obtener nueva información sobre cómo el entorno afecta la producción de metabolitos secundarios en *Laguncularia racemosa*.
- Implementar técnicas más específicas para determinar el contenido metabólico de *Laguncularia racemosa* y así confirmar cuáles son los metabolitos responsables de la actividad es observada.

CAPITULO 7: REFERENCIAS

7-REFERENCIAS

- Abbas, G., Al-Harrasi, A. S., & Hussain, H. (2017a). A-glucosidase enzyme inhibitors from natural products. En G. Brahmachari (Ed.), *Discovery and Development of Antidiabetic Agents from Natural Products* (pp. 251–269). Elsevier.
- Abbas, G., Al-Harrasi, A. S., & Hussain, H. (2017b). A-glucosidase enzyme inhibitors from natural products. En *Discovery and Development of Antidiabetic Agents from Natural Products* (pp. 251–269). Elsevier.
- Abiodun, O. O., Rodríguez-Nogales, A., Algeri, F., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Utrilla, M. P., Rodríguez-Cabezas, M. E., & Galvez, J. (2016). Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.056>
- Alsharekh, A., El-Sheikh, M. A., Alatar, A. A., & Abdel-Salam, E. M. (2022). Natural control of weed invasions in hyper-arid arable farms: Allelopathic potential effect of *Conocarpus erectus* against common weeds and vegetables. *Agronomy* (Basel, Switzerland), 12(3), 703. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030703>
- [ANAM-ARAP] Autoridad Nacional del Ambiente y Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá. (2013). *Manglares de Panamá: importancia, mejores prácticas y regulaciones vigentes*. Panamá: Editora Novo Art, S.A., XX pp. (s/f).
- Araújo, J. de S., & Lins, A. L. F. de A. (1999). Características morfológicas e anatômicas de plântulas de *laguncularia racemosa* gaertn (combretaceae). <https://repositorio.museu-goeldi.br/handle/mgoeldi/1892>

- Artemia salina y caracterización de alcaloides. (s/f). Bvsalud.org. Recuperado el 1 de octubre de 2023, de https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877628/evaluacion-de-la-citotoxicidad-mediante-el-bioensayo-de-artemia_sra2iBx.pdf
- Babu, S., & Jayaraman, S. (2020). An update on β -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 131(110702), 110702. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110702>
- Babu, S., Krishnan, M., Rajagopal, P., Periyasamy, V., Veeraraghavan, V., Govindan, R., & Jayaraman, S. (2020). Beta-sitosterol attenuates insulin resistance in adipose tissue via IRS-1/Akt mediated insulin signaling in high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 873(173004), 173004. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173004>
- Bao, X., Zhang, Y., Zhang, H., & Xia, L. (2022). Molecular mechanism of β -Sitosterol and its derivatives in tumor progression. *Frontiers in Oncology*, 12, 926975. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.926975>
- Baskar, A. A., Al Numair, K. S., Alsaif, M. A., & Ignacimuthu, S. (2012). In vitro antioxidant and antiproliferative potential of medicinal plants used in traditional Indian medicine to treat cancer. *Redox report: communications in free radical research*, 17(4), 145–156. <https://doi.org/10.1179/1351000212Y.0000000017>
- Benavides Moraz, M. J., Bruscas Alijarde, M. J., Mozota Duarte, J., & Medrano Sanz, S. (2000). Los nuevos antidiabéticos orales para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Integral*, 36(9), 355–358. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-los-nuevos-antidiabeticos-orales-el-10022164>

- Berbudi, A., Rahmadika, N., Tjahjadi, A. I., & Ruslami, R. (2020). Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Current Diabetes Reviews*, 16(5), 442–449. <https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>
- Bokani, M. (2021). EFECTO ANTIDIABÉTICO DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Laguncularia racemosa* (Mangle Blanco) EN RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS CON ALOXANO. Universidad Federal de Tecnología de Minna.
- Cara, R., Simon, J. E., Micranthum, C., & Combretaceae, F. (2010). Chemistry and pharmacology of kinkéliba (*Combretum micranthum*), a west African medicinal plant. Rutgers.edu. <https://rucore.libraries.rutgers.edu/rutgers-lib/26656/PDF/1/play/>
- Cavalcanti, P. M. S., Martins, M. D. O. C. C., Nunes, P. H. M., Alves Filho, F. C., Silva, J. D. P., & Cavalcanti, S. M. G. (2019). Antidiarrheal effect of extract from the bark of *Combretum leprosum* in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(1). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170932>
- Cedeño, M. A. G. (2015). Estudio químico de las hojas del mangle blanco. Universidad de Panamá.
- Chiasson, J.-L., & Rabasa-Lhoret, R. (2004). Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function. *Diabetes*, 53 Suppl 3, S34-8. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s34
- Cruz, S., Marroquín, M. N., & Cáceres, A. (2019). Biological activity and chemical composition of organic extracts from three Guatemalan mangrove trees. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 6(1), 10–10. <https://doi.org/10.15171/ijpni.2019.10>

- Das, A., Jawed, J. J., Das, M. C., Sandhu, P., De, U. C., Dinda, B., Akhter, Y., & Bhattacharjee, S. (2017). Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(4), 512–522. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.022>
- Dawe, A. (2013). Phytochemical Constituents of *Combretum Loeffl.* (Combretaceae). *Pharmaceutical crops*, 4(1), 38–59. <https://doi.org/10.2174/2210290601304010038>
- Del Cid Perén, F. A. (2022). Manglares en Panamá: Importancia, biodiversidad y medidas para su conservación. *Biocenosis*, 33(2), 17–27. <https://doi.org/10.22458/rb.v33i2.4538>
- Delgoda, R., & Murray, J. E. (2017). Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. En *Pharmacognosy* (pp. 93–100). Elsevier.
- Díaz Gaxiola, J. M. (2011). Una revisión sobre los manglares: características, problemáticas y su marco jurídico. Importancia de los manglares, el daño de los efectos antropogénicos y su marco jurídico: caso sistema lagunar de Topolobampo. *Ra Ximhai*, 7(3), 355–370. <https://doi.org/10.35197/rx.07.03.2011.05.jd>
- diaz., s. l. c. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. pontificia universidad javeriana
- Do Nascimento Santos, D. K. D., de Melo, C. M. L., da Silva, E. M., de Almeida, V. S., da Cruz Filho, I. J., de Souza Lima, G. M., de Araújo, D. R. C., da Costa Batista, F. R., & Vieira, J. R. C. (2021). Investigation of nutritional contents, antioxidant and immunostimulatory activities of aqueous extract from *Laguncularia racemosa* leaves. *The Natural Products Journal*, 11(2), 231–243. <https://doi.org/10.2174/2210315510666200108105217>

- Ellison, A, Farnsworth, E, & Moore, G. (2007). IUCN Red List of Threatened Species: *Laguncularia racemosa*. IUCN Red List of Threatened Species. doi: 10.2305/UICN.UK.2010-2.RLTS.T178798A7609219.en
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 56(2), 110–122. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200002
- Field, C. D. (1999). Rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. *Marine Pollution Bulletin*, 37(8–12), 383–392. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(99\)00106-x](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(99)00106-x)
- Fotie, J., Bohle, D. S., Leimanis, M. L., Georges, E., Rukunga, G., & Nkengfack, A. E. (2006). Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. *Journal of Natural Products*, 69(1), 62–67. <https://doi.org/10.1021/np050315y>
- Francisco, A. (2009). DESCRIPCIÓN MORFOANATOMICA DE LOS TIPOS DE GLÁNDULAS FOLIARES EN EL MANGLE BLANCO *Laguncularia racemosa* L. Gaertn (f). *Acta Microscopica*. 18. 237-252. (s/f).
- Friess, D. A., Yando, E. S., Alemu, J. B., Wong, L.-W., Soto, S. D., & Bhatia, N. (2020). Chapter 3 ecosystem services and disservices of mangrove forests and salt marshes. En *Oceanography and Marine Biology*. Taylor & Francis.
- Galasko, G. T. (2017). Insulin, Oral Hypoglycemics, and Glucagon. En *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry* (pp. 437–445). Elsevier.
- García-Alvear, N., & Abad-Terán, M. (2015). Análisis preliminar de la fitotoxicidad del material particulado sedimentable de la zona urbana de Cuenca. *MASKANA*, 6(1), 95–105. <https://doi.org/10.18537/mskn.06.01.08>

- Geetha, T., & Varalakshmi, P. (1999). Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats. *General Pharmacology*, 32(4), 495–497. [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(98\)00212-2](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(98)00212-2)
- Gómez, A. , Rodríguez, R., Villarreal, R., González,A.,Piepenbring, M. (Ed.). (2010). *Guía de mangles de la Costa Pacífica de Chiriquí, Panamá* (Vol. 3). EDUNACHI: Editorial de la Universidad Autónoma de Chiriquí. https://www.researchgate.net/profile/Meike-Piepenbring2/publication/296061065_Guia_de_mangles_de_la_Costa_Pacifica_de_Chiriqui_Panama/links/5fdc8559299bf140881d1627/Guia-de-mangles-de-la-Costa-Pacifica-de-Chiriqui-Panama.pdf
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, T. K. (s/f). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Org.mk*. Recuperado el 1 de octubre de 2023, de http://www.bulletin.mfd.org.mk/volumes/Volume%2060/60_002.pdf
- Holdridge, L.R. (1940). Some notes on the mangrove swamps of Puerto Rico. *Caribbean Forester*. 1(4): 19-29. 12. Institute of Tropical Forestry. 1950. Tenth annual report. (s/f).
- Hossain, U., Das, A. K., Ghosh, S., & Sil, P. C. (2020). An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 145, 111738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111738>
- Indriaty, I., Ginting, B., Hasballah, K., & Djufri. (2022). Assessment cytotoxic assay of *Rhizophora* plants mangrove using brine shrimp (*Artemia salina* L) model. *IOP conference series. Earth and environmental science*, 951(1), 012070. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/951/1/012070>

- Jiménez, J. A. [s.f.]. *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.f. White Mangrove. SO-ITF-SM-3. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 64 p. (s/f).
- Katerere, D. R., Gray, A. I., Kennedy, A. R., Nash, R. J., & Waigh, R. D. (2004). Cyclobutanes from *Combretum albopunctatum*. *Phytochemistry*, 65(4), 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.09.014>
- Kathiresan, K. (2012). Importance of Mangrove Ecosystem. *International journal of marine science*. <https://doi.org/10.5376/ijms.2012.02.0010>
- Kilani, S., Abdelwahed, A., Ammar, R. B., Hayder, N., Ghedira, K., Chraief, I., Hammami, M., & Chekir-Ghedira, L. (2005). Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian)*Cyperus rotundus*. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 695–700. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9699035>
- Kim, K., Seo, E., Chang, S.-K., Park, T. J., & Lee, S. J. (2016). Novel water filtration of saline water in the outermost layer of mangrove roots. *Scientific Reports*, 6(1), 20426. <https://doi.org/10.1038/srep20426>
- Kougan, G. B., Tabopda, T., Kuete, V., & Verpoorte, R. (2013). Simple phenols, phenolic acids, and related esters from the medicinal plants of Africa. *En Medicinal Plant Research in Africa* (pp. 225–249). Elsevier.
- Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G. B., Gill, H., Huynh, T., & Dias, D. A. (2021). Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00702-5>

- Lin, T.-C., & Hsu, F.-L. (1999). Tannin and related compounds from *Terminalia catappa* and *Terminalia parviflora*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 46(4), 613–618. <https://doi.org/10.1002/jccs.199900085>
- Liu, T., Yip, Y. M., Song, L., Feng, S., Liu, Y., Lai, F., Zhang, D., & Huang, D. (2013). Inhibiting enzymatic starch digestion by the phenolic compound diboside A: A mechanistic and in silico study. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 54(1), 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.062>
- Maier, A. G., Matuschewski, K., Zhang, M., & Rug, M. (2019). *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, 35(6), 481–482. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>
- Majeed, M., Majeed, S., Mundkur, L., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., & Ali, F. (2020a). Standardized *Emblica officinalis* fruit extract inhibited the activities of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase-4 and displayed antioxidant potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 509–516. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10020>
- Majeed, M., Majeed, S., Mundkur, L., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., & Ali, F. (2020b). Standardized *Emblica officinalis* fruit extract inhibited the activities of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase-4 and displayed antioxidant potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 509–516. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10020>
- Majumdar, S. G., & Patra, G. (Eds.). (1980). Metabolic analysis of Sundarbans mangrove species (Vol. 57, Número 568). *Journal of the Indian Chemical Society*.
- Malik, A., Jamil, U., Butt, T. T., Waquar, S., Gan, S. H., Shafique, H., & Jafar, T. H. (2019). In silico and in vitro studies of lupeol and iso-orientin as potential antidiabetic agents in a

- rat model. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 1501–1513.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S176698>
- Marina, D., Avella, G., Ortiz García, C. A., & Mendoza, A. (s/f). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Cenam.mx. Recuperado el 1 de octubre de 2023, de https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/m2/sm2008-m220-1108.pdf
 - Martín Vaquero, P. (2000). Tratamiento de la diabetes tipo 2. Fármacos insulinosensibilizadores e inhibidores de las glucosidasas intestinales. *Medicine*, 8(20), 1054–1063. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(00\)70198-3](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(00)70198-3)
 - Martínez-Luis, S., López, D., Cherigo, L., de Sedas, A., & Spadafora, C. (2018). Evaluation of antiparasitic, anticancer, antimicrobial and hypoglycemic properties of organic extracts from Panamanian mangrove plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(1), 32. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.223531>
 - McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 107(1), 7–14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
 - Metroflor, P. (2019, febrero 11). FITOTOXICIDAD: Más que un culpable, una mirada a los múltiples factores en interacción. Metroflor. <https://www.metroflorcolombia.com/fitotoxicidad-mas-que-un-culpable-una-mirada-a-los-multiples-factores-en-interaccion/>
 - Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(05), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

- Minodier, P., & Parola, P. (2007). Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(3), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2006.09.004>
- Mongelli, E., Martino, V., Coussio, J., & Ciccía, G. (1996). Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(4), 249–254. <https://doi.org/10.1076/phbi.34.4.249.13234>
- Monge-Maillo, B., & López-Vélez, R. (2015). Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(9), 1398–1404. <https://doi.org/10.1093/cid/civ004>
- Moreland, R. J., Higgins, S., Zhou, A., VanStraten, P., Cauthron, R. D., Brem, M., McLarty, B. J., Kudo, M., & Canfield, W. M. (2012). Species-specific differences in the processing of acid α -glucosidase are due to the amino acid identity at position 201. *Gene*, 491(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.09.011>
- Moreno, E., Ortiz, B. L., & Restrepo, L. P. (2014). Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales. *Revista colombiana de química*, 43(3), 41–48. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012028042014000300006&script=sci_artext
- Nawaz, J., Rasul, A., Shah, M. A., Hussain, G., Riaz, A., Sarfraz, I., Zafar, S., Adnan, M., Khan, A. H., & Selamoglu, Z. (2020). Cardamonin: A new player to fight cancer via multiple cancer signaling pathways. *Life sciences*, 250, 117591. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117591>
- Neto, S. F., Prada, A. L., Achod, L. D. R., Torquato, H. F. V., Lima, C. S., Paredes-Gamero, E. J., Silva de Moraes, M. O., Lima, E. S., Sosa, E. H., de Souza, T. P., & Amado, J. R. R.

- (2021). A-amyirin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 139(111656), 111656. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111656>
- Ododo, M. M., Choudhury, M. K., & Dekebo, A. H. (2016). Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. SpringerPlus, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2894-x>
 - Ortiz, A., & Melissa, I. (2013). Evaluación de la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa (α -GLC) in vitro por extractos vegetales. <https://repositorio.utp.edu.co/items/33d08863-f14c-4f49-9cab-be414196aaf6>
 - Ortiz-Andrade, R. R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Avila, G., Villalobos-Molina, R., & Estrada-Soto, S. (2007). Alpha-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.002>
 - Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., Morales-González, J. A., Álvarez-González, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2016). Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 14(1), 123–130. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.13>
 - Park, Y. J., Bang, I. J., Jeong, M. H., Kim, H. R., Lee, D. E., Kwak, J. H., & Chung, K. H. (2019). Effects of β -sitosterol from corn silk on TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in lung alveolar epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(35), 9789–9795. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02730>

- Pegel, K. H., & Rogers, C. B. (1985). The characterisation of mollic acid 3 β -D-xyloside and its genuine aglycone mollic acid, two novel 1 α -hydroxycycloartenoids from *Combretum molle*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0, 1711–1715. <https://doi.org/10.1039/P19850001711>
- Phan, A. D. T., Zhang, J., Seididamyeh, M., Srivarathan, S., Netzel, M. E., Sivakumar, D., & Sultanbawa, Y. (2022). Hydrolysable tannins, physicochemical properties, and antioxidant property of wild-harvested *Terminalia ferdinandiana* (exell) fruit at different maturity stages. *Frontiers in Nutrition*, 9, 961679. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.961679>
- Ponnulakshmi, R., Shyamaladevi, B., Vijayalakshmi, P., & Selvaraj, J. (2019). In silico and in vivo analysis to identify the antidiabetic activity of beta sitosterol in adipose tissue of high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic experimental rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(4), 276–290. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1545815>
- Queiroz, S. C. N., Assalin, M. R., Nobre, S., Melo, I. S., Moraes, R. M., Ferracini, V. L., & Cerdeira, A. L. (2010). Determination of Combretastatin A-4 in *Combretum leprosum*. *Planta medica*, 76(05), P53. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1251815>
- Rabinowitz, D. (1978). Mortality and initial propagule size in mangrove seedlings in Panama. *Journal of Ecology*. 66: 45-51. (s/f).
- Reyes Sanamé, F. A., Pérez Álvarez, M. L., Alfonso Figueredo, E., Ramírez Estupiñan, M., & Jiménez Rizo, Y. (2016). Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *CCH. Correo científico de Holguín*, 20(1), 98–121. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1560-43812016000100009&script=sci_arttext

- Rivera, E. S., & Casa, S. W. (2005). Una descripción del valor de los bienes y servicios ambientales prestados por los manglares. *Gaceta ecológica*, (74), 54-68. (s/f).
- Saadullah, M., Chaudary, B. A., & Uzair, M. (2016a). Antioxidant, Phytotoxic and Antiurease Activities, and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Conocarpus lancifolius* (Combretaceae). *Tropical journal of pharmaceutical research: TJPR*, 15(3), 555. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i3.17>
- Saadullah, M., Chaudary, B. A., & Uzair, M. (2016b). Antioxidant, Phytotoxic and Antiurease Activities, and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Conocarpus lancifolius* (Combretaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research: TJPR*, 15(3), 555. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i3.17>
- Saleem, M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters*, 285(2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.033>
- Sam, T. W. (2008). Toxicity Testing Using the Brine Shrimp *Artemia salina*. En R. J. M. Steven M. Colegate (Ed.), *Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination* (pp. 442–454). CRC-Press.
- Santiago, L. A., Dayrit, K. C., Correa, P. C. B., & Mayor, A. B. R. (s/f). Comparison of antioxidant and free radical scavenging activity of triterpenes α -amyrin, oleanolic acid and ursolic acid. *Psu.edu*. Recuperado el 7 de noviembre de 2023, de <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=bdc1ef05726a881af3d9ded8f6f187c8e115f4f0>
- Sharma, N., Palia, P., Chaudhary, A., Shalini, Verma, K., & Kumar, I. (2020). A Review on Pharmacological Activities of Lupeol and its Triterpene Derivatives. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5), 325–332. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4280>

- Sharmila, R., & Sindhu, G. (2017). Evaluate the antigenotoxicity and anticancer role of β -sitosterol by determining oxidative DNA damage and the expression of phosphorylated mitogen-activated protein kinases', C-fos, C-jun, and endothelial growth factor receptor. *Pharmacognosy magazine*, 13(49). <https://doi.org/10.4103/0973-1296.197634>
- Singh, A., Mukhtar, H. M., Kaur, H., & Kaur, L. (2020). Investigation of antiplasmodial efficacy of lupeol and ursolic acid isolated from *Ficus benjamina* leaves extract. *Natural Product Research*, 34(17), 2514–2517. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1540476>
- Soni, L. K., Dobhal, M. P., Arya, D., Bhagour, K., Parasher, P., & Gupta, R. S. (2018). In vitro and in vivo antidiabetic activity of isolated fraction of *Prosopis cineraria* against streptozotocin-induced experimental diabetes: A mechanistic study. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 108, 1015–1021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.099>
- Spalding, M., Kaimuna, M., Collins, L. (2010). Atlas mundial de los manglares. Organización Internacional de las Maderas Tropicales (OIMT) y Sociedad Internacional para los Ecosistemas de Manglares (IMSE) (Malasia).
- Srikanth, S., Lum, S. K. Y., & Chen, Z. (2016). Mangrove root: adaptations and ecological importance. *Trees* (Berlin, Germany: West), 30(2), 451–465. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1233-0>
- Thengyai, S., Thiantongin, P., Sontimuang, C., Ovatlarnporn, C., & Puttarak, P. (2020). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of medicinal plants in Thai antidiabetic recipes and bioactive compounds from *Vitex glabrata* R. Br. stem bark. *Journal of Herbal Medicine*, 19(100302), 100302. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100302>

- Thirupathi, A., Silveira, P. C., Nesi, R. T., & Pinho, R. A. (2017). β -Amyrin, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine-induced hepatic fibrosis in male rats. *Human & Experimental Toxicology*, 36(2), 113–122. <https://doi.org/10.1177/0960327116638727>
- Tomlinson, P. B. (1986). *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press. (220-223).
- Tsunoda, Y., Asano, N., (2002). Alpha-Glucosidase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 9(10), 1063-1084.
- Twilley, R. R., & Rivera-Monroy, V. H. (2009). Mangrove ecosystems. En: Gillespie, A. and D. Clague (eds.), *Encyclopedia of Islands*. University of California Press, Berkeley, California, USA. Páginas 570-574. (s/f).
- Vasconcelos, J. F., Teixeira, M. M., Barbosa-Filho, J. M., Lúcio, A. S. S. C., Almeida, J. R. G. S., de Queiroz, L. P., Ribeiro-Dos-Santos, R., & Soares, M. B. P. (2008). The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *International Immunopharmacology*, 8(9), 1216–1221. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.04.011>
- Vista de una revisión sobre las actividades farmacológicas del lupeol y sus derivados triterpénicos. (s/f). Jddtonline.info. Recuperado el 6 de noviembre de 2023, de <https://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/4280/3338>
- Yahaya, M & Nodu, M & Ekine, Opuda & Ajuogu, Peter. (2018). The Phytochemical and Proximate Composition of White Mangrove Leaves (*Laguncularia Racemosa*). *Advance Research Journal of Multidisciplinary Discoveries*, 32(15), 85-89.

- Zeng, Y.-F., Lü, Z.-R., Yan, L., Oh, S., Yang, J.-M., Lee, J., & Ye, Z. M. (2012). Towards alpha-glucosidase folding induced by trifluoroethanol: Kinetics and computational prediction. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 47(12), 2284–2290. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.005>
- Zenil Lugo, N., Colinas León, M. T., Bautista Bañuelos, C., Vázquez Rojas, T. R., Lozoya Saldaña, H., & Martínez Damián, M. T. (2014). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(6), 1029–1039. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342014000600010&script=sci_arttext
- Zhang, P., Liu, N., Xue, M., Zhang, M., Liu, W., Xu, C., Fan, Y., Meng, Y., Zhang, Q., & Zhou, Y. (2023). Anti-inflammatory and antioxidant properties of β -sitosterol in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020391>
- Zhang, X.-R., Kaunda, J. S., Zhu, H.-T., Wang, D., Yang, C.-R., & Zhang, Y.-J. (2019). The genus *Terminalia* (Combretaceae): An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *Natural Products and Bioprospecting*, 9(6), 357–392. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0>

CAPITULO 8: ANEXOS

8-ANEXOS

Ilustración 36: Elaboración de ensayo de citotoxicidad.

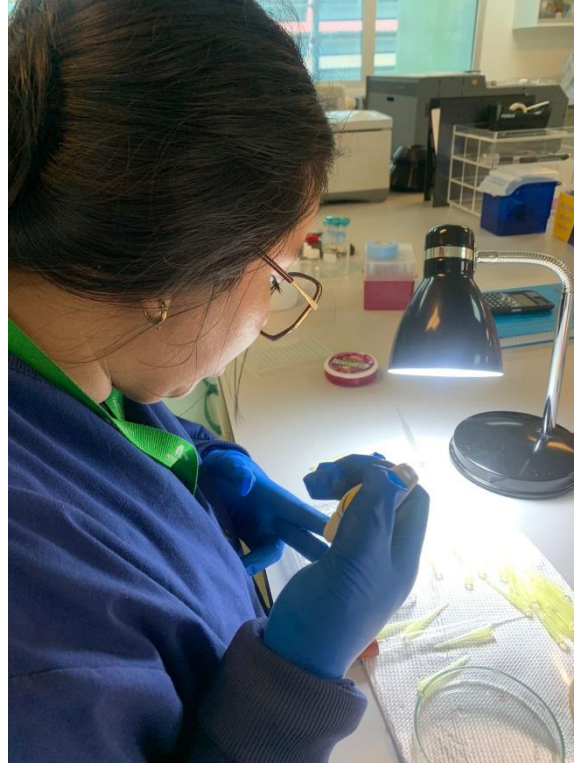


Ilustración 37: Espectrófotometro UV/VIS.



Ilustración 39: Estereomicroscopio



Ilustración 38: Placa de 96 pocillos de ensayo inhibidor de alfa glucosidasa.

