



Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Química

“ESTUDIO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *Mora oleífera* MANGLAR ENDÉMICO DE
PANAMÁ Y COLOMBIA.”

Presentado por:

Javier Enrique Liao Luo

Bajo la dirección de los doctores

Dr. Sergio Martínez-Luis (INDICASAT-AIP)

Dra. Lilia Chérigo (Departamento de Química Orgánica)

Trabajo de Graduación para optar al grado de Licenciado en Química

Ciudad de Panamá, República de Panamá

2021

Jurado Evaluador

Dr. Sergio Martínez-Luis

Dra. Lilia Chérigo

Dr. Héctor Montenegro

MSc. Vielza Domínguez

A mis padres,

*Quienes han me han permitido cumplir mis
sueños y obtener una educación integral
para mi futuro...*

A mis mejores amigas,

*Que gracias a ellas he podido
desarrollarme como un individuo más
integral en la sociedad...*

A mis asesores,

*Que gracias a ellos he podido
desarrollarme como profesional más
integral...*

Agradecimientos

Con mucho amor a mis padres quienes me permitieron cumplir mis metas y mis sueños, por confiarme en mí y brindarme todo lo necesario para emprender mi propio camino.

Mi gratitud al Dr. Sergio Martínez-Luis por darme la oportunidad y confianza de desarrollar este proyecto, dentro de su grupo de investigación, por estar pendiente a mi entrenamiento, ayudándome y corrigiéndome cuando hizo falta. A mi co-asesora la Dra. Lilia Chérigo por escucharme y brindarme su conocimiento y experiencia durante mi formación como investigador. Y a todos los mentores que aportaron en el desarrollo de mi educación y ser una persona integro. Agradecer a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado por los fondos recibidos y a Daniel Torres por el apoyo en el uso del equipo de espectrometría de masas para la elucidación estructural de mis compuestos y a Geraldín, por el uso del equipo de espectroscopia de infrarrojo.

A la Dra. Johant, Dr. Christopher, Dr. Cubilla, Randy Mojica y Andrea Burillo quienes me ayudaron y prepararon en mis inicios cuando estaba en la búsqueda de un proyecto para mi trabajo de graduación. También a las profesoras Irene, Magalís y Nidia por incentivar mi curiosidad y amor hacia la química durante mis inicios de Olímpico. A Sofía, Rocío, Megan, Luis, Andrés, Elena, Diego, Valerio, Rodrigo, Marisol... quienes con su apoyo moral y comprensión me alentaron a lo largo de este camino que inicié de chico como un niño curioso y con sed de conocimiento.

Por último, quisiera dar gracias a Dios...

Desde el fondo de mi corazón, muchas gracias a todos ustedes.

Índice General

	Página
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice General	III
Lista de Tablas	VII
Lista de Ilustraciones	IX
Sumario	XI
1. Marco Introductorio	1
<i>1.1 Marco Teórico</i>	2
<i>1.2 Productos Naturales</i>	4
1.2.1 Historia de los Productos Naturales	5
1.2.2 Productos Naturales de Importancia Histórica	7
1.2.3 Importancia de los Productos Naturales	8
<i>1.3 Fuentes de Productos Naturales</i>	9
1.3.1 Fuentes Terrestres	10
1.3.1.1 Plantas	10
1.3.1.2 Microorganismos Terrestres	11
1.3.1.3 Animales Terrestres	11
1.3.2 Fuentes Acuáticas	12
2.2.2.1 Algas Marinas	12
2.2.2.2 Esponjas Marinas	13
2.2.2.3 Briozoos	13
<i>1.4 Manglares y su Historia</i>	14
1.4.1 Historia de los Manglares	14
1.4.2 Características de los Manglares	15
1.4.3 Distribución de los Manglares	17
1.4.4 Clases de Manglares	20
1.4.4.1 Indo-Pacífico Occidental (IWP)	20
1.4.4.2 Atlántico-Pacífico Oriental (AEP)	21

1.4.5 Peligro de Extinción de los Manglares	21
1.5 <i>Productos Naturales encontrados en Manglares de América</i>	23
1.5.1 Compuestos Bioactivos de los Manglares	23
1.5.1.1 Algunos compuestos Bioactivos encontrado en Manglares	25
1.5.2 Usos Medicinales de los Manglares	25
2. Problemática y Justificación	27
2.1 <i>Problemática de la Investigación</i>	28
2.2 <i>Justificación e Importancia de la Investigación</i>	29
3. Objetivos de la Investigación	31
3.1 <i>Objetivos de la Investigación</i>	32
4. Materiales y Métodos	33
4.1 <i>Materiales</i>	34
4.1.1 Cristalería de Laboratorio	36
4.1.2 Otros Materiales de Uso en el Laboratorio	35
4.1.3 Reactivos Químicos del Laboratorio	35
4.1.4 Equipos	36
4.2 <i>Métodos</i>	37
4.2.1 Fase de Preparación del Crudo	37
4.2.2 Fase de Fraccionamiento del Extracto	37
4.2.3 Ensayo de citotoxicidad con <i>Artemia salina</i>	39
4.2.4 Ensayo de citotoxicidad con <i>Solanum lycopersicum</i>	40
4.2.5 Bioensayos primarios para determinar Actividad Hipoglucémica	40
4.2.6 Caracterización estructural del compuesto presente en la fracción de mayor porcentaje de viabilidad celular	42
5. Resultados y Discusión	43
5.1 <i>Resultados</i>	44
5.1.1 Extracto de Hexano	44
5.1.1.1 Tratamiento del Extracto de Hexano con Carbón Activado	45

5.1.1.2 Fraccionamiento Primario del Extracto de Hexano	46
5.1.1.3 Fraccionamiento Secundario del Extracto de Hexano	48
5.1.1.4 Fraccionamiento Secundario del Extracto de Hexano	49
5.1.2 Extracto de Diclorometano	51
5.1.2.1 Tratamiento del Extracto de Diclorometano con Carbón Activado	51
5.1.2.2 Fraccionamiento Primario del Extracto de Diclorometano	52
5.1.2.3 Fraccionamiento Secundario del Extracto de Diclorometano	54
5.1.3 Resultados de la Citotoxicidad	55
5.1.3.1 Procesado de los Resultados de los Ensayos de Citotoxicidad	60
5.1.3 Resultados de la Fitotoxicidad	62
5.2 <i>Discusión</i>	66
5.2.1 Discusión de los Resultados de la Citotoxicidad	66
5.2.2 Discusión de los Resultados de la Fitotoxicidad	66
5.2.3 Caracterización de Compuestos	67
5.2.3.1 TLC Comparativas	67
5.2.3.2 Caracterización por UPLC-MS	68
5.2.3.3 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja	77
5.2.4 Actividades Biológicas del Lupeol	80
5.2.4.1 Actividad Antiinflamatorio	81
5.2.4.2 Agente Protector Dérmica	81
5.2.4.3 Agente Antiartrítica	82
5.2.4.4 Actividad Antimicrobiana	82
5.2.4.5 Actividad Antiparasitaria	82
5.2.4.6 Actividad Antidiabética	83
5.2.4.7 Agente Cardioprotector	83

5.2.4.8 Anticancerígeno	84
5.2.4.9 Tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer	84
5.2.4.10 Toxicidad	85
5.2.5 Actividades Biológicas del β -Sitosterol	86
5.2.5.1 Actividad Antiinflamatorio	86
5.2.5.2 Actividad Antiviral	87
5.2.5.3 Actividad Antioxidante	87
5.2.5.4 Carencia de Actividad Antidiabética	88
5.2.5.5 Inmunoestimulante	88
5.2.5.6 Anticancerígeno	88
5.2.5.7 Toxicidad	90
5.2.6 Actividades Biológicas de la Lupenona	91
5.2.6.1 Actividad Antiinflamatorio	91
5.2.6.2 Actividad Antiviral	92
5.2.6.3 Actividad Antiparasitaria	92
5.2.6.4 Actividad Antidiabética	93
5.2.6.5 Anticancerígeno	93
5.2.6.6 Toxicidad	94
6. Conclusiones y Recomendaciones	95
6.1 Conclusiones	96
6.2 Recomendaciones	97
7. Referencias	98
8. Anexos	110
8.1 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Patrones	111

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Historia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevas drogas	5
Tabla 2. Distribución de los manglares en los distintos países	18
Tabla 3. Fitoquímicos en las plantas de Manglares	24
Tabla 4. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Primario del Extracto de Hexano	46
Tabla 5. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Secundario del JEL-Hx-F-21	48
Tabla 6. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Terciario del JEL-Hx-S-7	49
Tabla 7. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Terciario del JEL-Hx-S-10 y 11	50
Tabla 8. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Primario del Extracto de Diclorometano	53
Tabla 9. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Secundario del Extracto de Diclorometano	55
Tabla 10. Resultados del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Hexano	56
Tabla 11. Resultados del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Diclorometano	57
Tabla 12. Primer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #1	57
Tabla 13. Segundo Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #1	58
Tabla 14. Tercer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #1	58
Tabla 15. Primer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #2	59
Tabla 16. Segundo Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #2	59
Tabla 17. Tercer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #2	60

Tabla 18. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Hexano	63
Tabla 19. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Diclorometano	63
Tabla 20. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #1	64
Tabla 21. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #2	64
Tabla 22. Desplazamientos Químicos del Espectro de RMN de Lupeol	114
Tabla 23. Desplazamientos Químicos del Espectro de RMN de β -Sitosterol	118

Lista de Ilustraciones

	Página
Figura 1. Digitoxina, Morfina, Acetil Salicílico, Salicina y Quinina	8
Figura 2. Penicilina	11
Figura 3. 4-acetoxidictilolactona, Dicitíolidos A y B y Nordictíolido	12
Figura 4. Espongouridina y Espongotimidina	13
Figura 5. Mapa donde describe la división del IWP y de la AEP donde cada una abarca 3 divisiones biogeográficas de la distribución de los Manglares.	18
Figura 6. Esquema del ensayo de Citotoxicidad	39
Figura 7. Esquema del ensayo de Fitotoxicidad	40
Figura 8. Diagrama para el ensayo de la α -Glucosidasa	42
Figura 9. Hojas de la <i>Mora oleífera</i>	44
Figura 10. Maceración y secado de extracto por medio de un rotavapor	44
Figura 11. Procedimiento para la separación de clorofila del extracto crudo de Hexano	45
Figura 12. TLC del Extracto de Hexano	45
Figura 13. Columna del Fraccionamiento Primario del Extracto de Hexano	46
Figura 14. Aspecto Físico del JEL-AA-14	47
Figura 15. Aspecto Físico del Hx-F-13,14 y 15	47
Figura 16. Aspecto Físico del Hx-F-17 y 18	47
Figura 17. Columna del Fraccionamiento Secundario del Extracto de Hexano	48
Figura 18. TLC de JEL-Hx-S-7, 10 y 11	49
Figura 19. Columna del Fraccionamiento Terciario del Extracto de Hexano	49
Figura 20. Columna del Fraccionamiento Terciario del Extracto de Hexano #2	50
Figura 21. TLC del Extracto de Diclorometano	51
Figura 22. Procedimiento para la separación de clorofila del extracto crudo de Diclorometano	52
Figura 23. Columna del Fraccionamiento Primario del extracto de Diclorometano	53
Figura 24. Columna del Fraccionamiento Secundario del extracto de Diclorometano	55
Figura 25. Procedimiento para el Ensayo de Citotoxicidad	56

Figura 26. Procedimiento para el Ensayo de Fitotoxicidad	62
Figura 27. TLC Comparativo de Fracciones con Patrones	67
Figura 28. Waters UPLC-MS Acquity®	68
Figura 29. Cromatograma del Lupeol	69
Figura 30. Espectro de Masas del Lupeol con ESI+	70
Figura 31. Espectro de Masas del Lupeol con ESI-	70
Figura 32. Espectro de MS/MS del Lupeol con ESI+	71
Figura 33. Espectro de MS/MS del Patrón de Lupeol con ESI+	71
Figura 34. Cromatograma del β -Sitosterol	72
Figura 35. Espectro de Masas del β -Sitosterol con ESI+	73
Figura 36. Espectro de Masas del β -Sitosterol con ESI-	73
Figura 37. Espectro de MS/MS del β -Sitosterol con ESI+	74
Figura 38. Espectro de MS/MS del patrón de β -Sitosterol con ESI+	74
Figura 39. Cromatograma de la Lupenona	75
Figura 40. Espectro de masas del Lupenona con ESI+	76
Figura 41. Espectro de MS/MS del Lupenona con ESI+	76
Figura 42. Alpha II Bruker® Espectrómetro de Infrarrojo con ATR	77
Figura 43. Espectro de Infrarrojo Medio de la Lupeol	78
Figura 44. Espectro de Infrarrojo Medio de la Lupenona	79
Figura 45. Lupeol	80
Figura 46. β -sitosterol	86
Figura 47. Lupenona	91
Figura 48. Espectro de ^{13}C -RMN de Lupeol	112
Figura 49. Espectro de ^1H -RMN de Lupeol	113
Figura 50. Espectro de ^{13}C -RMN de β -Sitosterol	116
Figura 51. Espectro de ^1H -RMN de β -Sitosterol	117

Sumario

Estudio Químico Biodirigido de *Mora oleífera* Manglar Endémico de Panamá y Colombia

Javier Liao, Lilia Chérigo¹, Sergio Martínez-Luis²

¹Universidad de Panamá, Departamento de Química Orgánica, ²Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología, Clayton, Panamá

Los manglares se caracterizan por ser una vegetación que crece en zonas costera de agua salada en regiones tropicales. Esta zona intermareal, que es formada por las mareas altas y bajas, produce cambios de salinidad y de temperatura que permite la proliferación de vida marina y de este tipo de vegetación. Además de este beneficio biológico, los manglares ayudan a proteger las zonas costeras de la erosión e inundaciones. Los manglares juegan un rol importante en el calentamiento global al ser capaz de reducir la emisión de CO₂. Por lo que se requiere una conservación de estas especies por todos los beneficios que este ecosistema trae.

El estudio fitoquímico de la especie *Mora oleífera*, que es una especie endémica de Panamá y Colombia, nos permite saber si esta planta puede poseer aplicaciones potenciales que permitan evitar la deforestación de los manglares en las zonas costeras para fines turísticos o lucrativos. Para este estudio se realizaron extracciones con distintos disolventes como hexano, diclorometano y acetato de etilo para su respectivo fraccionamiento por columna y posterior, elucidación estructural de los compuestos obtenidos de esta especie. También se realizó estudios de fitotoxicidad y citotoxicidad a los distintos extractos. En estudios previos se ha logrado identificar grupos de compuestos como flavonoides, triterpenos y otros fitoquímicos. En este trabajo se logró el aislamiento de 2 triterpenos lupeol y lupenona y un estero, el β -sitosterol.

1. Marco

Introdutorio

1.1 Marco Teórico

El término "producto natural" suele relacionarse para metabolitos secundarios, pequeñas moléculas (peso molecular < 1500 uma aprox.) producidas por un organismo, pero que no son necesarias para la supervivencia del organismo, a diferencia de las macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos que forman parte de la estructura básica para los procesos más fundamentales de la vida. Los metabolitos secundarios son un grupo muy amplio de compuestos, este concepto incluye productos de metabolismo de mecanismos de defensa, moléculas reguladoras, entre otros (Cannell, 1998).

Esta investigación tiene como objetivo descubrir nuevos compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales. Las plantas son probablemente la fuente más común de muestras de alto rendimiento de productos naturales. Han producido muchos compuestos útiles que son unos de los componentes importantes de los productos farmacéuticos modernos (Farnsworth & Soejarto, 1991).

No obstante, la gran mayoría de especies de plantas del mundo no se ha evaluado en cribados farmacéuticos, y el pequeño porcentaje que se ha probado generalmente se ha cribado para determinar su actividad frente a unas pocas dianas terapéuticas. La distribución geográfica de especies de plantas superiores no es aleatoria ya que esta depende de las condiciones climáticas, también se sabe que la química de varias familias de plantas difiere significativamente (Grifo, Newman, Fairfield, Bhattacharya, & Grupenhoff, 1997).

Los bosques de manglares se ubican con mayor frecuencia en la interfaz del océano y la tierra, dentro de pantanos apartados y en las desembocaduras de los ríos en ambientes estuarinos. El término mangle generalmente representa toda la flora presente en un pantano de bosque de

manglar, y el término bosque de mangle se refiere a aquellas especies dentro de mangle que taxonómicamente ahora se clasifican como bosque de manglar. El manglar se deriva de la palabra portuguesa *mangle*, del idioma taino indígena ahora extinto de las Bahamas y las Antillas Mayores, y del término inglés *grove*. Medido con respecto a los medios de vida humanos, el procesamiento de carbono, el apoyo a la pesca, el control de la erosión o la biodiversidad; Los manglares son uno de los ecosistemas más productivos del planeta, sin embargo, históricamente, son uno de los tipos de cubierta terrestre más subestimados e incomprendidos (Hamilton S. , 2020).

1.2 Productos Naturales

Los productos naturales son compuestos orgánicos que todos los organismos vivos producen y se puede dividir en tres categorías principales de compuestos:

(1) Los metabolitos primarios que son compuestos producidos en todas las células y tiene un papel importante en el metabolismo y la reproducción celular, estos son los ácidos nucleicos, los aminoácidos y los azúcares comunes (Dewick, 2002).

(2) Los polímeros de alto peso molecular, como los polisacáridos y las proteínas que forman las estructuras celulares (Hanson, 2003).

(3) Los metabolitos secundarios, moléculas pequeñas (peso molecular < 2000 u) producidas por un organismo y que no son estrictamente necesarios para la supervivencia del mismo (Sarker, Latif, & Gray, 2005).

Algunas vías son exclusivas de las plantas, como el ciclo de reducción de carbono en la fotosíntesis y la vía del ácido siquímico que produce, entre otras cosas, aminoácidos esenciales (como el triptófano) sin los cuales los animales no pueden vivir. Estos aminoácidos aromáticos también son necesarios para la producción de muchos compuestos fenólicos y nitrogenados específicos de las plantas. Pero hay vías comunes a las plantas, microbios y mamíferos son la vía de las pentosas fosfato, la glucólisis y el ciclo de Krebs que se ocupan de la respiración aeróbica y biosíntesis de adenosín trifosfato (ATP), la molécula de energía clave de la célula (Dewick, 2002). La mayoría de todos los productos esenciales están hechos de azúcares, acetyl CoA o aminoácidos que componen todas las proteínas de la planta, incluidas las enzimas más importantes de las vías metabólicas (Hanson, 2003).

Los metabolitos secundarios se encuentran en organismos específicos y son producidos bajo condiciones definidas a una necesidad individual. En la mayoría de estos metabolitos tienen funciones y beneficios desconocidos para el organismo. Algunos son producidos por razones como para defenderse contra los depredadores, y a menudo desempeñan un papel ecológico como atrayentes con el fin de provocar un comportamiento determinado en otro individuo de la misma u otra especie; o colorantes para atraer o advertir a otras especies (Dewick, 2002).

Los componentes bioactivos de los organismos se han estudiado durante el desarrollo de la química y se estima que más del 40% de los medicamentos tienen su origen en estos productos naturales (Hanson, 2003).

1.2.1 Historia de los Productos Naturales

Históricamente, los productos naturales se han utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de muchas enfermedades y dolencias (Tabla 1). Las metodologías clásicas de química de productos naturales permitieron descubrir una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos de fuentes terrestres y marinas. Muchos de estos productos naturales se han convertido en candidatos a fármacos actuales.

Tabla 1. Historia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevas drogas*

Período	Acontecimiento
2900 a. C.	El papiro de Ebers es un registro farmacéutico egipcio, que documenta más de 700 medicamentos a base de plantas que van desde gárgaras, píldoras, infusiones y ungüentos

2600 a. C.	Los primeros registros de productos naturales fueron representados en tablillas de arcilla en escritura Mesopotamia que documentaron aceites de <i>Cupressus sempervirens</i> (ciprés) y especies de <i>Commiphora</i> (mirra) que todavía se utilizan hoy en día para tratar la tos, los resfriados y la inflamación
300 a. C.	El filósofo y científico natural griego Teofrasto se ocupó de las hierbas medicinales.
100 a. C. – 659 d. C.	El Compendio de Materia Médica es un volumen de herbología chino con registros documentados de los usos de productos naturales donde Wu Shi Er Bing Fang contiene 52 recetas, Shennong Herbal, 365 medicamentos y Tang Herbal, 850 medicamentos.
Siglo V	Los monasterios de Inglaterra, Irlanda, Francia y Alemania conservaron este conocimiento occidental, mientras que los árabes preservaron el conocimiento grecorromano y ampliaron los usos de sus propios recursos, junto con hierbas chinas e indias desconocidas para los grecorromanos. mundo
Siglo VIII	Fueron los árabes los primeros en poseer farmacias privadas con Avicena (un farmacéutico y médico) que contribuyó mucho a las ciencias de la farmacia y la medicina a través de obras como el <i>Canon Medicinae</i>
Siglo XVII	El hongo de campo <i>Agaricus campestris</i> según los informes, se había cocido en leche para aliviar el cáncer de garganta
Siglo XVIII	Se descubrió que el alga roja <i>Porphyra umbilicalis</i> , tomada todas las mañanas seguido de ayuno durante tres semanas, es eficaz contra el cáncer, en particular el cáncer de mama.

*Tabla confeccionada basándose en (Cragg & Newman, 2005) y (Vickery, 1995)

1.2.2 Productos Naturales de Importancia Histórica

La *Digitalis purpurea* L. (dedalera) se remonta a Europa en el siglo X, pero no fue hasta la década de 1700 cuando se descubrió que el componente activo digitoxina (Figura 1), un glucósido cardiotónico, mejora la conducción cardíaca, mejorando así la fuerza de la contractibilidad cardíaca (Der Marderosian & Beutler, 2003).

La investigación de *Papaver somniferum* L. (adormidera) resultó en el aislamiento de varios alcaloides, incluida la morfina (Figura 1), una droga de importancia comercial, reportada por primera vez en 1803. En la década de 1870, la morfina bruta derivada de la planta *P. somniferum* se hirvió en anhídrido acético para producir diacetilmorfina (heroína) y se descubrió que se convertía fácilmente en codeína (analgésico). Históricamente, está documentado que los sumerios y los antiguos griegos usaban extractos de amapola con fines medicinales, mientras que los árabes describían el opio como adictivo (Der Marderosian & Beutler, 2003).

Otro derivado de producto natural más famoso y conocido hasta la fecha sería la síntesis del agente antiinflamatorio, ácido acetilsalicílico (Figura 1) o mejor conocida como la aspirina derivado del producto natural, salicina (Figura 1) aislado de la corteza del sauce *Salix alba* L. (Der Marderosian & Beutler, 2003).

El fármaco antipalúdico quinina (Figura 1) aprobado por la FDA de los Estados Unidos en 2004, fue aislado de la corteza de *Cinchona succirubra* Pav. ex Klotsch, esta había sido utilizado durante siglos para el tratamiento de la malaria, la fiebre, la indigestión, las enfermedades de la boca y la garganta y el cáncer (Der Marderosian & Beutler, 2003).

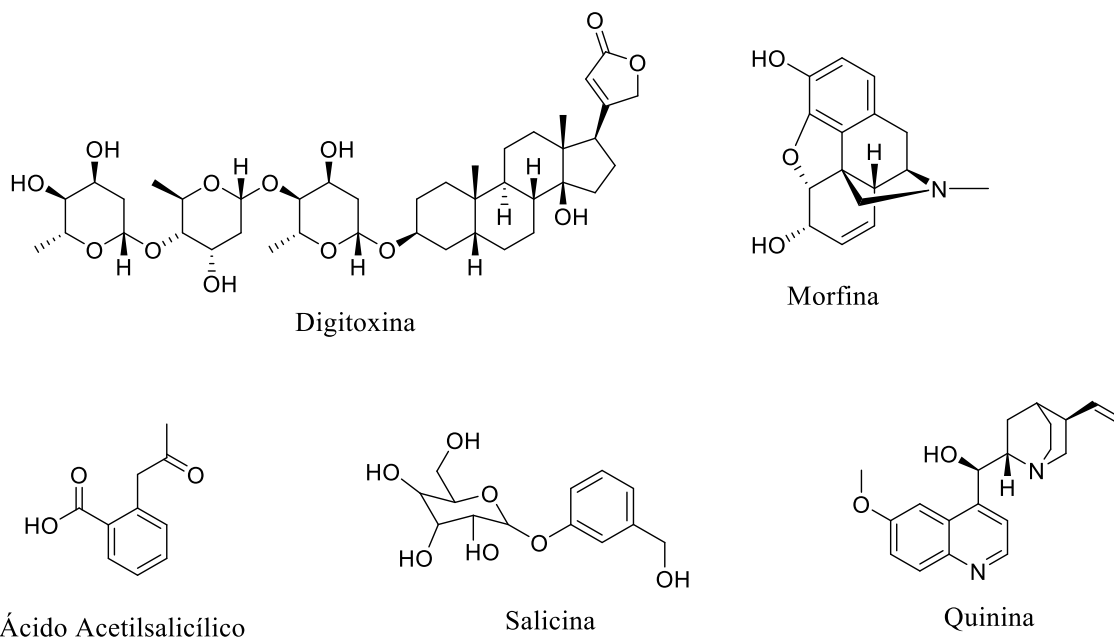


Figura 1. Digitoxina, Morfina, Acetil Salicílico, Salicina y Quinina

1.2.3 Importancia de los Productos Naturales

A lo largo de la historia, los productos naturales de las plantas han desempeñado funciones importantes y sostenibles en la vida de los seres humanos, especialmente como fuentes de alimentación y productos medicinales. Se sabe que las plantas alimenticias y especias culinarias contienen una miríada de fitoquímicos y compuestos bioactivos con propiedades medicinales. Los fitoquímicos no se consideran esenciales para el funcionamiento normal del cuerpo, ya que su ausencia no conduce a condiciones de deficiencia como las de las vitaminas convencionales. No obstante, tres décadas de investigación revelaron que las enfermedades crónicas asociadas con el envejecimiento son más fáciles de prevenir que de tratar, y que el alimentos ricos en fitoquímicos puede reducir el riesgo de desarrollar tales afecciones (Aggarwal, Takada, & Oommen, 2004).

Los compuestos bioactivos (que actúan de forma individual o sinérgica) ayudan a reducir el riesgo de una variedad de afecciones crónicas e inflamatorias. Estos incluyen aterosclerosis y accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, ciertos tipos de cánceres, diabetes mellitus, alergia, asma, artritis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, psoriasis, shock séptico, SIDA, síntomas de la menopausia y neurodegeneración. Ciertos fitoquímicos suprimen la proliferación de células cancerosas y también revierten la quimiorresistencia y la radiorresistencia en pacientes sometidos a tratamiento contra el cáncer (Aggarwal, Takada, & Oommen, 2004).

1.3 Fuentes de Productos Naturales

Las fuentes de los productos naturales son diversas ya que provienen de la naturaleza y estas se pueden categorizar en fuentes terrestres y acuáticas:

1.3.1 Fuentes Terrestres

1.3.1.1 Plantas

Las plantas son fuentes importantes para el descubrimiento de nuevos fármacos debido a su abundancia de productos naturales. Los metabolitos secundarios de moléculas pequeñas, como terpenoides, flavonoides y alcaloides, son utilizados para la supervivencia de la planta.

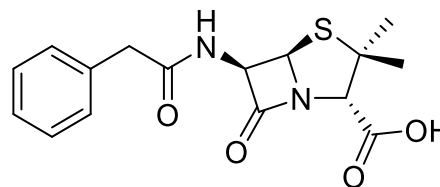
Los *terpenoides* actúan a través de una amplia red modulando varios factores reguladores, vías de señalización, enzimas y proteínas para inhibir el crecimiento, la proliferación, la invasión, la metástasis y la angiogénesis de diferentes tipos de células cancerosas (Huang, et al., 2012; Sobral, Xavier, Lima, & de Sousa, 2014).

Los *flavonoides* poseen una amplia gama de mecanismos que actúan para inhibir los procesos involucrados en la carcinogénesis como la proliferación, inflamación, invasión, metástasis y activación de la apoptosis (Busch, et al., 2015).

Los *alcaloides* actúan de muchas formas diferentes para inhibir la proliferación de células cancerosas. Uno de los principales mecanismos de los alcaloides de la vinca (una fuente importante de fármacos contra el cáncer) es su capacidad para interactuar con la tubulina y alterar la función de los microtúbulos (Moudi, Go, Yien, & Nazre, 2013).

1.3.1.2 Microorganismos Terrestres

Los microorganismos procariotas y eucariotas han proporcionado algunos de los medicamentos más eficaces en la era moderna. Sin duda, uno de los descubrimientos más famosos de productos naturales derivados de un hongo (microorganismo) es el de la



Penicilina

Figura 2. Penicilina

penicilina (Figura 2) del hongo *Penicillium notatum* descubierto por Fleming en 1929 (Buss & Butler, 2010). Se requirió una técnica de separación extractiva a contracorriente que produjo penicilina con altos rendimientos para la experimentación *in vivo* que finalmente salvó innumerables vidas y así logrando que Chain y Florey (junto con Fleming) ganar el premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1945. Este descubrimiento condujo al aislamiento y los estudios clínicos de Chain, Florey y colaboradores a principios de la década de 1940 y la comercialización de penicilinas sintéticas, que finalmente revolucionaron la investigación de descubrimiento de fármacos (Nobel Lecture, 1946).

1.3.1.3 Animales terrestres

Las investigaciones de fisiología y patología humana, han descubierto muchas moléculas bioquímicas, con acciones biológicas en el cuerpo humano, por ejemplo, neurohormonas (adrenalina e histamina), hormonas peptídicas (insulina y glucagón), hormonas sexuales (estrógenos, progesterona y testosterona) y prostaglandinas (prostaglandina E1 y E2) (Chin, Balunas, Chai, & Kinghorn, 2006).

1.3.2 Fuentes Acuáticas

Aunque las plantas han demostrado ser una fuente novedosa de productos naturales bioactivos, el medio marino cubre un 70% de la superficie por océanos por lo que tiene para ofrecer nuevos productos naturales debido a su poca exploración y posee una gran variedad de organismos marinos como las algas, esponjas, ascidias, tunicados y briozoos. Las empresas farmacéuticas comenzaron a darse cuenta de que el océano poseería una biodiversidad única y podría ser una posible fuente de posibles fármacos candidatos (Marri, 2006).

1.3.2.1 Algas Marinas

Las algas marinas están representadas por al menos 30 000 especies en todo el mundo que suministran oxígeno a la biosfera, alimento para peces y el hombre, medicinas y fertilizantes, además de ser una fuente prolífica de productos naturales estructuralmente únicos (Faulkner, 2002). Los terpenoides son una clase de compuestos predominantemente aislados de las algas marinas en los años 1970-1980. Un ejemplo de es el alga parda, *Dictyota dicotoma* proporcionó diterpenos, 4-acetoxidictilolactona, diciólidos A y B y nordictiólido (Figura 3) que muestran actividades antitumorales (Ishitsuka & Kusumi, 1988)

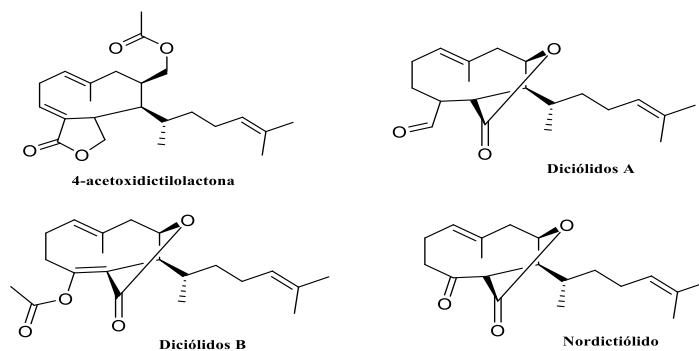


Figura 3. 4-acetoxidictilolactona, Diciólidos A y B y Nordictiólido

1.3.2.2 Esponjas Marinas

Las esponjas Poríferas son organismos sésiles, que carecen de sistema nervioso, digestivo, circulatorio y mantienen un flujo constante de agua a través de sus cuerpos para obtener alimento, oxígeno y eliminar desechos. El primer descubrimiento notable de compuestos bioactivos de fuentes marinas es sobre el aislamiento e identificación de nucleósidos C, espongouridina y espongotimidina de la esponja del Caribe, *Cryptotheca crypta* a principios de la década de 1950 (Figura 4). Se encontró que estos compuestos poseen actividad antiviral y la síntesis de análogos estructurales condujo al desarrollo de arabinósido de citosina (Ara-C) como agente anticanceroso clínico, junto con (Ara-A) como agente antivírico 15 años después (McConnell, Longley, & Koehn, 1994).

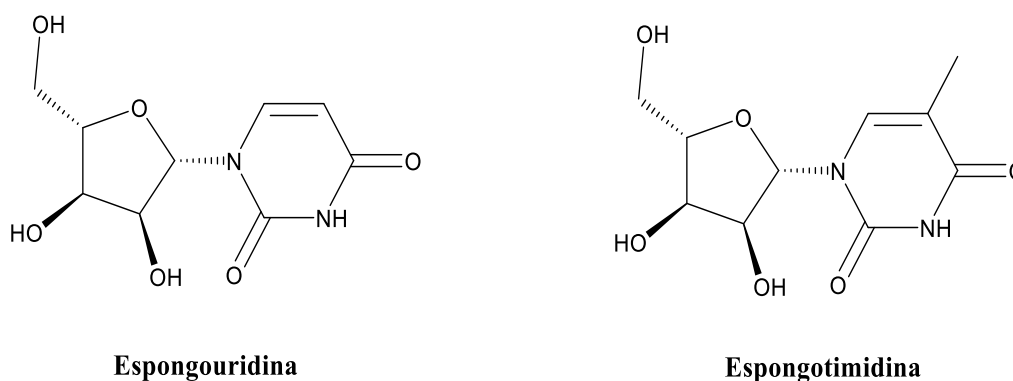


Figura 4. Espongouridina y Espongotimidina

1.3.2.3 Briozoos

La clase de derivados sintéticos conocidos como briólogos, se derivan de la briostatina 1, un compuesto antineoplásico aislado del briozoo *Bulgula neritina* (Chin, Balunas, Chai, & Kinghorn, 2006). Actualmente, se encuentran en dos ensayos clínicos de fase I y están siendo evaluados como un medicamento contra el Alzheimer (Mayer, et al., 2010).

1.4 Manglares y su historia

1.4.1 Historia de los Manglares

Un consenso general sugiere que los ecosistemas de manglares aparecieron por primera vez a finales de la era Cretácico-Terciario temprano en las orillas del mar de Tetis (Ellison, Farnsworth, & Merkt, 1999). Los géneros modernos de manglares surgieron en las costas orientales de Tetis, se diversificaron hacia las actuales regiones del Indo-Pacífico Occidental o IWP (por sus siglas en inglés Indo-West Pacific) y luego se dispersaron en las regiones del Atlántico-Pacífico Oriental o AEP (por sus siglas en Atlantic East Pacific) hace 3 millones de años (Steenis, 1962).

Los manglares se han estudiado desde la antigüedad. Los árboles de *Rhizophora*, manglares verdaderos, encontrados en el Mar Rojo y en el Golfo Pérsico, fueron los primeros registros conocidos descritos por Nearchus (325 a.C.) y Teofrasto (305 a.C.). Plutarco (70 d.C.) y Abou'l Abass (1230) también registró sobre *Rhizophora* y sus plántulas (MacNae, 1968; Chapman, 1976). En 1981, Rollet hizo la bibliografía de la investigación sobre manglares en la que mencionó solo 14 referencias antes de 1600, 25 referencias del siglo XVII, 48 referencias en el siglo XVIII y 427 en el siglo XIX (Kathiresan & Bingham, 2001). Por el contrario, hubo 4500 referencias de manglares entre 1900 y 1975 y aproximadamente 3000 entre 1978 y 1997, lo que ilustra la explosión del interés por los manglares (Kathiresan & Bingham, 2001).

Los portugueses fueron los primeros europeos en visitar los bosques de manglares del Océano Índico durante el siglo XIV y aprendieron la técnica del cultivo de arroz-peces-manglares. Esta tecnología india también fue transferida a los países africanos de Angola y Mozambique por los padres jesuitas y franciscanos hace unos seis siglos. Durante el siglo XIX, los británicos

aprendieron sobre cómo manejar los manglares para la producción comercial de madera en Sunderban por los lugareños (Vannucci, 1997).

La "hipótesis del centro de origen" sugiere que las condiciones para la invasión del hábitat de los manglares ocurrieron principalmente en el sureste de Asia / Malasia en la mayor parte del Terciario, restringiendo la mayoría de los taxones de manglares al IWP debido a su escasa capacidad de dispersión. Durante el Terciario medio, los manglares se dispersaron hacia AEP debido al cierre de la conexión de Tetis con el Atlántico. Además, sugirieron que el sureste de Asia / Malasia podría actuar más como un refugio que como un centro de origen (Ricklefs & Latham, 1993).

1.4.2 Características de los Manglares

Los manglares, el bosque intermareal, luchan en todo momento contra las fuertes mareas mientras se adentran en la zona de interfaz de la tierra y el mar. Existen varias características comunes en muchas especies conocidas como manglares: (Hogarth, 2015)

- La adaptación primaria del bosque de manglar que le permite a las plantas de manglar florecer tanto en suelos anegados como anaerobios son las estructuras adaptativas de las raíces. Muchas raíces de las plantas de mangle permiten una respiración eficiente a través de cientos de pequeños poros conocidos como lenticelas que permanecen por encima o cerca del nivel del agua durante las mareas altas obteniendo así oxígeno del aire circundante.
- Los mecanismos adaptativos de los manglares que les permite existir en ambientes altamente salinos varían de una especie a otra, en términos generales pueden clasificarse

en tres categorías. Primero, muchas raíces de especies de manglar son efectivas para filtrar gran parte del agua salada antes de que ingrese a los órganos internos de la planta. Segundo, muchos manglares almacenan el exceso de sal en la corteza vieja o en sus hojas. Tercero, muchos manglares han desarrollado la capacidad de secretar sal a través de las glándulas de las hojas.

- La agrupación de manglares generalmente parece requerir aislamiento taxonómico de los parientes terrestres o, al menos, dominio en el medio acuático en oposición al medio terrestre, para agruparse en la clase de "manglar verdadero".
- La tendencia de los manglares a existir con una fidelidad geográfica a la que se refiere en rodales densos compuestos por una sola especie de manglar con una delineación geográficamente clara cuando se hace la transición de una región a otra.
- Muchos manglares exhiben viviparidad. Esta es la condición por la cual el embrión crece primero para atravesar la capa de semillas, luego fuera de la pared de la fruta, mientras aún está unido a la planta madre. Luego estas caen y son transportadas por factores físicos para su posterior crecimiento.

Este bosque intermareal protege a las personas que viven en zonas propensas a desastres naturales como inundaciones por las altas mareas. Todo el mundo sabe que las raíces de una planta se entierran en el suelo y salen al aire, pero los manglares son una excepción ya que no sigue estos fenómenos habituales. Aquí hay algunas raíces de manglares que crecen sobre el suelo contra la gravitación, inhalando aire con su tallo (Mandal & Bar, 2019).

Los científicos tienen una visión general de que las especies taxonómicamente diferentes exhiben un patrón común de adaptaciones convergentes a los hábitats salinos y anóxicos. Estas adaptaciones incluyen el sistema de raíces aéreas, hojas esclerófilas suculentas y plántulas

vivíparas, rasgos más adecuados para el sustento de condiciones salinas (Ellison, Farnsworth, & Merkt, 1999). Por lo tanto, las comunidades de manglares son más un ensamblaje ecológico que un agrupamiento taxonómico o morfológico (Saenger, 2002).

Las modificaciones morfológicas y anatómicas de cuatro órganos (raíz, brote, hoja y parte reproductiva) en relación con el sustento de las comunidades vegetales que crecen en los hábitats intermareales. Las especies que exhiben un mayor grado de modificaciones de órganos esenciales para la estrategia de supervivencia en los hábitats intermareales se consideran manglares importantes y aquellas con órganos menos modificados se consideran asociadas al manglar. Los dorsales no presentan ninguna modificación de órganos, sino que son meras comunidades que crecen en el límite periférico de las zonas intermareales (Mandal & Naskar, 2008).

1.4.3 Distribución de los Manglares

La vegetación de manglares se encuentra en áreas con ciertas características ambientales como: (1) precipitación anual que oscile entre 1500 y 2500 mm (2) entrada de agua dulce fluvial que sea sustancial (3) temperatura moderada que oscile entre 20-35°C (Blasco, 1984). En términos generales, se consideran dos regiones biogeográficas para la distribución de manglares en todo el mundo (Figura 5), como los principales centros de diversidad: (Tomlinson, 1986)

- *Atlántico-Pacífico Oriental (AEP)*: El trópico del Nuevo Mundo se encuentra dentro de las longitudes 15°0'E – 120°0'O, que comprende tres regiones de los cuales son África Occidental, América Oriental y América Occidental.

- *Indo-Pacífico Occidental (IWP)*: El trópico del Viejo Mundo está situado entre las longitudes 30°0'E – 170°0'E, que comprende tres regiones de los cuales son Australasia, Indo-Malesia y África Oriental.

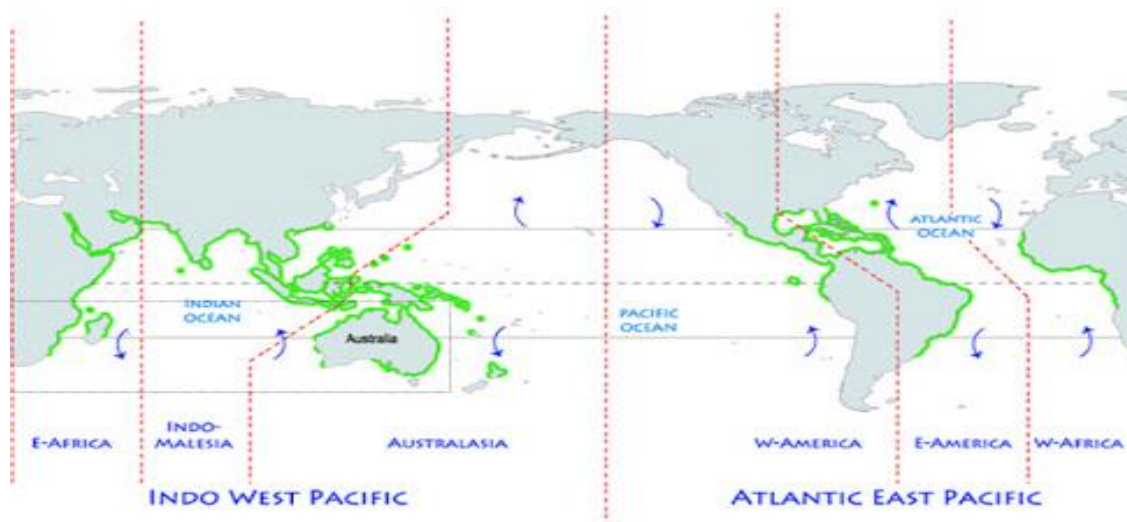


Figura 5. Mapa donde describe la división del IWP y de la AEP donde cada una abarca 3 divisiones biogeográficas de la distribución de los Manglares. Tomada de

<http://www.fishingcatcambodia.org/in-praise-of-mangroves/>

Tabla 2. Distribución de los manglares en los distintos países*

País	Área de cobertura de manglares (km ²)
Indonesia	23 143
Brasil	7 663
Malasia	4 691
Papua Nueva Guinea	4 169
Australia	3 315

México	2 985
Nigeria	2 653
Birmania	2 508
Venezuela	2 401
Filipinas	2 060
Tailandia	1 678
Bangladesh	1 876
Colombia	1 773
Cuba	1 672
Estados Unidos	1 553
Panamá	1 323
Mozambique	1 223
Camerún	1 113
Gabón	1 081
Ecuador	935

*Tabla tomado de (Hamilton & Casey, 2016)

En el 1997, el estimado del área total de manglares en el mundo fue de 181 077 km² (Spalding, Blasco, & Fields, 1997). En 2007, la FAO estimó alrededor de 154 704,5 km² de área de manglares en el mundo, aproximadamente un 14,5% menos del estudio anterior. El último estudio estimó el área total de bosques de manglares del mundo en 137 760 km² que cubren 118 países, que resultaría un 12% menos de la estimación de la FAO, que representa el 0,7% del total de bosques tropicales del mundo (Giri, et al., 2011).

1.4.4 Clases de Manglares

Históricamente, los manglares fueron vistos por primera vez en la zona IWP donde predominaban familias características en dicha región. A lo largo de la historia, estas familias de manglares fueron llevadas a la zona AEP por medio de las exploraciones durante el período del descubrimiento de América que permitió intercambios de conocimiento y de especies, que en este caso fueron los manglares. Con el tiempo estos manglares se fueron adaptando a las condiciones climáticas de la región y estas adaptaciones generaban cambios en sus órganos por lo que se obtenían nuevas familias de manglares (Spalding, Blasco, & Fields, 1997).

1.4.4.1 Indo-Pacífico Occidental (IWP)

Tres especies de manglares *Rhizophora* más importante que se encuentran en el Indo-Pacífico Occidental son: (1) *R. mucronata* es la más común y la más extendida y se extiende desde Malaya hasta Nueva Guinea, las islas Ryu-Kyu y África; (2) *R. stylosa* se encuentra desde Malasia hasta Queensland y parece estar restringida a las costas al abrigo de los arrecifes de coral, que suelen ser arenosos.; (3) *R. apiculata* desde Malaya a través del sudeste asiático hasta India y Ceilán y al norte de Queensland, es más tolerante al agua dulce que los demás (Watson, 1928).

En Australia y el sur de Nueva Guinea se encuentra en suelos fangosos que están colonizados por *R. mucronata*. Por otra parte, la mayoría de los bosques vírgenes de rhizophora en el sudeste asiático y las islas contiguas, hay un abundante bosque de *Ceriops tagal*, *C. decandra*, *Bruguiera cylindrica* y *B. parviflora*, siendo el primero y último el más común. Todos estos

árboles forman un sotobosque que alcanza unos 15-20 m de altura en estas condiciones (Cuong & Van, 1964).

1.4.4.2 Atlántico-Pacífico Oriental (AEP)

Rhizophora mangle (comúnmente conocido como mangle rojo) es la especie más representativa en la zona AEP *Rhizophora*. Ocurre de forma natural y domina las áreas de mareas tropicales a ambos lados del Atlántico. También es de gran interés la presencia natural del mangle rojo en las islas del suroeste del Pacífico. Este grupo de especies es uno de los dos que componen el género *Rhizophora* y consta de tres especies: *R. mangle*, *R. samoensis*, *R. racemosa* y un híbrido: *R. harrisonii*. También se encuentra en esta región otro taxón híbrido, *R. selala* y *R. stylosa*. Los manglares rojos, en particular *R. mangle*, también se han introducido en nuevos sitios en el Pacífico Indo-Occidental (IWP) durante el último siglo (Tomlinson, 1986).

1.4.5 Peligro de Extinción de los Manglares

Las principales amenazas para todas las especies de manglares son el cambio climático, la destrucción del hábitat por medio de la deforestación, tala, derrame de petróleo, productos químicos tóxicos y vertido de desechos y la remoción de áreas de manglares para la recuperación de suelos el desarrollo urbano y la sobreexplotación (Polidoro, et al., 2010).

A nivel mundial, las áreas de manglares están disminuyendo rápidamente a medida que se talan para el desarrollo urbano y costero, agricultura y la acuicultura y se talan para la producción de madera y combustible. Las áreas particulares de preocupación geográfica incluyen las costas del Atlántico y el Pacífico de América Central, donde hasta el 40% de las especies de manglares

presentes están amenazadas de extinción. La pérdida de especies de manglares tendrá consecuencias económicas y ambientales devastadoras para las comunidades costeras, especialmente en aquellas áreas con baja diversidad de manglares y alta área de manglares o pérdida de especies. Varias especies en alto riesgo de extinción pueden desaparecer mucho antes de la próxima década si no se aplican las medidas de protección existentes (Polidoro, et al., 2010).

Es importante la restauración ecológica de manglares tiene un impacto a largo plazo que beneficia tanto directa como indirectamente a las comunidades y al medio costero. La protección de la costa, el ciclo de los nutrientes, la amortiguación de las calamidades naturales, la restauración de la pesca y la vida silvestre, son beneficios directos que se aprovechan de la restauración ecológica, además del apoyo a los medios de vida de la población local que depende de los recursos del bosque (Saenger, 2002).

1.5 Productos Naturales encontrados en Manglares de América

Se ha informado de polen de manglar de *Rhizophora*, *Avicennia* y *Pelliciera* en la Formación Gatuncillo, Panamá, desde el Eoceno medio al tardío (40 Ma). Cualquiera que sea la procedencia y llegada de los manglares a América, una tendencia es clara en la región del Golfo y el Caribe: un aumento gradual en la diversidad de verdaderos manglares y especies asociadas (Graham, 1995).

En esta región, las áreas costeras fueron ocupadas durante el Eoceno temprano por cuatro géneros principales, *Acrostichum*, *Nypa*, *Pelliciera* y el ahora extinto *Brevitricolpites variabilis*. Para el Plioceno medio, estaban presentes seis verdaderos manglares y tres especies asociadas: *Acrostichum*, *Avicennia*, *Crenea*, *Laguncularia*, *Pelliciera*, *Rhizophora* y *Acacia*, *Hampea*, *Hibiscus* y *Pachira*, respectivamente (Graham, 1995).

1.5.1 Compuestos Bioactivos de los Manglares

Los fitoquímicos derivados de hojas, cortezas, tallos, raíces, flores, frutos y semillas de plantas de manglar. Más de 200 compuestos bioactivos obtenidos de estas plantas son alcaloides, alcoholes alifáticos, aminoácidos, ácidos grasos libres, carotenoides, carbohidratos, feromonas, esteroides, hidrocarburos, lípidos, triterpenos, taninos y fenoles (Wu, et al., 2008; Bandaranayake, 2002).

Tabla 3. Fitoquímicos en las plantas de Manglares

Familia Botánica	Partes de la Plantas Utilizada	Fitoquímicos
<i>Acrostichum</i> *	Hojas y partes aéreas	Alcaloides, glucósidos, saponinas, taninos, esteroides, fenoles, polifenoles, flavonoides, terpenoides y azúcares reductores
<i>Rhizophora</i> **	Hojas, corteza y fruto	Alcaloides, carotenoides, alcoholes alifáticos, aminoácidos, ácidos grasos libres, carbohidratos, hidrocarburos, feromonas, lípidos, esteroides, triterpenos, taninos y fenoles
<i>Avicennia</i> ***	Hojas, tallos, semilla, corteza	Polifenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, ácido betulínico, lupeol, ácidos carboxílicos, fitoalexinas, esteroides, fitoesteroles, tocoferoles, terpenos, ácidos grasos, carotenoides, alcoholes alifáticos, proteínas, xantoproteínas, carbohidratos, resinas, coumarinas y glucósidos

Referencias: *= (Khan, Hossain, Panthi, Asadujjaman, & Hossin, 2013; Thomas, Peter, & Chandramohanakumar, 2016), **= (Rohini & Das, 2009; Ramanathan, Hariharan, & Ganesan, 2008), ***= (Shanmugapriya, Ramanathan, & Renugadevi, 2012; Ravikumar, Gnanadesigan, Suganthi, & Ramalakshmi, 2010; Poompozhi & Kumarasamy, 2014)

1.5.1.1 Algunos compuestos Bioactivos encontrado en Manglares

Algunos triterpenos y esteroides encontrados en los manglares son: α -amirina, β -amirina, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido betulínico, kaempferol, quercetina, quercetrina (López, Chérigo, Spadafora, Loza-Mejía, & Martínez-Luis, 2015). Flavonoides como la rutina, isovitexina, vitexina, isoorientina. Y taninos como la: punicalagina, punicalina, terflavinas A y B, tergalagin, tercatina, geranina, granatina B, corilagina (Ahmed, Swamy, Gopkumar, Dhanapal, & Chandrashekara, 2005).

1.5.2 Usos Medicinales de los Manglares

Rhizophora mucronata, *R. mangle*, *Avicennia africana*, *A. officinalis*, *A. marina*, *Nypa fruticans* son buenas fuentes de antioxidantes naturales entre las plantas de manglares seleccionadas (Vadlapudi & Naidu, 2009). Estos manglares se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades de la piel, lepra, úlceras, tuberculosis, elefantiasis, malaria y disentería (Prabhakaran & Kavitha, 2012).

Las plantas de manglar también se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento del asma, artritis dolorosa, reumatismo, inflamación y diabetes (Roome, Dar, Naqvi, & Choudhary, 2011). Pueden producir metabolitos naturales con diferentes actividades biológicas como antioxidante, hepatoprotector, larvicida de mosquitos, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antidiarreico, antialimentario, insecticida y citotóxico (Babu, Shylesh, & Padikkala, 2001; Rouf, Uddin, Shilpi, & Alamgir, 2007).

Las especies de *Rhizophora* (como *R. apiculata*, *R. mucronata* y *R. mangle*) son fuentes de compuestos bioactivos bien conocidos y útiles desde el punto de vista médico, como alcaloides,

glucósidos, aceites esenciales y otros compuestos orgánicos (Afidah, et al., 2008). Principalmente, los fenoles vegetales son fuentes de antioxidantes naturales que pueden encontrarse en todas las partes de las plantas, como hojas, raíces, cortezas, frutas, verduras, nueces y semillas (Loo, Jain, & Darah, 2007). *R. apiculata* se usa ampliamente en la industria del carbón vegetal en Malasia y su corteza puede producir altos rendimientos de taninos (Jain, Afidah, & Azman, 2002).

En estudios anteriores para manglares endémicos de Panamá, se aislaron grupos de compuestos como triterpenos, flavonoles y ditiolanos, donde los triterpenos y flavonas mostraron actividad antiparasitario e inhibición de la α -glucosidasa. Además, solo los triterpenos pentacíclicos exhibieron un tipo competitivo de inhibición contra la α -glucosidasa (López, Chérigo, Spadafora, Loza-Mejía, & Martínez-Luis, 2015).

Para las especies de *Avicennia* se encontró que tienen diversas propiedades medicinales contra el VIH, cáncer, diarrea, hepatitis, diabetes, inflamación, enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, entre otros. La resina de *Avicennia alba* se usa en el control de la natalidad, tratamiento de úlceras, remedio de enfermedades de la piel y también se usa para curar tumores (Rege, Ambaye, & Deshmukh, 2010).

2. Problemática y Justificación

2.1 Problemática de la Investigación

El aumento de la resistencia de las bacterias, células cancerosas y parásitos es común hoy en día. Por ello, el ser humano se encuentra en una búsqueda constante de nuevos tratamientos para combatir todos estos agentes malignos. Las plantas han sido una fuente tradicional de compuestos con potencial terapéutico, por lo que no sería de extrañar que en plantas poco estudiadas pudiéramos encontrar fármacos potenciales. En el caso de la planta evaluada en el presente estudio, carecen de actividades antiparasitarias y anticancerígenas, lo que no nos sorprende debido a que no existen muchos reportes sobre fuentes similares con estas actividades (López, Chérigo, Sedas, Spadafora, & Martínez-Luis, 2018). La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con daño, disfunción e insuficiencia a largo plazo de varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2011).

La α -glucosidasa, una enzima clave relacionada con la diabetes mellitus, es una enzima intestinal que descompone los carbohidratos en monosacáridos. Por lo tanto, su inhibición retrasa la absorción de carbohidratos ingeridos, disminuyendo los picos de glucosa e insulina en la sangre posprandial (Lebovitz, 2020). En la medicina tradicional de diferentes países, existen preparaciones de plantas medicinales con efecto hipoglucemiante reputado, incluyendo algunos provenientes de plantas de manglar (Chan, Sun, Reddy, & Wu, 2010).

2.2 Justificación e Importancia de la Investigación

En la literatura podemos encontrar varios reportes del uso de preparados provenientes de plantas de manglar para el tratamiento de la diabetes; sin embargo, existen muy pocos estudios científicos especializados que avalen las propiedades medicinales atribuidas. Basado en la investigación antidiabética llevada a cabo sobre plantas de manglar, se ha sugerido que estas plantas pueden exhibir su acción antidiabética de varias maneras, tales como: (López, Chérigo, Sedas, Spadafora, & Martínez-Luis, 2018)

- Actividad mimética de la insulina
- Disminución de la absorción intestinal de glucosa
- Ejerciendo un efecto antioxidante (disminuyendo así las complicaciones diabéticas asociadas al estrés oxidativo)

Estudios previos realizados en el grupo de investigación de la Dra. Chérigo y el Dr. Martínez, revelan que algunos extractos orgánicos de manglares panameños poseen un potencial antiparasitario e inhibitorio de la enzima α -glucosidasa. En estudios anteriores se aislaron tres grupos de compuestos (triterpenos, flavonoles y ditiolanos). Los triterpenos y las flavonas mostraron actividad en al menos un bioensayo (antiparasitario o inhibición de la α -glucosidasa). Además, los triterpenos pentacíclicos exhibieron un tipo competitivo de inhibición contra la α -glucosidasa (López, Chérigo, Spadafora, Loza-Mejía, & Martínez-Luis, 2015).

Con esta información como antecedente, es altamente probable que otras especies de mangles presenten actividades biológicas similares prometedoras, esto justifica realizar estudios químicos en la especie de mangle seleccionada.

Además de su importancia económica como extracción, los manglares juegan un papel esencial de mitigación, particularmente en lo que respecta a la defensa contra tormentas o grandes caudales. Este papel a menudo beneficia directamente a las comunidades locales que viven junto a los manglares. Por ejemplo, los bosques de manglar reducen la energía de las olas, lo que limita el daño a las comunidades locales debido a las grandes corrientes de agua; reducen el daño del tsunami al romper y reducir la energía de las olas entrantes; reducen la erosión al amortiguar la energía de las olas, y los bosques de manglares pueden incluso mitigar el aumento del nivel del mar (Costanza, et al., 2014).

Los manglares y los estuarios en los que residen, proporcionan algunos de los mayores valores económicos del planeta. La tasa y el alcance de la deforestación global de manglares y las perturbaciones estuarinas asociadas causan una lenta valoración económica de estos ecosistemas por parte de los economistas (Blaber, 2007). Por todas las razones enumeradas anteriormente, los manglares actúan como un motor económico local esencial para las poblaciones que residen cerca de los bosques, producen valiosos resultados económicos provenientes del sol y el mar, y luego transmiten estos bienes a las comunidades locales en muchas formas (Tomlinson, 1986).

3. Objetivos

de la

Investigación

3.1 Objetivos de la Investigación

➤ Objetivos Generales

- Realizar el estudio químico biodirigido del extracto orgánico obtenido a partir de la planta de manglar *Mora oleifera*, enfocado en su actividad hipoglucemiante y su toxicidad.

➤ Objetivos Específicos

- Preparar el extracto orgánico de las plantas de manglar *Mora oleifera*.
- Fraccionar el extracto y purificar los compuestos bioactivos presentes en el extracto por medio de cromatografías en columna abierta en fase normal y HPLC.
- Evaluar la actividad biológica de los compuestos por medio del ensayo de inhibición enzimática de alfa-glucosidasa, además del ensayo de toxicidad *in vitro* en el modelo de *Artemia salina*.
- Caracterizar el/los compuestos bioactivos por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Cristalería de Laboratorio

- Uso General
 - ✓ Viales de 2, 4, 20 mL
 - ✓ Vasos Químicos de 50, 250, 500 mL
 - ✓ Pípolial
 - ✓ Pipetas Pasteur
- Cristalería para la Extracción
 - ✓ Matraz Erlenmeyer de 4 L
 - ✓ Embudo
 - ✓ Matraz evaporador Buchi Rotavapor
 - ✓ Matraz receptor Buchi Rotavapor
- Cristalería para la Separación y Purificación
 - ✓ Columnas de vidrios
 - ✓ Matraz de Erlenmeyer de 50 y 100 mL
 - ✓ Matraz Kitasato de 500 mL
 - ✓ Embudo de Porcelana
- Cristalería para los Bioensayos
 - ✓ Platos Petri
 - ✓ Tubos de ensayo de 15 mL

4.1.2 Otros Materiales de Uso en el Laboratorio

Otros materiales de uso general requeridos para la realización de la investigación fueron:

- Espátulas
- Parafilm
- Propipeta
- Papel Filtro
- Soporte Universal
- Anillos

4.1.3 Reactivos Químicos del Laboratorio

Los reactivos químicos requeridos para la investigación fueron solventes, reactivos para cromatografía y de uso general.

- Solventes
 - ✓ Agua Destilada
 - ✓ Acetato de Etilo
 - ✓ Diclorometano
 - ✓ Etanol 95%
 - ✓ Hexano
 - ✓ Metanol
- Reactivos para Cromatografía de Capa Fina
 - ✓ Silica gel, Sigma Aldrich ®
 - ✓ Vainillina

- Reactivos de Uso General
 - ✓ Ácido sulfúrico
- Reactivos para los Bionensayos
 - ✓ Platos de 96 pocillos
 - ✓ PNPG (2 mM de sustrato: p-nitrofenil alfa-D-glucopiranosido)
 - ✓ Alfa-glucosidasa (enzima a 32 mU/mL)
 - ✓ Acarbosa
 - ✓ Solución Buffer de pH=7.0 K₃PO₄
 - ✓ DMSO
 - ✓ Agua destilada
 - ✓ Incubadora

4.1.4 Equipos

- Equipos Generales
 - ✓ Evaporador rotatorio, Buchi®
 - ✓ Recicladores refrigerantes, Labconco®
 - ✓ Propipeta, Thermo Scientific® y FisherBrand ®
 - ✓ Bombas de vacío, Labconco®
 - ✓ Balanza analíticas, Ohaus ®
 - ✓ Plato calentador
- Equipos para Espectrometría de Masas
 - ✓ Waters UPLC-MS Acquity®
- Equipos para Espectroscopía Infrarroja
 - ✓ Alpha II Bruker ®

4.2 Métodos

4.2.1 Fase de Preparación del Extracto

1. Recolección de la materia prima:

Se acudió a una zona de manglar del Pacífico panameño donde está presente la especie de manglar objeto de estudio y se colectaron las hojas sanas. Las hojas se guardaron en bolsas plásticas y se almacenaron en frío hasta su procesamiento.

2. Procesamiento de la materia prima:

Las hojas se lavaron con agua para eliminar cualquier rastro de suciedad. Luego, se procedió a su completo secado. Finalmente, se molió el material vegetal seco.

3. Preparación del extracto crudo:

Para llevar a cabo la extracción del crudo, se empleó el proceso de maceración. Para ello, se agregó el disolvente orgánico extractante (hexano, diclorometano y acetato de etilo) al material pulverizado y se dejó en reposo por 24 horas. Posteriormente, se separó el disolvente del material vegetal y se concentró mediante un rotavapor hasta completa sequedad. Se pasó el extracto a un vial. El ciclo se repite cinco veces, para extraer la mayor cantidad posible de los metabolitos.

4.2.2 Fase de Fraccionamiento del Extracto

Cromatografía líquida en fase normal:

Para llevar a cabo esta técnica, se realizó lo siguiente:

1. Preparación de la muestra:

El extracto del manglar se solubilizó en aproximadamente 10-15 mL del disolvente extractante y se agregó a la fase estacionaria (silica gel), de tamaño de 200-400 mesh

(Sigma-Aldrich). El solvente se secó para obtener un polvo y se almacenó en un lugar libre de humedad.

2. Preparación de la columna:

Se empleó una columna de vidrio, a la cual se le añadió la fase estacionaria resuspendida en el disolvente usado como fase móvil. Este proceso se repitió hasta lograr tener una fase estacionaria compacta. Luego, se agregó la muestra pulverizada, la cual también fue resuspendida en el disolvente utilizado como fase móvil. Por último, se añadió aproximadamente medio centímetro de arena, para evitar que la muestra se mueva cuando se agregue la fase móvil.

3. Preparación de la fase móvil:

Se utilizó una fase móvil en gradiente, empleando combinaciones de disolventes en diferentes proporciones a manera de ir aumentando la polaridad, comenzando con hexano, luego con diclorometano y por último acetato de etilo.

4. Cromatografía en capa fina (TLC):

Las fracciones obtenidas en la cromatografía líquida de fase normal se agruparon y separaron en base a su similitud y diferencias por TLC, logrando la reducción del número de fracciones finales.

Con un capilar se colocó en una placa de sílica gel las fracciones resultantes de la cromatografía y se dejaron secar. Luego, en una cámara de cromatografía de capa fina, se colocó la fase móvil, la cual depende de la polaridad a la cual fueron eluidas las fracciones que se analizaron. Las placas se revelaron en una cámara UV.

4.2.3 Ensayo de citotoxicidad con *Artemia salina*

El modelo *Artemia salina* (Figura 6), se empleó para determinar la toxicidad del extracto y utilizando el siguiente protocolo: Los huevecillos de *Artemia salina*, se incubaron por 48 h en agua de mar artificial (sal marina artificial, agua destilada y oxígeno). La separación de los nauplios de los huevecillos se logró con la ayuda de luz.

El extracto se preparó a concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm, las cuales se añadieron por triplicado en tubos de ensayos y se colocaron en cámara de flujo laminar para evaporar el solvente. Para el bioensayo se disolvieron en DMSO y agua artificial marina. Posteriormente, se añadieron suspensiones de 10-15 nauplios a cada tubo. Luego, fueron incubados a 25-29 °C por 24 h. Transcurrido este periodo de incubación, se examinaron sobre una lámpara de luz blanca, donde se contó el número de nauplios muertos en cada tubo. Se utilizó el método de Reed-Muench para obtener el porcentaje de muerte por dosis y la concentración letal 50 (CL₅₀).

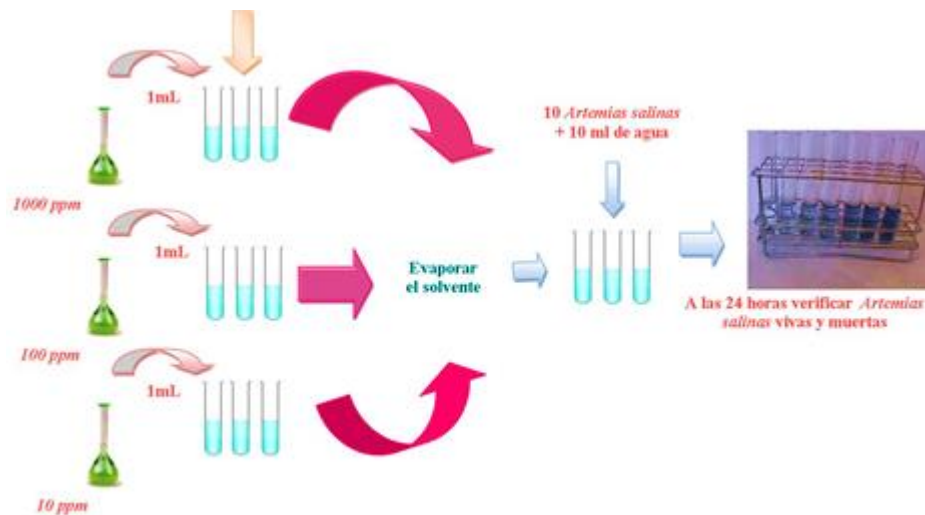


Figura 6. Esquema del ensayo de citotoxicidad

4.2.3 Ensayo de fitotoxicidad con *Solanum lycopersicum*

El extracto se preparó a concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm y se añadió por triplicado en platos Petri con papel filtro y se procedió a evaporar el solvente. Una vez el extracto se secó, se le añadió 10-15 semillas de *Solanum lycopersicum* y 3 mL de agua destilada. El plato Petri se selló con Parafilm e incubó a 30 °C. (Ver Figura 7)

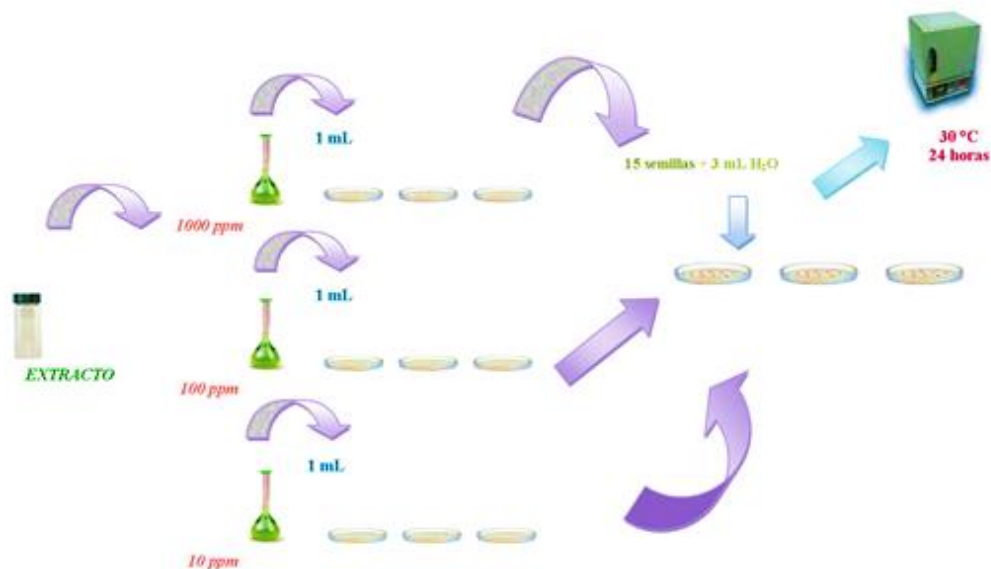


Figura 7. Esquema del Ensayo de Fitotoxicidad

4.2.4 Bioensayos primarios para determinar Actividad Hipoglucémica

a. Preparación de las muestras:

- Para el control positivo y muestras se disuelven 0,2 mg del compuesto en 200 μ L de DMSO
- Para las muestras: 20 μ L de muestra y 150 μ L de enzima
- Para control del color: 20 μ L de muestra y 150 μ L de Solución Buffer
- Para el blanco: 20 μ L de agua destilada y 150 μ L de Solución Buffer
- Para el control del solvente: 20 μ L de solvente y 150 μ L de enzima

- Para el control negativo: 20 μL de solución Buffer y 150 μL de enzima
- Para el control positivo: 20 μL de acarbosa y 150 μL de enzima

b. Ensayo inhibitorio de la enzima alfa-glucosidasa:

La actividad inhibitoria de los compuestos obtenidos en la fase de fraccionamiento se evaluó de acuerdo con el protocolo establecido previamente en el laboratorio. A cada pocillo de la placa microtituladora se le agregaron 32 mU/mL de la enzima en un buffer de fosfato de potasio de pH 7 a 100 mM y la muestra diluida en DMSO, que se incubó por 7 min a 37 °C. La reacción se inició mediante la adición del sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (PNPG) a 2 mM. Las placas se volvieron a incubar a 37 °C durante 20 min. (Ver Figura 8). Luego, se midió la absorbancia (*A*) del *p*-nitrofenol (PNP) liberado por la hidrolisis del sustrato en el espectrofotómetro de microplacas *Biotek Synergy HT* a 400 nm.

El porcentaje de inhibición de las muestras se calculó mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{\Delta A_{control} - \Delta A_{muestra}}{\Delta A_{control}} \times 100$$

Donde $\Delta A_{control} = A_{control} - A_{blanco}$ y $\Delta A_{muestra} = A_{muestra} - A_{control\ del\ color}$

c. Ensayo de CI₅₀ de la enzima alfa-glucosidasa:

Se realizaron diluciones seriales partiendo de una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para calcular la CI₅₀ de la enzima alfa-glucosidasa se utilizó un análisis de regresión, empleando la concentración del inhibidor reaccionante por pocillo.

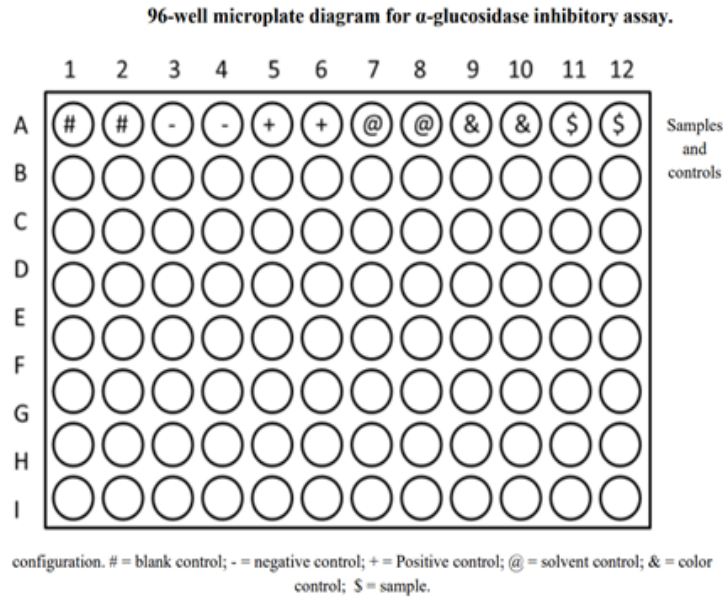


Figura 8. Diagrama para el ensayo de la alfa-glucosidasa (López, Chérigo, Spadafora, Loza-Mejía, & Martínez-Luis, 2015; Chan, Sun, Reddy, & Wu, 2010)

4.2.5 Caracterización estructural del compuesto presente en la fracción de mayor porcentaje de viabilidad celular:

La estructura del compuesto mayoritario presente en la fracción activa se determinó mediante el análisis de sus espectros de masas e infrarroja.

5. Resultados y Discusión

5.1 Resultados

5.1.1 Extracto de Hexano

Para la maceración del extracto de hexano de la *Mora oleífera* se utilizaron las hojas secas de esta especie de manglar (Figura 9). El trabajo se realizó con aproximadamente 890 g, con los cuales se logró una extracción de 13,785 g de extracto seco durante 3 semanas, el cual fue tratado con carbón activado obteniendo 11,401 g de extracto crudo de hexano. Este proceso de la maceración fue realizado utilizando cristalería de laboratorio y un equipo de Rotavapor, Buchi ® (Figura 10).



Figura 9. Hojas secas de *Mora oleífera*



Figura 10. Maceración y secado de extracto por medio de un rotavapor

5.1.1.1 Tratamiento del Extracto de Hexano con Carbón Activado

Para facilitar el proceso de fraccionamiento, se trató el extracto de hexano con carbón activado con la finalidad de separar la clorofila y pigmentos apolares del extracto crudo (Ver Figura 11). Esto es observado en la disminución de color verde oscuro del extracto quedando en un color amarillo marrón y también es observado en la eliminación del color verde y el revelado fucsia en la luz UV en la TLC del antes (1,1 y 1,2) y después (1,3) del tratamiento con Carbón Activado (Figura 12).

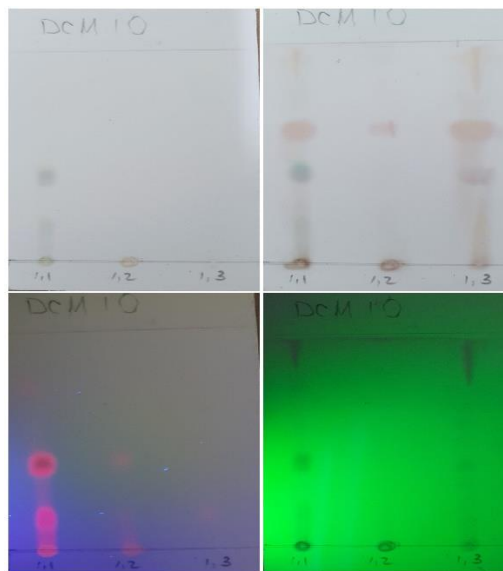


Figura 12. TLC del Extracto de Hexano



Paso #1: disolver el extracto seco en la menor cantidad de solvente posible



Paso #2: añadir suficiente Carbón Activado para el proceso de separación de la clorofila



Paso #3: separación del carbón activado del extracto por medio de la filtración



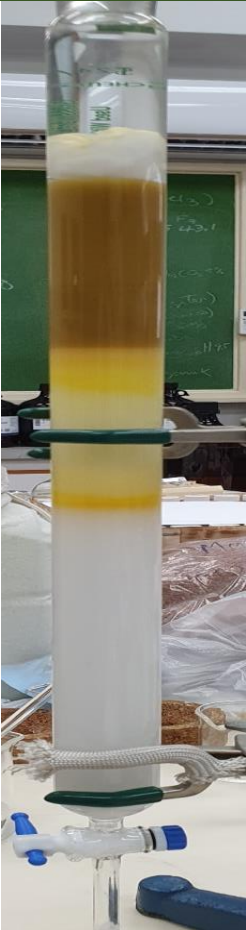
Paso #4: secado del extracto

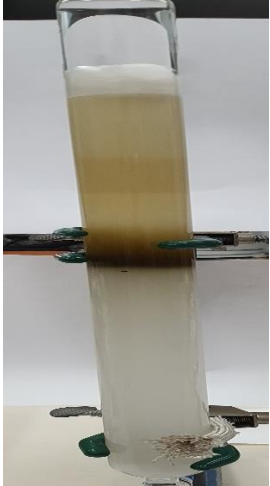
Figura 11. Procedimiento para la separación de clorofila del extracto crudo de Hexano

5.1.1.2 Fraccionamiento Primario del Extracto de Hexano

Se realizó un fraccionamiento primario (Figura 13) donde se obtuvieron 116 fracciones de 100 mL, que fueron reducidas a 31 fracciones de acuerdo a su similitud por medio de Cromatografía en Capa Fina (TLC) con un revelador universal (H_2SO_4 5: Etanol 95). Se utilizó el Código JEL- A A,B,C-## donde JEL son mis iniciales, la primera A es del primer extracto: Hexano y la segunda A el primer fraccionamiento, B el segundo y C el terciario. Por último, los ## el número de fracción de dicho fraccionamiento.

Tabla 4. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Primario del Extracto de Hexano

Solventes	Proporción	Fracciones	Columna
Hexano	100	JEL-AA-1 al 5	
Hexano: Diclorometano	90:10	JEL-AA-6 al 10	
	80:20	JEL-AA-11 al 15	
	70:30	JEL-AA-16 al 21	
	60:40	JEL-AA-22 al 25	
	1:1	JEL-AA-26 al 35	
	40:60	JEL-AA-36 al 44	
	30:70	JEL-AA-45 al 51	
	20:80	JEL-AA-52 al 61	
10:90	JEL-AA-62 al 66		
Diclorometano	100	JEL-AA-67 al 72	
Diclorometano:Metanol	99:1	JEL-AA-73 al 80	
	98:2	JEL-AA-81 al 84	

Diclorometano:Metanol	97:3	JEL-AA-85 al 87	
	95:5	JEL-AA-88 al 90	
	90:10	JEL-AA-91 al 93	
	80:20	JEL-AA-94 al 97	
	70:30	JEL-AA-98 al 101	
	60:40	JEL-AA-102 al 105	
	1:1	JEL-AA-106 al 109	
Metanol	100	JEL-AA-110 al 116	Figura 13

Se obtuvo 3 fracciones relativamente puro que fueron:

- JEL-AA-14: 101,4 mg, que representa un 0,74% (m/m) del extracto de hexano (Figura 14).
- JEL-Hx-F-13,14 y 15: 1303,0 mg (Figura 15), que abarca las fracciones JEL-AA-19 al 24 y que representa un 9,45% (m/m) del extracto de hexano.
- JEL-Hx-F-17 y 18: 216,4 mg (Figura 16), que abarca las fracciones JEL-AA-27-34 y que representa un 1,57% (m/m) del extracto de hexano.

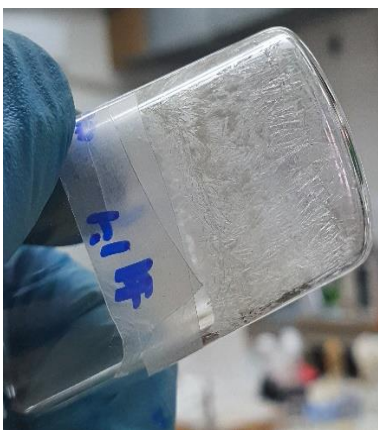


Figura 14. JEL-AA-14



Figura 15. Hx-F-13,14 y 15




Figura 16. Hx-F-17 y 18

5.1.1.3 Fraccionamiento Secundario del Extracto de Hexano

Posteriormente, se realizó un segundo fraccionamiento (Figura 17) con 400 mg de la fracción JEL-Hx-F-21 (abarca las JEL-AA-44 al 60) que en la TLC poseía manchas interesantes en el revelado y poseía una buena separación. Esta se realizó por medio de una elución isocrático.

Tabla 5. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Secundario del JEL-Hx-F-21

Solventes	Proporción	Fracciones	Columna
Hexano: Diclorometano	1:1	JEL-AB-1 al 138	
	40:60	JEL-AB-139 al 170	
	30:70	JEL-AB-171 al 189	
	20:80	JEL-AB-190 al 193	
Diclorometano	100	JEL-AB-194 al 197	
Diclorometano:Metanol	99,9:0,1	JEL-AB-198 al 207	
	99:1	JEL-AB-208 al 213	
	98:2	JEL-AB-214 al 217	
	97:3	JEL-AB-218 al 221	
	95:5	JEL-AB-222 al 225	
	90:10	JEL-AB-226 al 236	
	70:30	JEL-AB-237 al 239	
Metanol	1:1	JEL-AB-240 al 242	
	100	JEL-AB-242 al 247	
Metanol:Agua Destilada	1:1	JEL-AB-248 al 251	
Agua Destilada	100	JEL-AB-252	Figura 17

5.1.1.4 Fraccionamiento Secundario del Extracto de Hexano

Por último, se tomaron 2 fracciones con manchas de interés y con una relativa baja complejidad (Figura 18) para un tercer fraccionamiento los cuales fueron:

- JEL-Hx-S-7 (Figura 19) que abarca JEL-AC-10 al 18 y se fraccionó 89 mg de este
- JEL-Hx-S-10-11 (Figura 20) que abarca JEL-AC-30 al 127 y se fraccionó 155 mg de este.

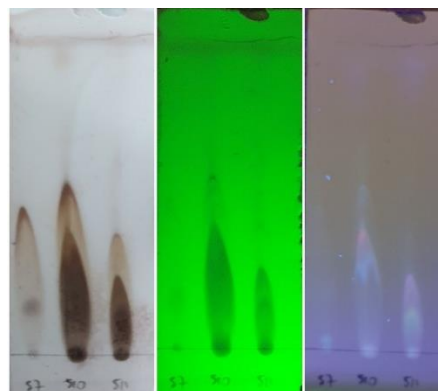


Figura 18. TLC de JEL-Hx-S-7, 10 y 11

Este tercer fraccionamiento se realizó a una escala micro utilizando pipetas Pasteur.

Tabla 6. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Terciario del JEL-Hx-S-7

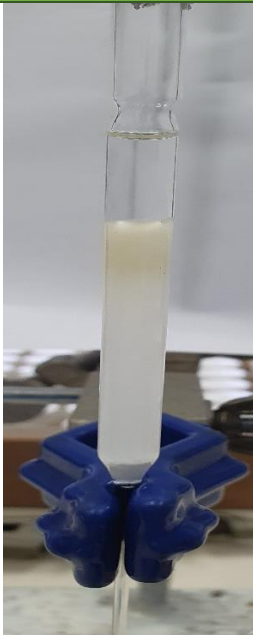
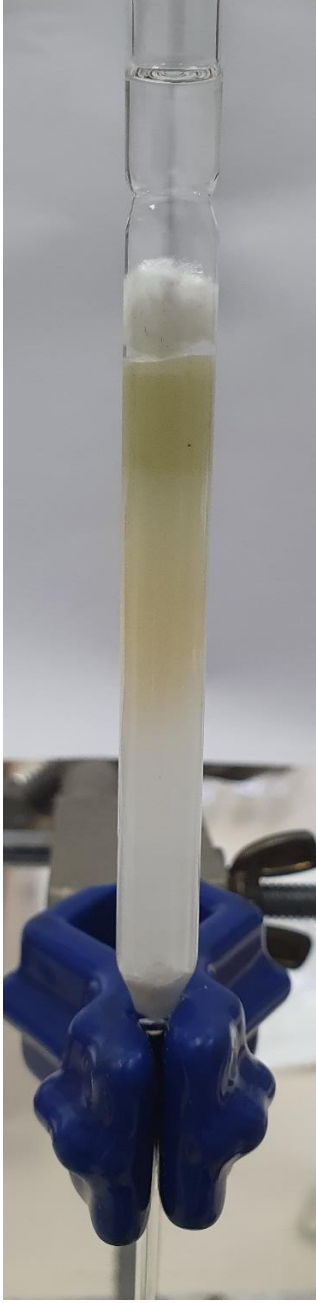
Solventes	Proporción	Fracciones	Columna
Hexano	100	JEL-AC-1 al 8	
Hexano: Diclorometano	80:20	JEL-AC-9 al 34	
	70:30	JEL-AC-35 al 40	
	60:40	JEL-AC-41 al 46	
	1:1	JEL-AC-47 al 50	
	40:60	JEL-AC-51 al 60	
	30:70	JEL-AC-61 al 67	
	20:80	JEL-AC-67 al 73	
	10:90	JEL-AC-74 al 78	
Diclorometano	100	JEL-AC-79 al 96	Figura 19

Tabla 7. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Terciario del JEL-Hx-S-10 y 11

Solventes	Proporción	Fracciones	Columna
Hexano	100	JEL-Ac-1 al 3	
Hexano: Diclorometano	95:5	JEL-Ac-3	
	90:10	JEL-Ac-4 al 21	
	85:15	JEL-Ac-22 al 26	
	80:20	JEL-Ac-27 al 46	
	75:25	JEL-Ac-47 al 55	
	70:30	JEL-Ac-56 al 70	
	65:35	JEL-Ac-71 al 78	
	60:40	JEL-Ac-79 al 81	
	55:45	JEL-Ac-82	
	1:1	JEL-Ac-83 al 89	
	45:55	JEL-Ac-90 al 92	
	40:60	JEL-Ac-93 al 100	
	35:65	JEL-Ac-101 al 103	
	30:70	JEL-Ac-104 al 108	
	25:75	JEL-Ac-109	
	20:80	JEL-Ac-110	
	10:90	JEL-Ac-111	
Diclorometano	100	JEL-Ac-112	

5.1.2 Extracto de Diclorometano

Para la maceración del extracto de diclorometano de la *Mora oleífera*, se volvió a utilizar las hojas de este manglar (Figura 9) como material vegetal que previamente fue utilizado con el extracto de hexano. A partir de los 890 g de material vegetal, se logró una extracción de 16,1117 g durante 3 semanas y esta fue trata con carbón activado dando un total de 3,405 g de extracto crudo de diclorometano. Este proceso de la maceración fue realizado utilizando cristalería de laboratorio y un equipo de Rotavapor, Buchi ® (Figura 10).

5.1.2.1 Tratamiento del Extracto de Diclorometano con Carbón Activado

Para facilitar el proceso de fraccionamiento, se trató el extracto de diclorometano con carbón activado para separar la clorofila y pigmentos del extracto crudo (Ver Figura 22). Esto es observado en la disminución de color verde oscuro del extracto quedando en un color marrón y también es observado en la eliminación del color verde y el revelado fucsia en la luz UV en la TLC del antes (2,1) y después (2,2 y Cx) del tratamiento con Carbón Activado (Figura 21).

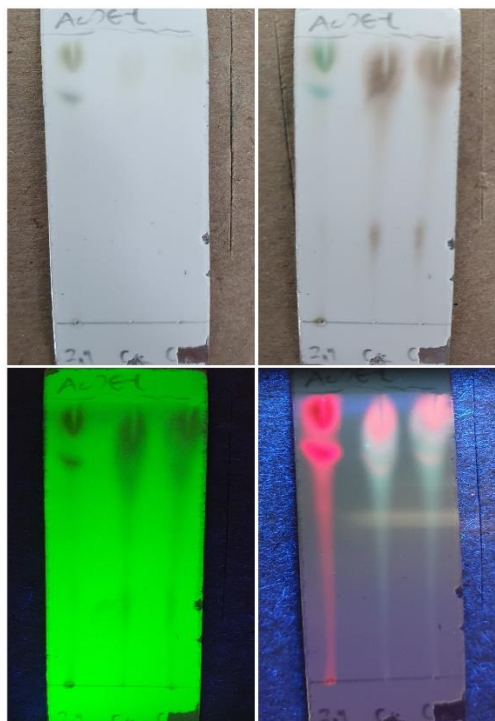


Figura 21. TLC del Extracto de
Diclorometano



Paso #1: disolver el extracto seco en la menor cantidad de solvente posible

Paso #2: añadir suficiente Carbón Activado para el proceso de separación de la clorofila

Paso #3: separación del carbón activado del extracto por medio de la filtración


Paso #4: secado del extracto


Figura 22. Procedimiento para la separación de clorofila del extracto crudo de Diclorometano

5.1.2.2 Fraccionamiento Primario del Extracto de Diclorometano

Se realizó un fraccionamiento primario del extracto de diclorometano (Figura 23) donde se obtuvieron 179 fracciones de 40 mL y que fueron reducidas a 21 fracciones de acuerdo a su similitud por medio de Cromatografía en Capa Fina (TLC) con un revelador universal (H_2SO_4 5: Etanol 95). Se utilizó el Código JEL-B A,B,C-## donde JEL son mis iniciales, la primera B es del segundo extracto: Diclorometano y la segunda A el primer fraccionamiento, B el segundo y C el terciario. Por último, los ## es el número de fracción de dicho fraccionamiento.

Tabla 8. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Primario del Extracto de Diclorometano


Solventes	Proporción	Fracciones	Columna
Hexano	100	JEL-BA-1 al 5	
Hexano: Diclorometano	95:5	JEL-BA-6 al 13	
	90:10	JEL-BA-14 al 23	
	85:15	JEL-BA-24 y 25	
	80:20	JEL-BA-26 al 38	
	75:25	JEL-BA-39 al 42	
	70:30	JEL-BA-43 al 58	
	65:35	JEL-BA-59 al 61	
	60:40	JEL-BA-62 al 79	
	55:45	JEL-BA-80 al 84	
	1:1	JEL-BA-85 al 91	
	45:55	JEL-BA-92 al 98	
	40:60	JEL-BA-99 al 113	
	35:65	JEL-BA-114 al 117	
	30:70	JEL-BA-118 al 121	
	25:75	JEL-BA-122 y 123	
	20:80	JEL-BA-124 y 125	
	10:90	JEL-BA-126 y 127	
	Diclorometano	100	
Diclorometano:Metanol	99:1	JEL-BA-129 al 133	

Diclorometano:Metanol	97:3	JEL-BA-134 al 137	
	95:5	JEL-BA-138 al 140	
	90:10	JEL-BA-141 al 145	
	85:15	JEL-BA-146 al 153	
	80:20	JEL-BA-154 al 157	
	75:25	JEL-BA-158 al 160	
	70:30	JEL-BA-161 al 163	
	65:35	JEL-BA-164 al 168	
	60:40	JEL-BA-169 al 170	
	55:45	JEL-BA-171 y 172	
	40:60	JEL-BA-173 al 176	
Metanol	100	JEL-BA-177	Figura 23
Metanol:Agua destilada	1:1	JEL-BA-178	

5.1.2.3 Fraccionamiento Secundario del Extracto de Diclorometano

Posteriormente se realizó un segundo fraccionamiento del extracto de Diclorometano (Figura 24) se realizó a la JEL-DCM-F6 de unos 116 mg (abarca las JEL-BA-36 al 47) que en el TLC poseía manchas interesante en el revelado y poseía una buena separación de las manchas.

Tabla 9. Resumen de Eluyente del Fraccionamiento Secundario del Extracto de Diclorometano

Solventes	Proporción	Fracciones	Columna
Hexano	100	JEL-BB-1	
Hexano: Diclorometano	70:30	JEL-BB-2 al 6	
	1:1	JEL-BB-7 al 18	
	30:70	JEL-BB-19 al 26	
Diclorometano	100	JEL-BB-27	
Metanol	100	JEL-BB-28	
Metanol:Agua destilada	1:1	JEL-BB-29	Figura 24

5.1.3 Resultados de la Citotoxicidad

Se realizó el bioensayo de la Citotoxicidad con *Artemia salina*, estas fueron incubadas para su crecimiento por 48 h en agua salina artificial (preparado con electrolitos de acuario en una concentración de 35 g/L) con una fuente de luz y temperatura de entre los 25-28°C (Ver Figura 25).

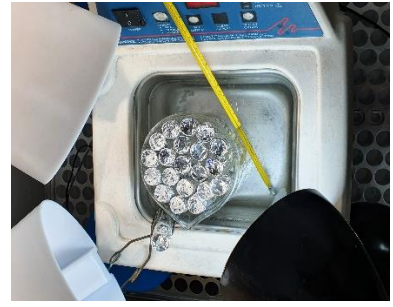
Este ensayo se realizó a los extractos de Hexano, Diclorometano y dos de Acetato de Etilo obtenidos. El segundo extracto de Acetato de Etilo se formó artefactos por motivos de las largas duraciones de maceración debido a la cuarentena.



Paso #1: Eclosión de los
huevos de *Artemia salina* por
48 h



Paso #2: Secado de los
Extractos en los tubos de
ensayo



Paso #3: Adición de la
Artemia salina a los tubos de
ensayo e incubar por 24 h

Figura 25. Procedimiento para el Ensayo de Citotoxicidad

Tabla 10. Resultados del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Hexano

Extracto de Hx							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
18	17	12	10	15	10	15	6
16	16	15	12	13	10	12	5
12	12	12	10	15	11	15	5
Total							
46	45	39	32	43	31	42	16
%Supervivencia							
97,8		82,1		72,1		38,1	

Tabla 11. Resultados del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Diclorometano

Extracto de DCM							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
15	15	12	10	13	8	13	5
14	14	13	10	16	10	12	4
13	12	14	10	15	12	14	5
Total							
42	41	39	30	44	30	39	14
%Supervivencia							
97,6		76,9		68,2		35,9	

Tabla 12. Primer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #1

Extracto de AcOEt #1 (Antes de Pandemia)							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
12	11	11	8	15	10	18	3
14	14	15	12	13	9	16	3
13	13	16	12	15	9	15	3
Total							
39	38	42	32	43	28	49	9
%Supervivencia							
97,4		76,2		65,1		18,4	

Tabla 13. Segundo Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #1

Extracto de AcOEt #1 (Antes de Pandemia)							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
15	13	13	10	12	8	13	3
14	14	13	9	13	7	13	2
12	12	14	11	15	11	13	2
Total							
41	39	40	30	40	26	39	7
%Supervivencia							
95,1		75,0		65,0		17,9	

Tabla 14. Tercer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #1

Extracto de AcOEt #1 (Antes de Pandemia)							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
15	14	13	9	13	8	14	3
16	15	16	13	12	8	16	3
16	16	13	10	16	11	12	2
Total							
47	45	42	32	41	27	42	8
%Supervivencia							
95,7		76,2		65,9		19,0	

Tabla 15. Primer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #2

Extracto de AcOEt #2 (Después de Pandemia)							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
11	11	12	8	12	8	15	3
14	14	18	14	15	10	13	2
12	11	18	14	12	7	12	3
Total							
37	36	48	36	39	25	40	8
%Supervivencia							
97,3		75,0		64,1		20,0	

Tabla 16. Segundo Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #2

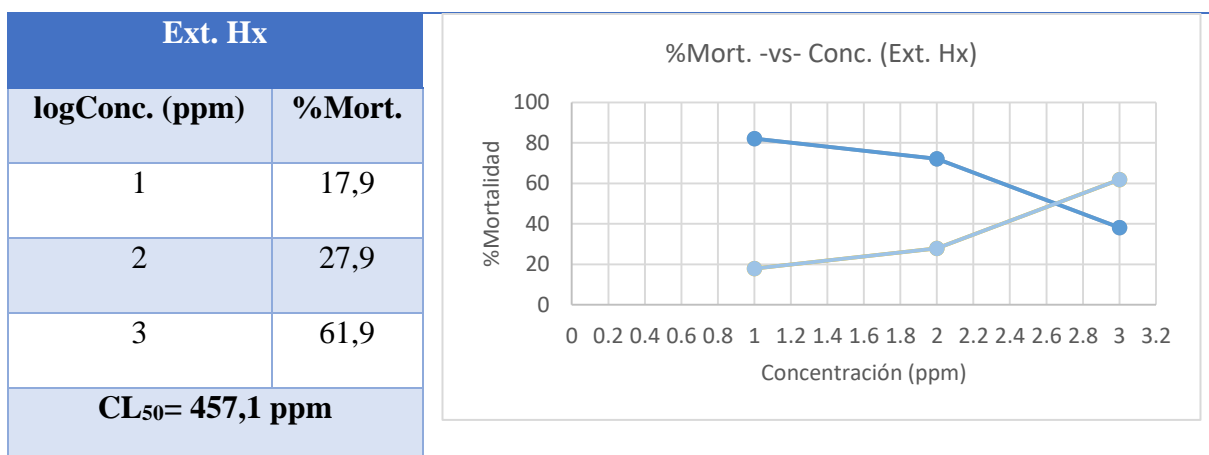
Extracto de AcOEt #2 (Después de Pandemia)							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
14	14	14	10	14	9	13	2
15	14	15	12	13	8	14	3
15	13	13	9	13	8	14	2
Total							
43	41	42	31	40	25	41	7
%Supervivencia							
95,3		73,8		62,5		17,1	

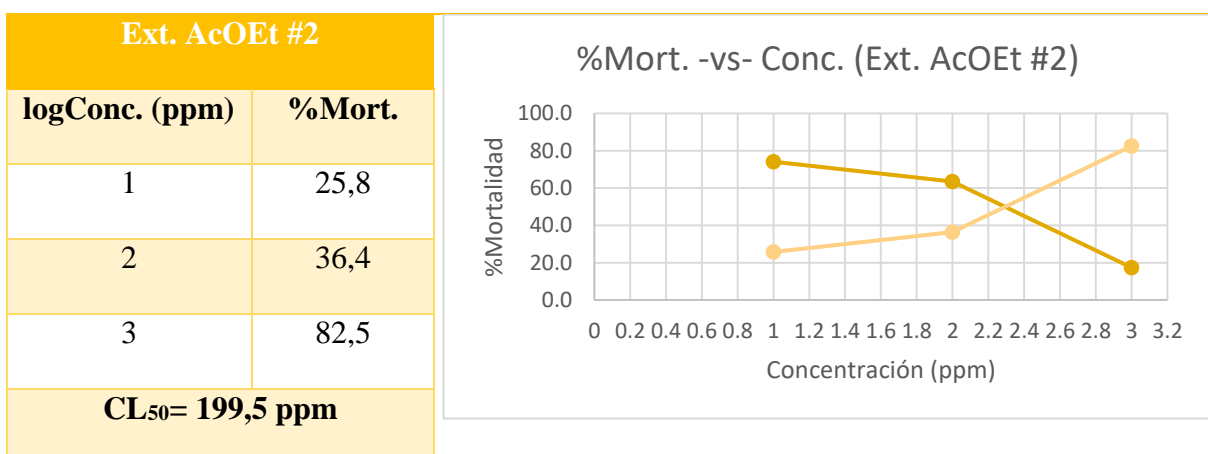
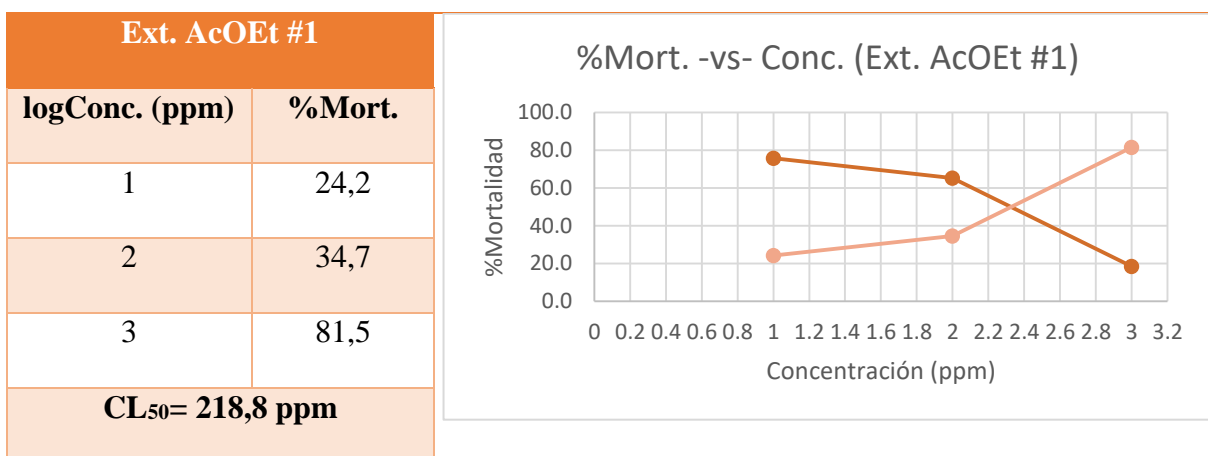
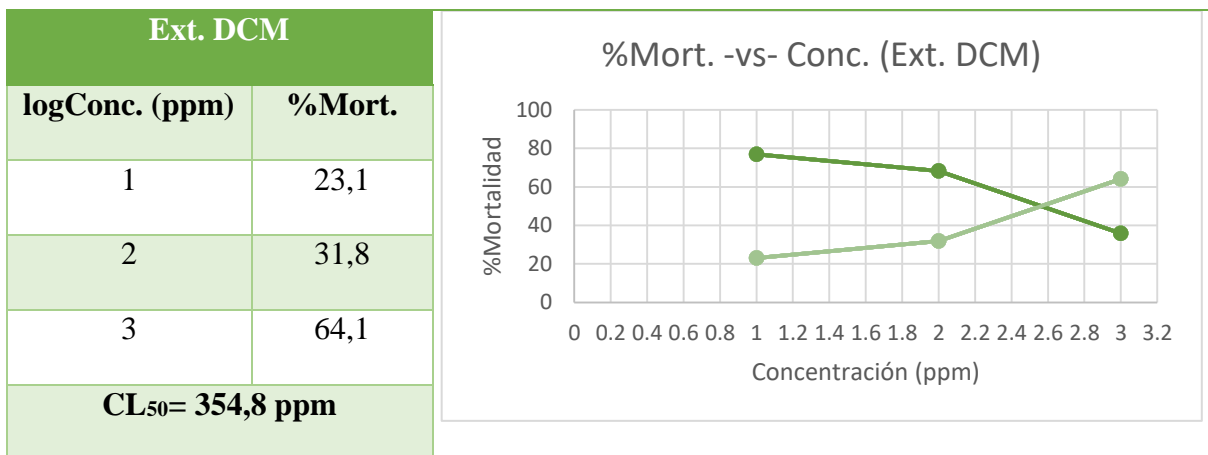
Tabla 17. Tercer Resultado del ensayo de Citotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo #2

Extracto de AcOEt #2 (Después de Pandemia)							
Blanco		10 ppm		100 ppm		1000 ppm	
Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos	Cantidad	Vivos
14	14	15	12	13	7	16	3
15	14	14	10	13	9	14	2
14	13	13	9	13	9	15	3
Total							
37	36	48	36	39	25	45	8
%Supervivencia							
95,3		73,8		64,1		17,8	

5.1.3.1 Procesado de los Resultados de los Ensayos de Citotoxicidad

A partir de los datos del porcentaje de mortalidad y el logaritmo de la concentración se aplicó el método de Reed-Muench, para obtener un gráfico con el porcentaje de vivos acumulados y muertos acumulados, y el punto de cruce de ambas rectas es la CL₅₀ (concentración letal 50).





5.1.4 Resultado de la Fitotoxicidad

Se realizó el bioensayo de la Fitotoxicidad con semillas de *Lycopersicon esculentum*, también conocido como tomate, estas fueron incubadas en platos Petri para su crecimiento por 72 h junto al extracto orgánico, el cuál fue agregado en solución sobre papel filtro, posteriormente se evaporó el solvente y se procedió a agregar 3 mL de agua destilada (Ver Figura 26). En este ensayo se evaluaron los extractos de Hexano, Diclorometano y dos de Acetato de Etilo.



Paso #1: Secado de los Extractos en el papel filtro en los platos Petri

Paso #2: Cultivo de las *Lycopersicon esculentum*

Paso #3: Incubación de los cultivos de las *Lycopersicon esculentum* por 72 h

Paso #4: Evaluación del crecimiento radicular de cada semilla.

Figura 26. Procedimiento para el Ensayo de Fitotoxicidad

Tabla 18. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Hexano

Extracto de Hx			
Promedios			
Blanco	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
2,71	2,51	2,46	2,26
% Inhibición			
0,0	7,3	9,4	16,7
Índice de Germinación			
100,0	92,7	90,6	83,3

Tabla 19. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Diclorometano

Extracto de DCM			
Promedios			
Blanco	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
2,81	2,59	2,35	1,99
% Inhibición			
0,0	8,0	16,3	29,3
Índice de Germinación			
100,0	92,0	83,7	70,7

Tabla 20. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo

#1

Extracto de AcOEt #1 (Antes de Pandemia)			
Promedios			
Blanco	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
3,17	2,86	2,76	1,74
3,09	2,80	2,71	1,70
2,92	2,51	2,26	1,51
% Inhibición*			
0,0	11,2	16,3	46,3
Índice de Germinación*			
100,0	88,8	83,7	53,7

Tabla 21. Resumen de resultados del ensayo de Fitotoxicidad del Extracto de Acetato de Etilo

#2

Extracto de AcOEt #2 (Después de Pandemia)			
Promedios			
Blanco	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
3,25	2,92	2,81	1,77
3,22	2,90	2,78	1,76
2,74	2,36	2,04	1,35

% Inhibición*			
0,0	11,1	17,1	47,0
Índice de Germinación*			
100,0	88,9	82,9	53,0

5.2 *Discusión*

5.2.1 **Discusión de los Resultados del Ensayo de Citotoxicidad**

Basándose en la escala de clasificación de toxicidad aguda del Servicio de Pesca y Vida Silvestre, se considera extremadamente tóxico a 0,01-1,00 ppm, tóxico a 1,01-100 ppm y no tóxico a >100ppm (El-Harbawi, 2014). Teniendo esto en cuenta, ninguno de los extractos de *Mora oleífera* es citotóxico, porque no llegan al rango de moderadamente tóxico.

5.2.2 **Discusión de los Resultados del Ensayo de Fitotoxicidad**

Basándose en la escala de fitotoxicidad (Chérigo, Lezcano, & Martínez-Luis, Diversity and Allelopathic Potential of Weeds among Panamanian Coffee Crops, 2017), donde:

CI₅₀ (ppm)	Descripción
<100	Muy fitotóxico
100-500	Fitotóxico
500-1000	Moderadamente fitotóxico
>1000	No fitotóxico

Considerando esta escala de fitotoxicidad, la concentración máxima utilizada en el bioensayo fue de 1000 ppm, y ninguno de los extractos alcanzó a inhibir el 50% de la población (CI₅₀) por lo que los extractos de *Mora oleífera* no son fitotóxicos.

5.2.3 Caracterización de Compuestos

Con los respectivos fraccionamientos primarios, secundarios y terciarios, se logró separar, aislar y purificar varias fracciones de las cuales fueron sometidas a varios métodos químicos de caracterización como una TLC comparativas, por espectrometría de masas e infrarrojo.

5.2.3.1 TLC Comparativas

Se realizó 3 TLC comparativas a distintas polaridades (Figura 27) a las fracciones obtenidas del extracto de hexano que poseían una cristalización y aspecto físico a 2 patrones, el Lupeol y β -Sitosterol que fueron previamente caracterizados (ver Anexos). Debido al origen vegetal, las estas semejanzas físicas, el mismo Rf y color de revelado, hubo una gran certeza de que se trataba de estos dos compuestos.

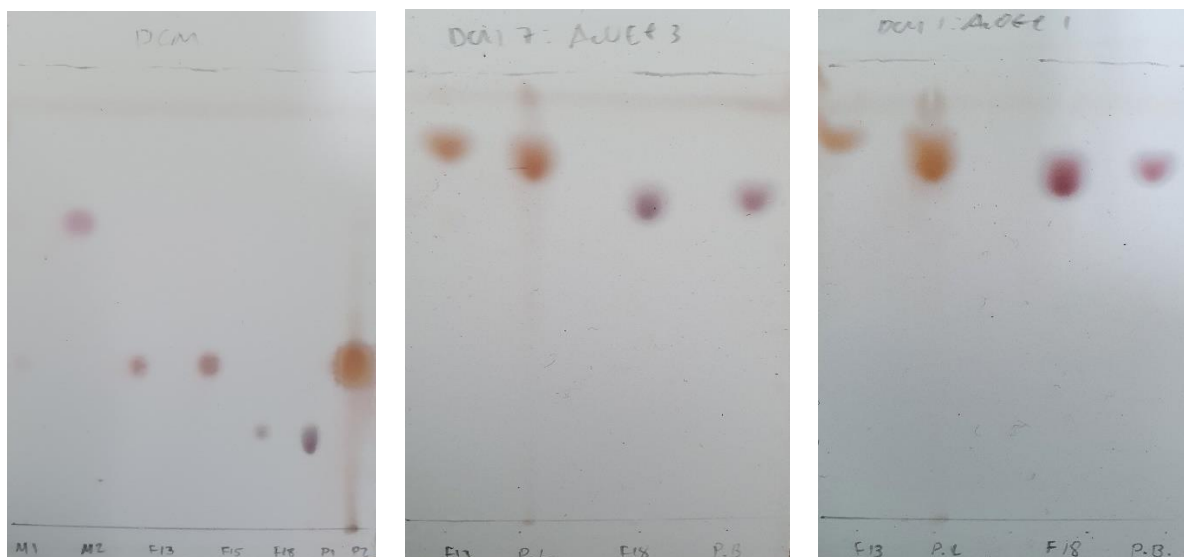


Figura 27. TLC Comparativo de Fracciones con Patrones donde: M2: JEL-AA-14, JEL-Hx-F13, JEL-Hx-F15, JEL-Hx-F18, P1 y PS: Patrón de β -Sitosterol, P2 y PL: Patrón de Lupeol

5.2.3.2 Caracterización por UPLC-MS

Las muestras JEL-Hx-F13 y JEL-Hx-F18 fueron analizadas mediante espectrometría de masas modalidad ESI+, tanto por inyección directa (MS y MS/MS), como por UPLC-MS. Como sabemos la espectrometría de masas es una técnica que más se ha desarrollado para la identificación de compuestos orgánicos, sobre todo los conocidos.

El espectrómetro de masas utilizado fue un Waters UPLC-MS Acquity® (ver Figura 28) posee un cuadrupolo y con fuente de ionización Electrospray (ESI) con una fuente de voltaje de capilar 3,5 kV y cono de 15 V, temperatura desolvatación de 400°C, flujo de gas del cono 50 L/h y una energía de colisión desde los 10 a 30 V. La columna equipada fue una Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ 1,7 µm 2,1x50 mm y fue una elución gradiente de H₂O 100 a H₂O 90:10 Acetonitrilo.

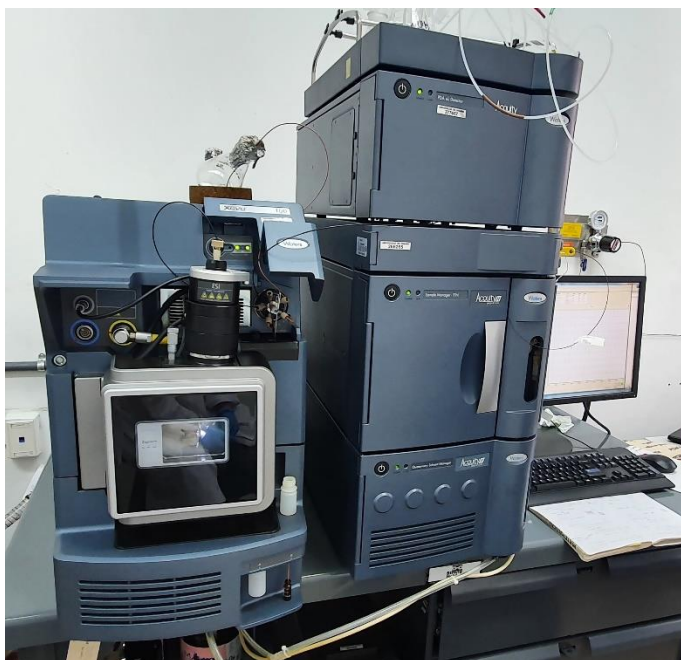


Figura 28. Waters UPLC-MS Acquity®

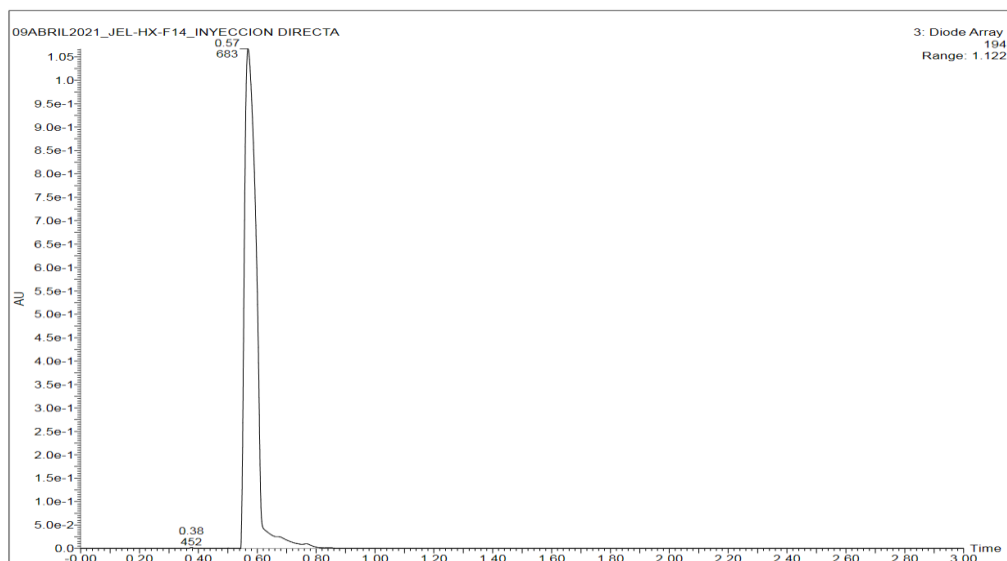


Figura 29. Cromatograma del Lupeol

El análisis del cromatograma de la fracción JEL-Hx-F13 (Figura 29) nos permitió determinar que esta fracción está constituida por un compuesto mayoritario, prácticamente puro. El análisis mediante el espectro de masas ESI+ (Figura 30) nos ha permitido identificar de manera inequívoca la estructura del lupeol (con peso molecular de 426,72 g/mol) a partir de las señales de $m/z = 875$ que representa el $[2M+23]$ que es dímero del Lupeol con el aducto de sodio, $m/z = 449$ que representa $[M+23]$ que es el aducto de sodio y $m/z = 409$ que representa el $[M+1-18]$ que es la pérdida del hidroxilo. Adicional a este, en el espectro de masas ESI- (Figura 31) también confirma esta elucidación con la señal $m/z = 425$ que representa el $[M-1]$ que es la pérdida del protón del hidroxilo.

También se obtuvo el espectro de masas de una muestra previamente identificada como lupeol para poder realizar una comparativa con los espectros de MS/MS de nuestra muestra obtenida, donde la señal $m/z = 409$ del lupeol aislado (Figura 32) corresponde con la del patrón lupeol (Figura 33). La comparativa de los dos espectros poseen una similitud marcado por señales como $m/z = 271, 231, 217, 191, 163,$ y 137 que son picos característicos del lupeol.

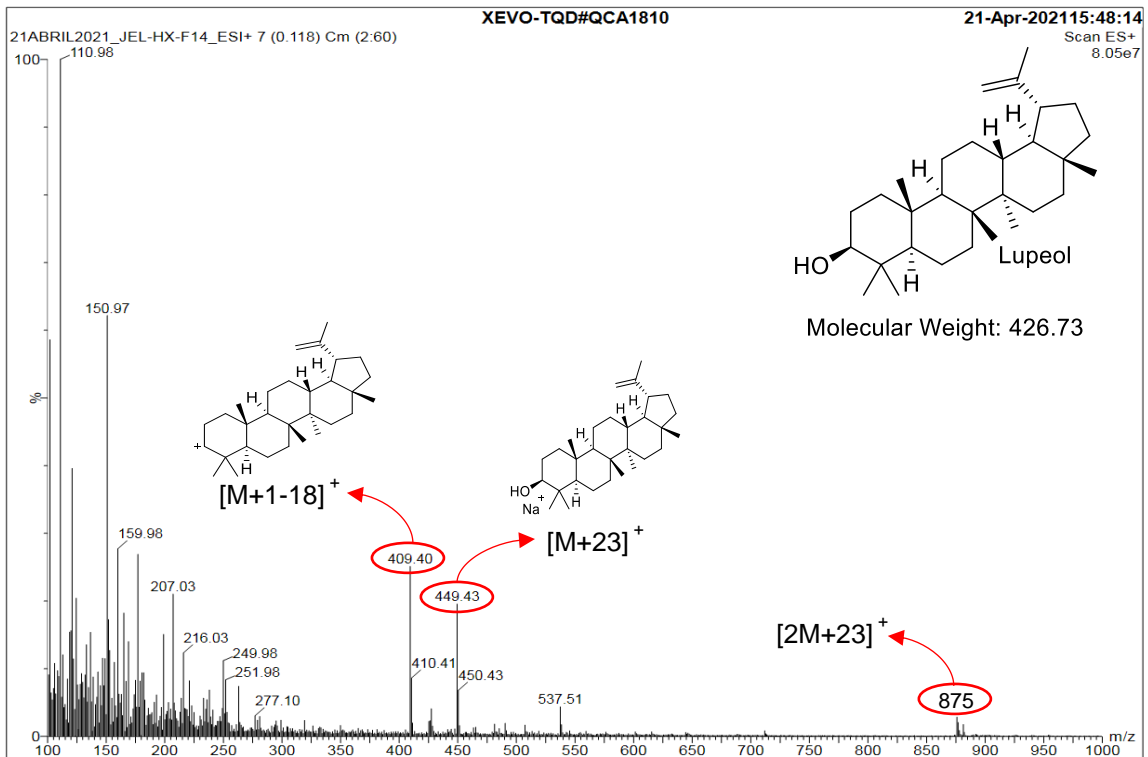


Figura 30. Espectro de Masas del Lupeol con ESI+

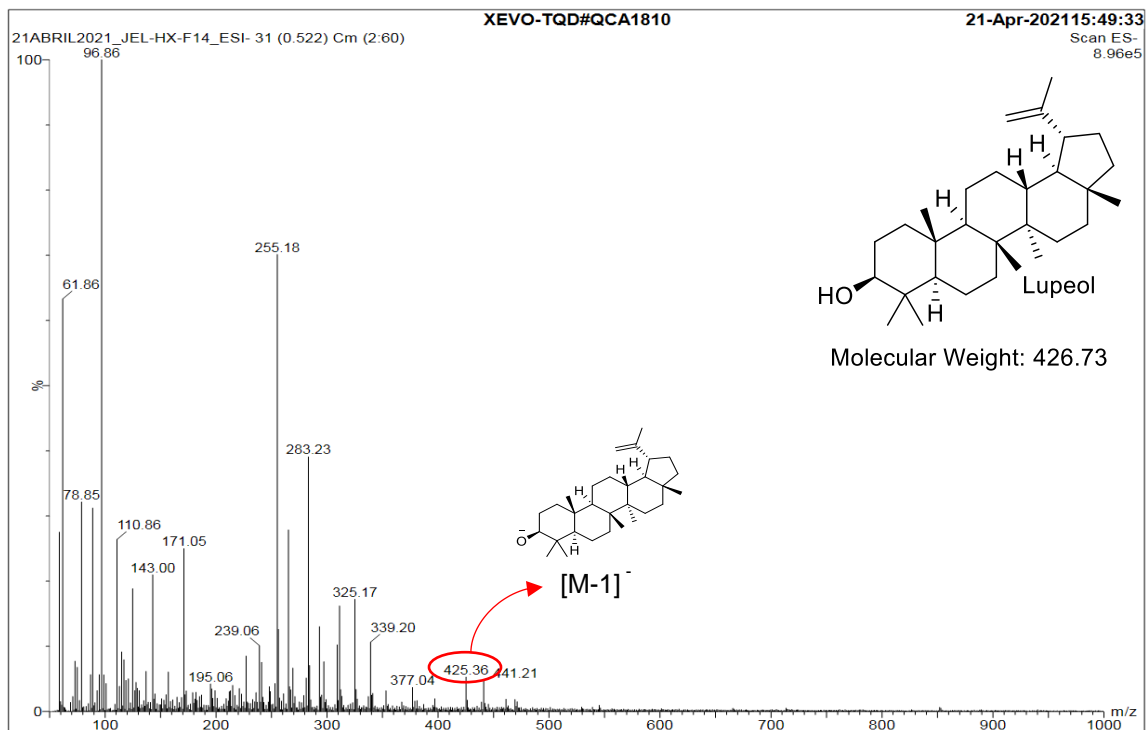


Figura 31. Espectro de Masas del Lupeol con ESI-

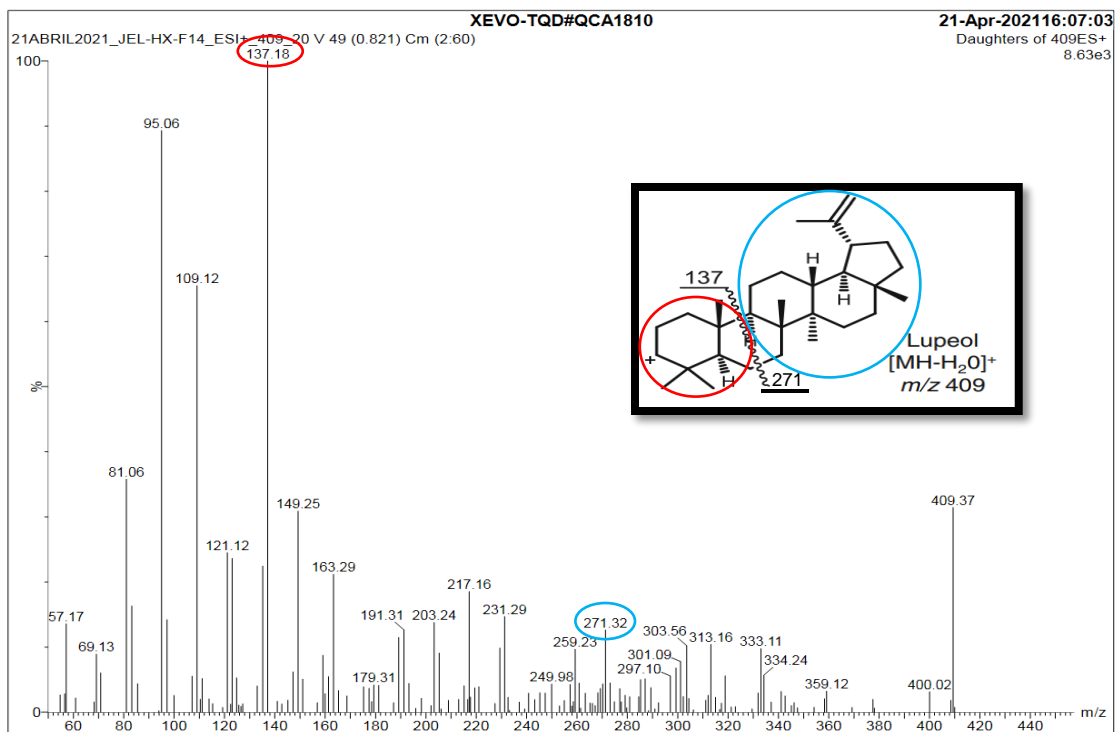


Figura 32. Espectro de MS/MS del Lupeol con ESI+

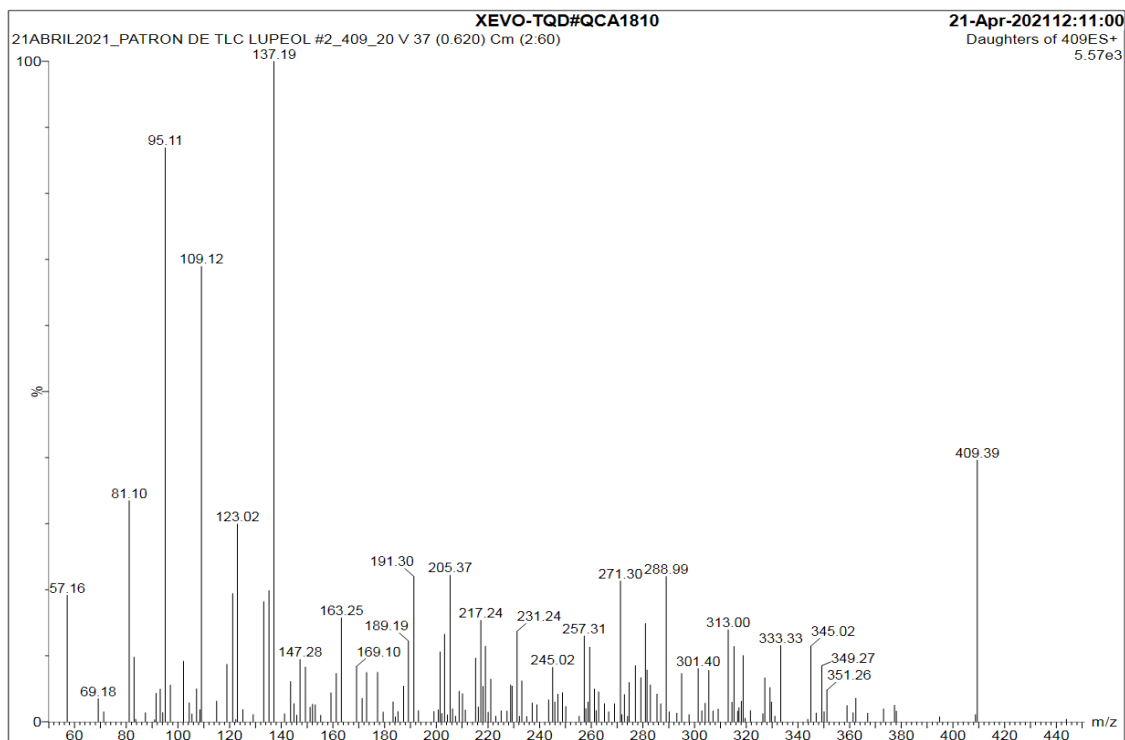


Figura 33. Espectro de MS/MS del Patrón de Lupeol con ESI+

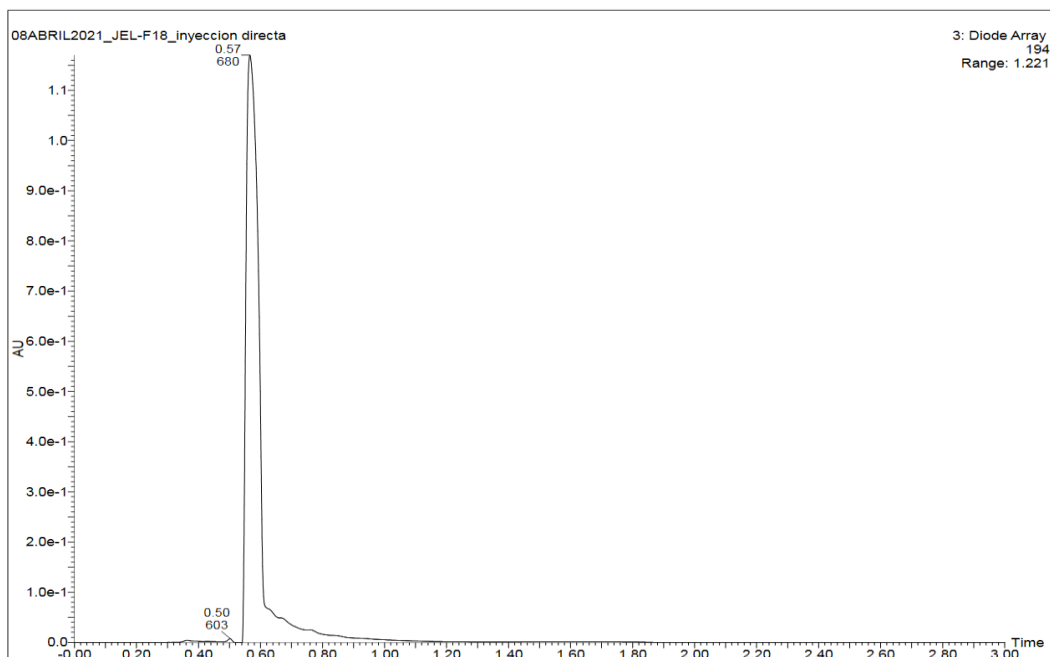


Figura 34. Cromatograma del β -Sitosterol

Por medio del cromatograma de la fracción JEL-Hx-F18 del (Figura 34) determinamos que está fracción también está compuesta por un compuesto mayoritario, prácticamente puro. El análisis mediante el espectro de masas ESI+ (Figura 35) ha permitido la identificación inequívoca de la estructura del β -sitosterol (con peso molecular de 414,71 g/mol) a partir de la señal de $m/z= 397$ que representa el $[M+1-18]$ que es la pérdida del hidroxilo. Adicional a este, en el espectro de masas ESI- (Figura 36) también confirma esta elucidación con la señal $m/z= 413$ que representa el $[M-1]$ que es la pérdida del protón del hidroxilo.

También se obtuvieron los espectros de masas de una muestra previamente identificada como β -sitosterol para poder hacer una comparativa de los espectros de MS/MS, donde se observa que la señal $m/z= 397$ del β -sitosterol aislado (Figura 37) corresponden con la del patrón β -Sitosterol (Figura 38). La comparativa de los dos espectros poseen una similitud marcado por señales como $m/z= 300, 268, 161$ y 147 que son picos característicos del β -sitosterol.

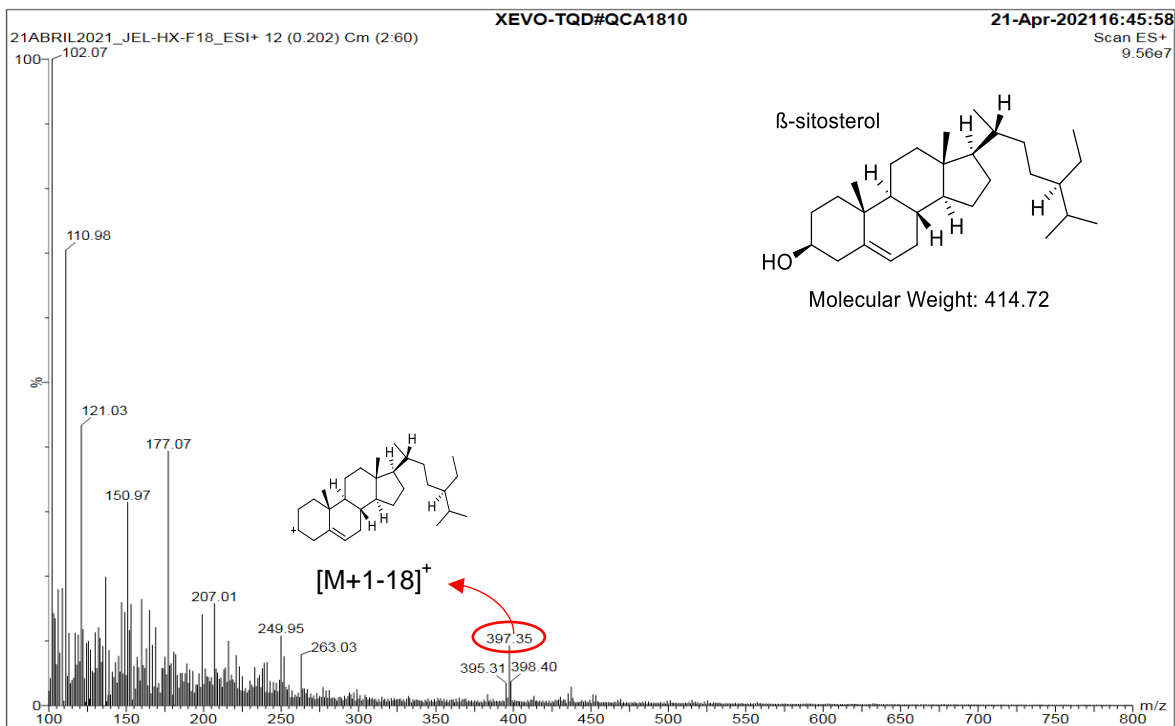


Figura 35. Espectro de Masas del β -Sitosterol con ESI+

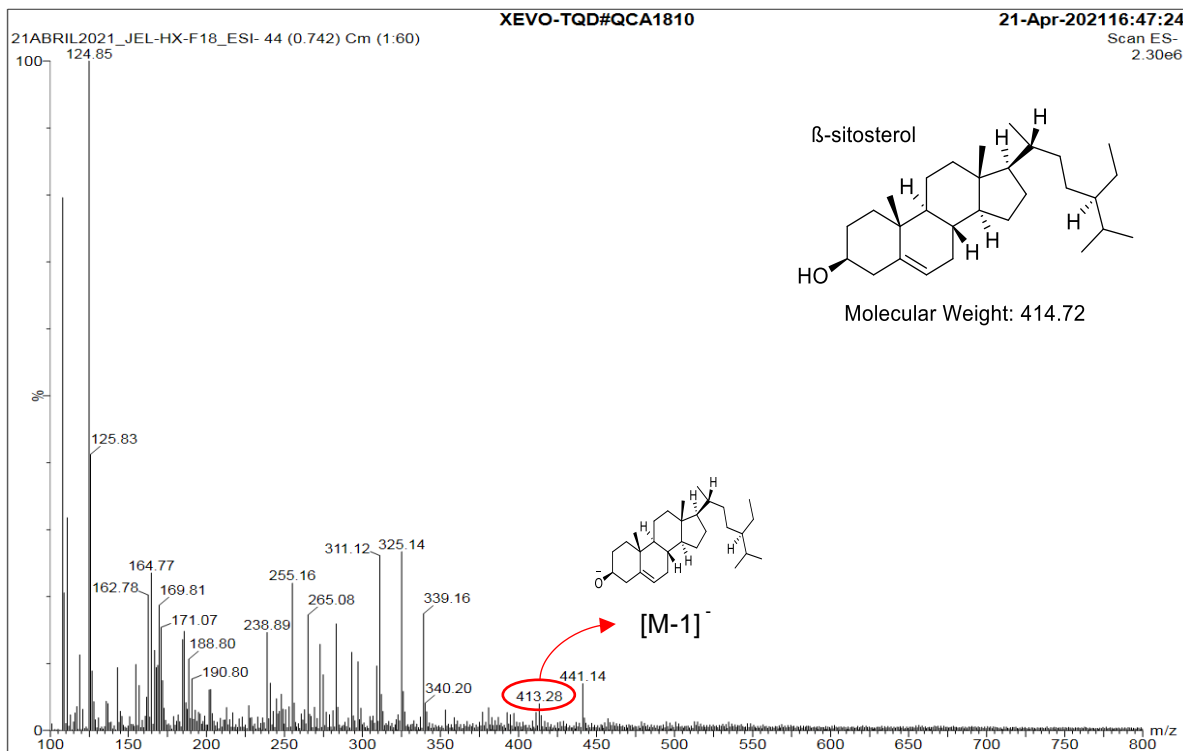


Figura 36. Espectro de Masas del β -Sitosterol con ESI-

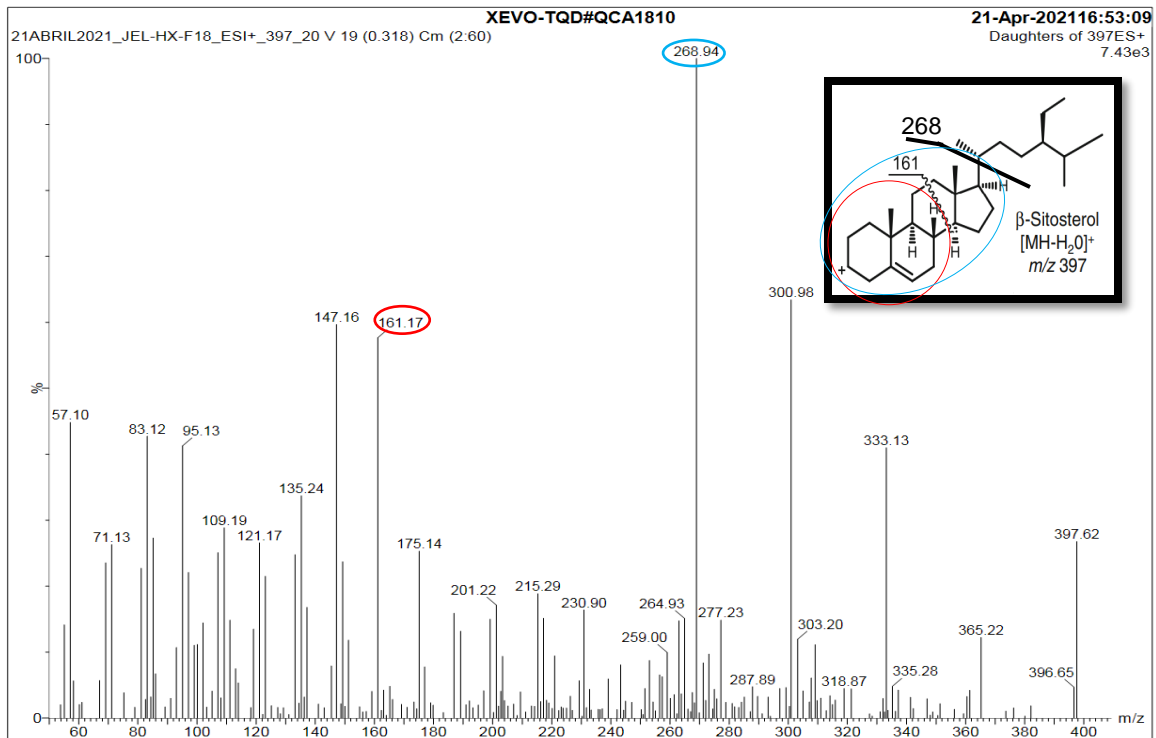


Figura 37. Espectro de MS/MS del β -Sitosterol con ESI+

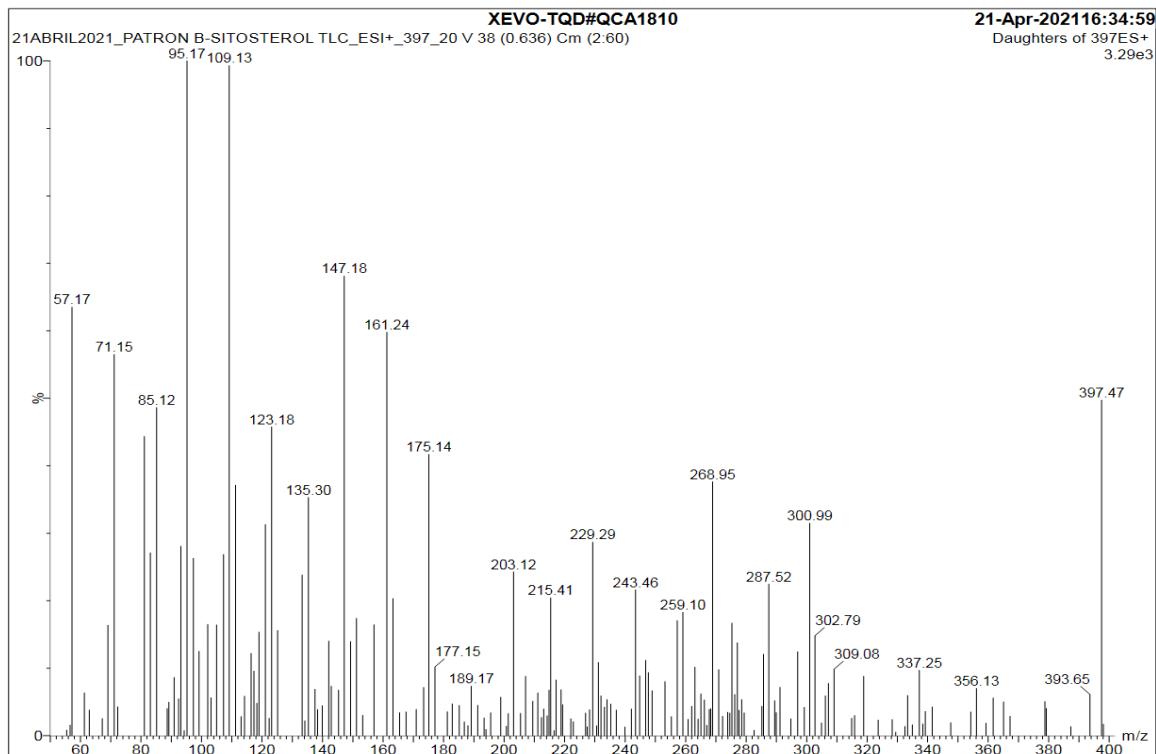


Figura 38. Espectro de MS/MS del patrón de β -Sitosterol con ESI+

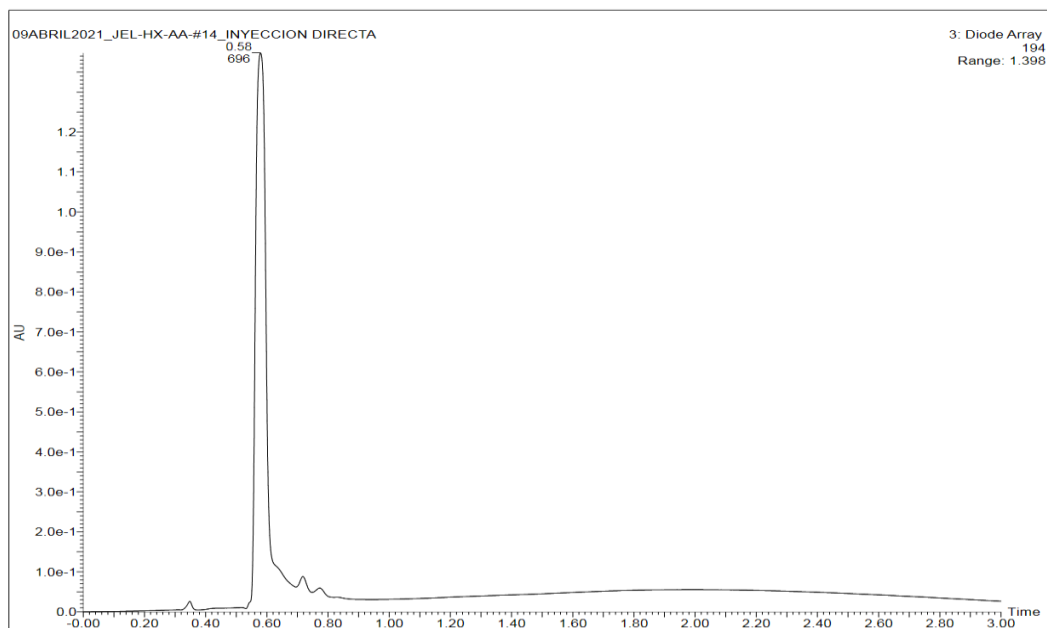


Figura 39. Cromatograma de la Lupenona

Finalmente, se analizó a la fracción JEL-Hx-AA-#14 y en el cromatograma (Figura 39) se puede observar que esta fracción también presenta un compuesto mayoritario, aunque esta posee un poco más de impurezas que las dos anteriores, pero son mínimas. El análisis mediante el espectro de masas ESI+ (Figura 40) permitió deducir que la estructura del compuesto presente en esta fracción corresponde a la del compuesto conocido como lupenona (con peso molecular de 424,7 g/mol), a partir de las señales de $m/z= 871$ que representa el $[2M+23]$ que es dímero de la lupenona con el aducto de sodio, $m/z= 447$ que representa $[M+23]$ que es el aducto de sodio y $m/z= 425$ de baja intensidad que representa el $[M+1]$ que es la lupenona protonado.

También se realizó el espectro de MS/MS de la señal $m/z= 447$ del lupenona (Figura 41). Se realizó una búsqueda en la literatura para realizar una respectiva comparación y se puede resaltar señales como $m/z= 273$ y 189.

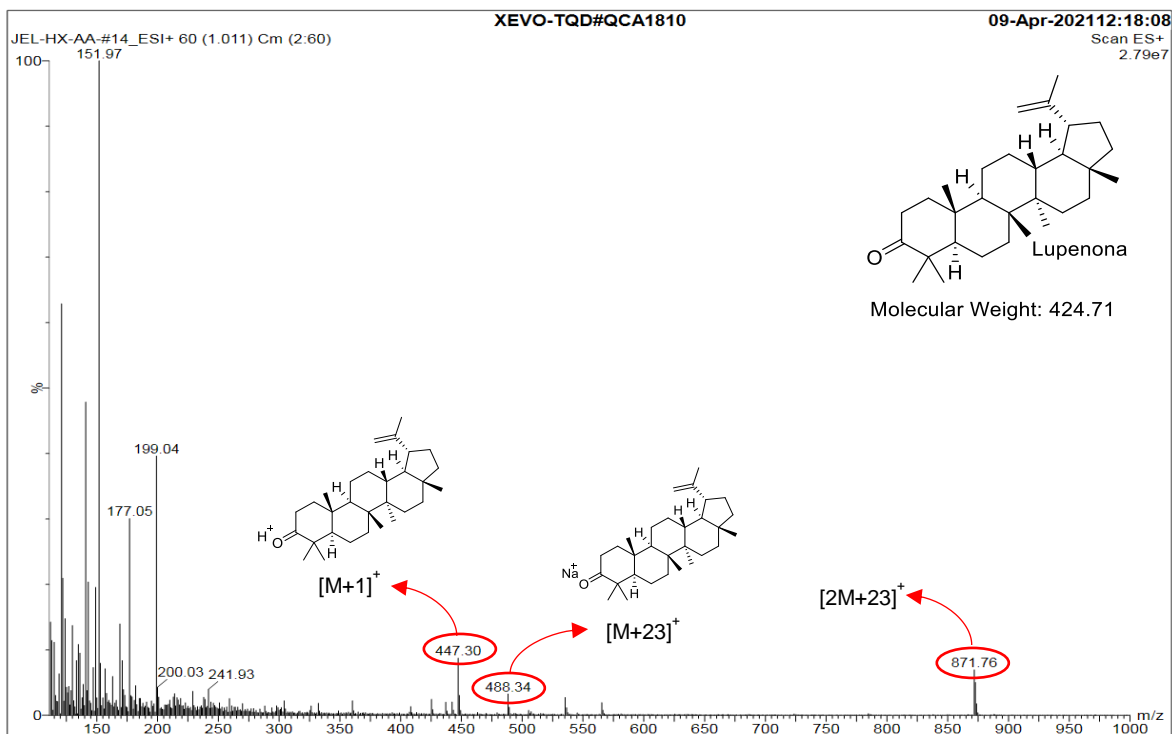


Figura 40. Espectro de masas del Lupenona con ESI+

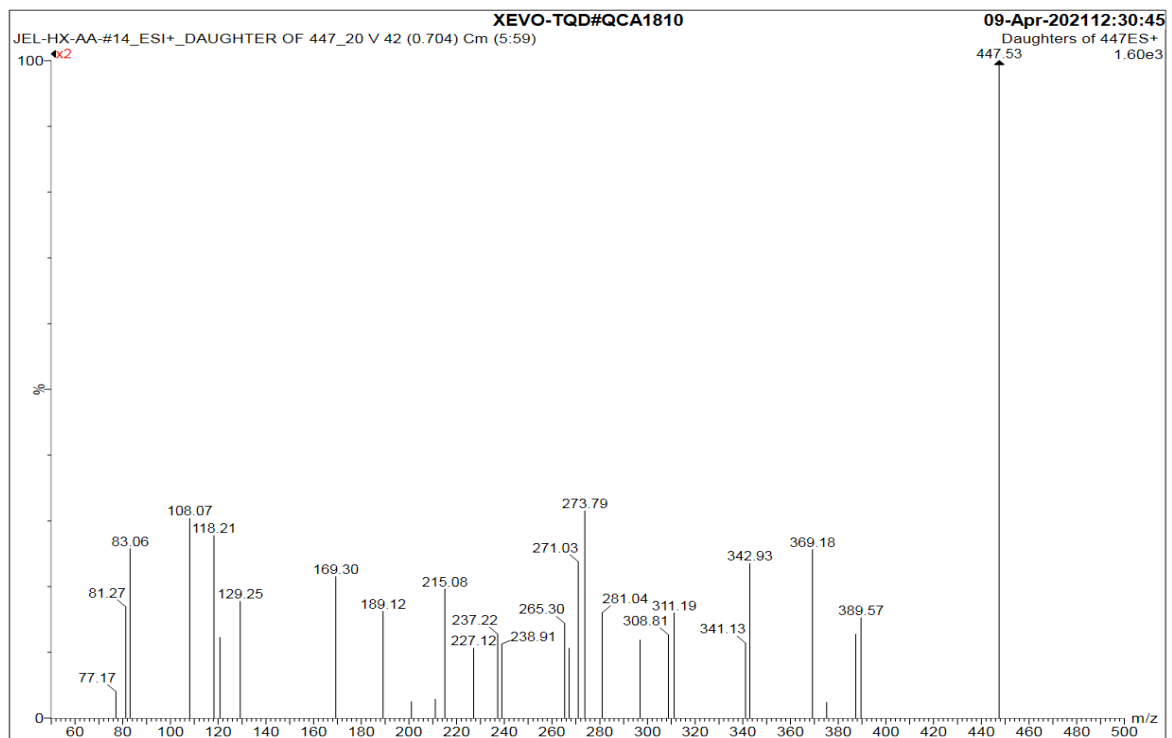


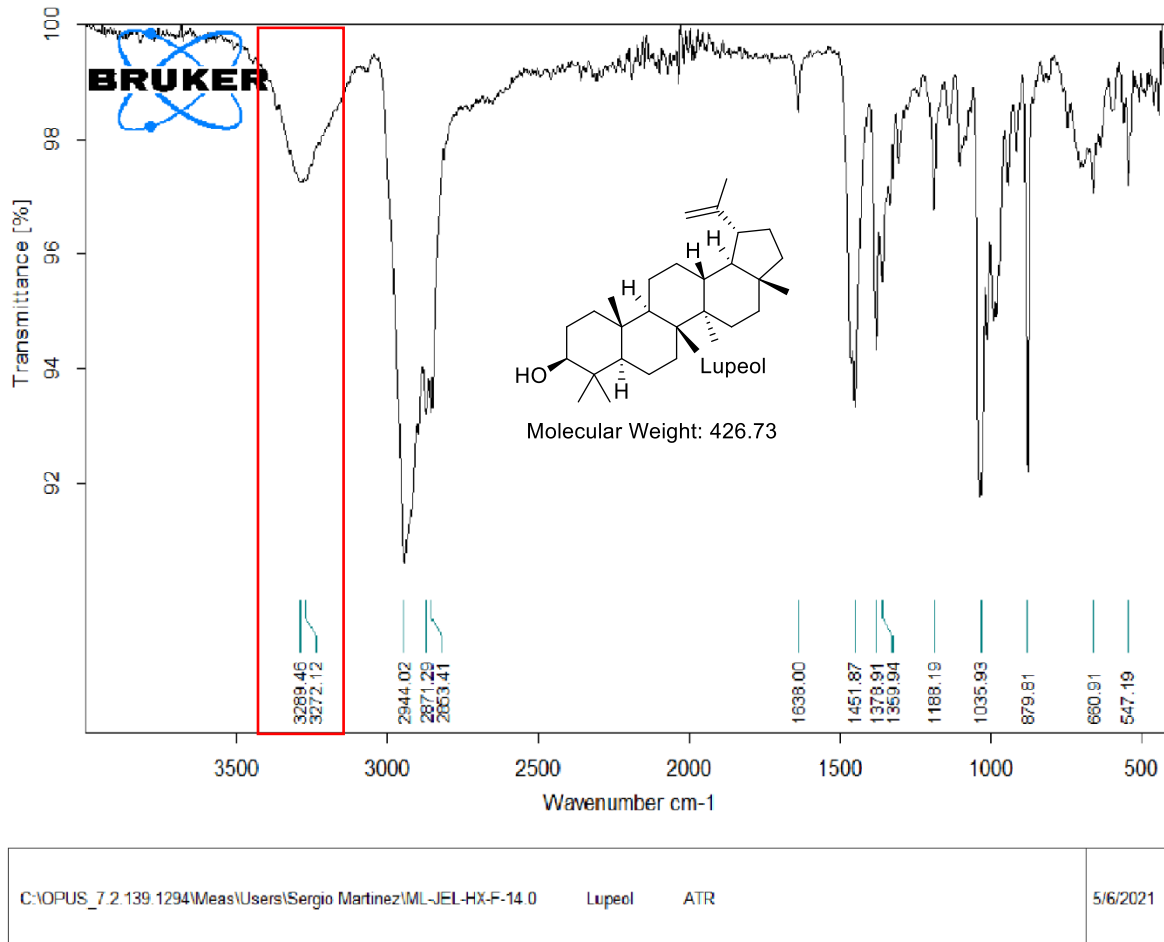
Figura 41. Espectro de MS/MS del Lupenona con ESI+

5.2.3.3 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja

Para la confirmación de que uno de los compuestos aislados y purificados es la Lupenona, se realizó la caracterización por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier. El espectrómetro de infrarrojo simplificado utilizado fue un Alpha II Bruker® (ver Figura 46) con el programa OPUS TOUCH. Este equipo posee un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) con una resolución de 4 cm^{-1} y hace lectura en las 3 regiones del infrarrojo. Para estas muestras sólidas, fue leída la transmitancia en infrarrojo medio de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ y con un total de 24 scans.



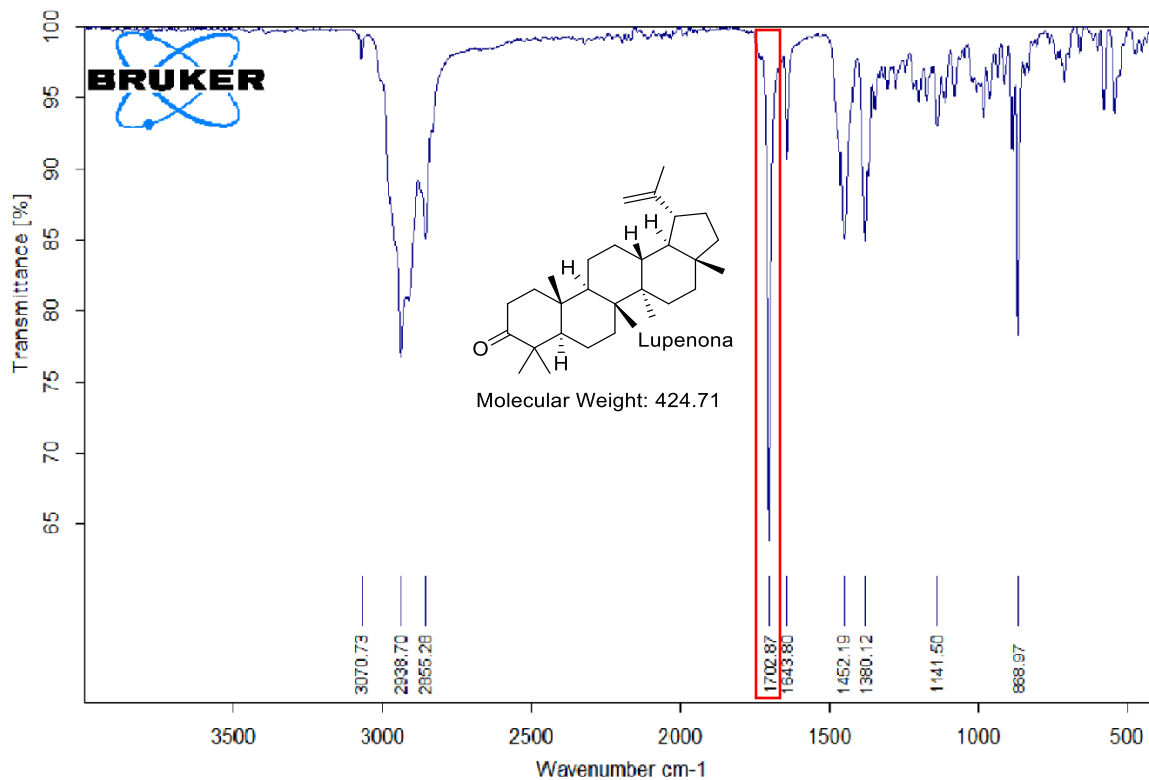
Figura 42. Alpha II Bruker® Espectrómetro de Infrarrojo con ATR



Page 1/1

Figura 43. Espectro de Infrarrojo Medio del Lupeol

Para esta comparativa fueron tomada el lupeol y la lupenona que poseen una estructura química similar, pero con la diferencia de un grupo funcional. Se observa señales de vibraciones de $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$ para el lupeol de 2944 y 2871 cm^{-1} (ver Figura 47) y las vibraciones de los anillos aromáticos por 1451 y 1379 cm^{-1} . Para el caso de la lupenona las vibraciones de $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$ por 2938 y 2855 cm^{-1} y las vibraciones de los anillos aromáticos por 1452 y 1380 cm^{-1} (ver Figura 48). Por último, en ambos espectro se observa una pico por los 880 característico del grupo vinilo en el C-19 para ambos compuestos.



C:\OPUS_7.2.139.1294\Meas\Users\Sergio Martinez\ML-JEL-HX-AA-14.0

Lupenona

ATR

5/6/2021

Page 1/1

Figura 44. Espectro de Infrarrojo Medio de la Lupenona

Para la elucidación estructural de la lupenona, que es la forma oxidada del lupeol al poseer un grupo cetónico en la posición C3 en vez de un hidroxilo. Por medio de la espectroscopia de infrarrojo nos permite identificar estos cambios de grupo funcionales al ver que en el espectro del lupeol (Figura 47) carece del pico característico del carbonilo por los 1750-1700 cm⁻¹ y muestra una banda ligeramente ancha por los 3280 cm⁻¹ que es característico de un grupo hidroxilo de alcohol. Comparando con el espectro de la lupenona (Figura 48) vemos lo contrario al este no poseer una banda ancha por los 3200-3500 cm⁻¹ pero sí el pico característico de del carbonilo por 1702 cm⁻¹.

5.2.4 Actividades Biológicas del Lupeol

Los triterpenos son componentes bioactivos de la dieta humana. En Occidente, se consume una media de 250 mg por día de triterpenos (una familia de fitosteroles), proveniente de aceites vegetales, cereales, frutas y verduras (Moreau, Whitaker, & Hicks, 2002).

El lupeol se encuentra en vegetales como el repollo, pimiento, pepino, tomate, en frutas como mango, fresa, uvas rojas y en plantas medicinales como el ginseng americano, planta de manteca utilizada por los nativos de América del Norte, América Latina, Japón, China, África e islas del Caribe (Imam, Azhar, Hasan, Ali, & Ahmed, 2007; Macias-Rubalcava, Hernandez-Bautista, Jimenez- Estrada, Cruz-Ortega, & Anaya, 2007).

El lupeol (Figura 49) es un sólido blanco, con fórmula química de $C_{30}H_{50}O$, un peso molecular de 426,7174 g/mol, su nombre IUPAC es (1R,3aR,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-3a,5a,5b,8,8,11a-hexametil-1-prop-1-en-2-il-

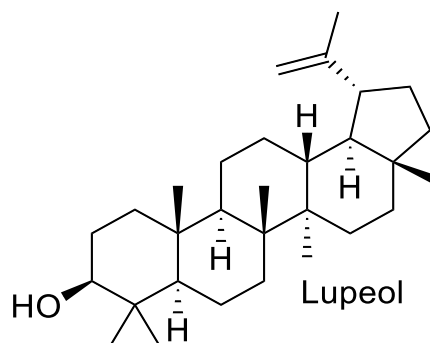


Figura 45. Lupeol

1,2,3,4,5,6,7,7a,9,10,11,11b,12,13,13a,13b-hexadecahidrociclopenta[a]chrisen-9-ol y con un punto de fusión es 215–216 °C (Harish, et al., 2008). Se ha demostrado que el lupeol exhibe diversos efectos farmacéuticos en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Algunos efectos beneficiosos son contra la inflamación, el cáncer, la artritis, la diabetes, las enfermedades cardíacas, la toxicidad renal y la toxicidad hepática (Sudhahar, Ashok Kumar, Varalakshmi, & Sujatha, 2008; Bradford & Awad, 2007; Blain, Ali, & Duance, 2009; Weidner, Krempf, Bard, Cazaubiel, & Bell, 2008; Ziegler, Staalsø, & Jaroszewski, 2006).

5.2.4.1 Actividad Antiinflamatoria

El potencial antiinflamatorio de lupeol se pudo evaluar a partir de la observación de un pretratamiento con lupeol redujo significativamente la producción de prostaglandina E2 (PGE2) en macrófagos estimulados por A23187. El tratamiento con lupeol (10-100 μ M) también disminuye la generación de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α e interleucina β). Tratamiento con lupeol (5,00-9,37 mg/kg) se informó que exhibe actividad antiinflamatoria con una inhibición máxima del 57,4 % (Fernandez, de las Heras, Garcia, Saenz, & Villar, 2001).

De manera similar, se demostró que el lupeol y sus derivados (linoleato, acetato y palmitato) exhiben una mayor actividad antiinflamatoria que la indometacina, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo de uso común en modelos de inflamación de rata y ratón (Sudhahar, Ashok Kumar, Varalakshmi, & Sujatha, 2008).

5.2.4.2 Agente Protector Dérmica

Se observó que los efectos protectores de la piel del lupeol estaban asociados con el potencial de mejorar el sistema antioxidante de la piel (Saleem, et al., 2003). Se realizó un estudio que emplea un modelo *in vitro* de explantes epidérmicos de queratinocitos de piel humana cultivados en una interfaz aire-líquido en una dermis deepidermizada humana para investigar el potencial del lupeol en la reparación de la piel (Nikiéma, et al., 2001).

5.2.4.3 Agente Antiartrítica

La inflamación crónica, la degradación ósea y la hinchazón en las articulaciones son los marcadores de la artritis humana (Blain, Ali, & Duance, 2009). El lupeol como potencial agente antiartrítico se ha probado en varios modelos de artritis *in vitro* e *in vivo*. El tratamiento con lupeol mejoró la condición general de los animales artríticos al brindar protección contra el dolor y mejorar su movilidad (Azebaze, et al., 2009). Las ratas artríticas tratadas con lupeol con una dosis de 50 mg/kg durante 7 días mostraron una reducción significativa de niveles de enzimas lisosomales y niveles aumentados de colágeno (Geetha & Varalakshmi, 1999).

5.2.4.4 Actividad Antimicrobiana

Se ha descubierto que el lupeol exhibe actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microbios comunes. El lupeol inhibe el crecimiento de varios tipos de bacterias gram positivas y gram negativas, hongos y especies virales (Erazo, et al., 2008; Ahmed, et al., 2010).

5.2.4.5 Actividad Antiparasitaria

Se ha reportado que el lupeol es eficaz contra varios tipos de protozoos patógenos. Estos incluyen los protozoos que causan malaria (*Plasmodium falciparum*), leishmaniasis (*Leishmania*) y tripanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) al inhibir la proliferación del parásito (Ziegler, Staalsø, & Jaroszewski, 2006).

5.2.4.6 Actividad Antidiabética

Varios estudios mostraron que el lupeol exhibe actividad antihiper glucémica y su administración reduce el riesgo de desarrollo de diabetes en modelos animales, fue demostrado que posee una actividad antidiabética en modelos *in vitro* e *in vivo* (Na, Kim, Osada, & Ahn, 2009). El potencial efecto terapéutico del lupeol para contrarrestar otras enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina inhibe la actividad de la α -glucosidasa, lo que sugiere que el efecto antidiabético del lupeol se debe a la supresión de la absorción de carbohidratos en el intestino (López, Chérigo, Sedas, Spadafora, & Martínez-Luis, 2018).

Datos obtenidos por Lilia Chérigo y Sergio Martínez, obtuvieron un $CI_{50} = 0,58 \pm 0,03 \mu M$ como resultado de un potente inhibidor de la α -glucosidasa a comparación del control positivo de acarbosa con $CI_{50} = 217,7 \pm 10,95 \mu M$ y por medio de un análisis cinético de Lineweaver-Burk obtuvieron que posee una inhibición reversible competitiva (Chérigo & Martínez-Luis, Identification of Major α -Glucosidase Inhibitors from Stem Bark of Panamanian Mangrove Plant *Pelliciera rhizophorae*, 2019).

5.2.4.7 Agente Cardioprotector

Los esteroides vegetales se han investigado como uno de los métodos alternativos seguros y potenciales para reducir los niveles de colesterol plasmático. Se sabe que la hipertensión causa accidente cerebrovascular, trastornos cardíacos e insuficiencia renal. El tratamiento con lupeol (15 mg/kg) restaura la presión arterial a niveles normales en estos animales. Este estudio implica que el lupeol tiene potencial para desarrollarse como agente para el tratamiento de la hipertensión (Jenkins, et al., 2008; Weidner, Krempf, Bard, Cazaubiel, & Bell, 2008).

5.2.4.8 Anticancerígeno

Estudios recientes han demostrado que las dietas ricas en fitoquímicos pueden reducir significativamente el riesgo de cáncer hasta en un 20 % de los cánceres comunes, incluidos los cánceres de colon, mama, piel, páncreas y próstata. Varios triterpenoides se han mostrado prometedores como agentes antineoplásicos y exhiben actividad antiproliferativa cuando se prueban contra varias líneas de células cancerosas (Bradford & Awad, 2007).

El efecto antitumoral de lupeol estaban asociados con su potencial para modular las vías de señalización como el NF-kB (factor nuclear kappa B) (Saleem, Afaq, Adhami, & Mukhtar, 2004). Demostramos que lupeol inhibe el crecimiento de tumores altamente metastásicos de origen melanoma humano mediante la modulación de la proporción de niveles de proteína Bcl-2 y Bax *in vitro* e *in vivo* (Saleem, et al., 2008).

La observación más importante en este estudio fue que no se observó ningún efecto tóxico en los melanocitos humanos normales a una dosis a la que lupeol mata las células de melanoma malignas. Estos estudios sugieren que el propio lupeol, al no ser tóxico para las células normales, podría utilizarse como agente quimiopreventivo y quimioterapéutico contra el cáncer de piel (Hata, Hori, Murata, & Takahashi, 2005).

5.2.4.9 Tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer

La acumulación de β -amiloide ($A\beta$) en placas fibrilares y oligómeros solubles en las regiones superiores del cerebro define la enfermedad de Alzheimer (EA). Se postula que la EA se caracteriza por ovillos neurofibrilares intracelulares, neuroinflamación y disfunción neuronal que conduce a la muerte.

Los niveles de proteína de BACE1 son significativamente más altos en pacientes con EA, lo que explica la gran importancia que se le da a la inhibición de BACE1 (Ahmed, et al., 2010).

El lupeol y la lupenona se aislaron y posteriormente mostraron una actividad inhibidora de BACE1 notable o moderada con valores de CI_{50} de 5,12 y 62,98 mmol/L respectivamente, en comparación con el control positivo quercetina con valor de $CI_{50} = 21,28$ mmol/L (Koirala, Seong, Jung, & Choi, 2017). El estudio de cinética enzimática nos permitió identificar ambos compuestos como inhibidores competitivos, donde lupeol mostró una inhibición muy potente contra BACE1. Esto es debido al grupo hidroxilo (OH) en C-3 que podría desempeñar un papel fundamental en la inhibición de esta enzima, como sugiere la potente actividad citotóxica vía modelaje molecular (Siddique, Naime, & Saleem, 2011).

5.2.4.10 Toxicidad

Se ha reportado que el lupeol no presenta toxicidad en los estudios con animales y en las referencias. Lupeol probado en dosis de 40 a 200 mg/kg bajo varios protocolos (tratamiento a largo o corto plazo) no mostró ningún efecto de toxicidad sistémica en animales (Patoc̃ka, 2003). Tomados en conjunto, estos estudios proporcionan evidencia convincente de que lupeol es un agente quimiopreventivo y quimioterapéutico no tóxico pero muy potente. (Saleem, Afaq, Adhami, & Mukhtar, 2004).

5.2.5 Actividades Biológicas del β -Sitosterol

El β -sitosterol (Figura 49), es un sólido blanco con fórmula química es $C_{29}H_{50}O$, un peso molecular 414,71 g/mol, con nombre IUPAC (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(2R,5R)-5-etil-6-metilheptan-2-il]-10,13-dimetil-

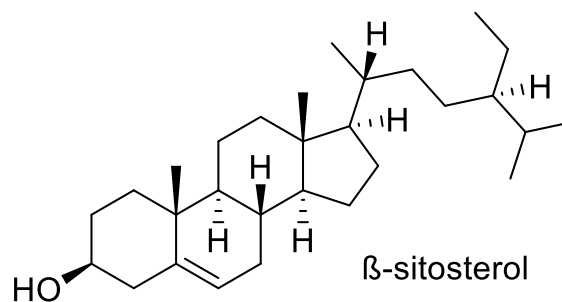


Figura 46. β -sitosterol

2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidro-

1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol y es un compuesto esteroide ópticamente activo. El β -sitosterol (Figura 30) es un fitosterol natural. Es una molécula esteroidea similar al colesterol pero es de origen vegetal (Sandqvist & Bengtsson, 1931).

5.2.5.1 Actividad Antiinflamatoria

El β -sitosterol está relacionada estructuralmente con el colesterol, pero se absorbe más lentamente en el tracto intestinal, interfiriendo con la absorción del colesterol y evitando su aumento en el suero (Tapiero, Townsend, & Tew, 2003). El β -sitosterol actúa en dos tipos de reacciones inflamatorias agudas: una fue una reacción inmune expresada por la reacción pasiva inversa de Arthus en la rata, y la otra fue una reacción no específica mostrada en el ensayo de edema de oreja de ratón. Además, se sugiere que el β -sitosterol modula la función inmunológica, la inflamación y los niveles de dolor al controlar la producción de citocinas inflamatorias (Awad & Fink, 2000).

Se ha observado una reducción del β -sitosterol en la liberación de ácido araquidónico y la producción de prostanglandina E2, inducida por lipoproteínas oxidadas de baja densidad (Vivancos & Moreno, 2008). Estos datos implican posibles mecanismos implicados en los

efectos reguladores del β -sitosterol en la expresión de moléculas de adhesión, la interacción célula-célula y la inflamación (Moreno, 2001).

5.2.5.2 Actividad Antiviral

El β -sitosterol es un candidato para el desarrollo de fármacos anti-virulencia contra patógenos que dependen de las toxinas del colesterol para su infección exitosa (Li, et al., 2015). El β -Sitosterol bloquea la respuesta inmunitaria mediada por la señalización RIG-I y la producción deletérea de IFN, lo que proporciona un beneficio potencial para el tratamiento de la influenza (Zhou, et al., 2020).

5.2.5.3 Actividad Antioxidante

Los efectos del β -sitosterol en la dieta a diferentes niveles de lípidos séricos, la función inmunitaria, el estado oxidativo y la morfología intestinal en pollos. Llegaron a la conclusión de que la suplementación con β -sitosterol en la dieta podría regular el nivel de colesterol sérico, promover la función inmunológica y mejorar el estado oxidativo intestinal y la morfología en pollos (Cheng, et al., 2020).

Se ha demostrado que la cardioprotección del β -Sitosterol está mediada por su capacidad para fortalecer la defensa antioxidante intracelular. En particular, se ha demostrado que el β -sitosterol proporciona protección contra el estrés oxidativo mediante la modulación de enzimas antioxidantes (Loizou, Lekakis, Chrousos, & Moutsatsou, 2010).

5.2.5.4 Carencia de Actividad Antidiabética

A pesar de ser un fitoesterol y poseer similitudes con el lupeol, los resultados obtenidos fueron negativos al ser inactivo contra la α -glucosidasa en los reportes (Chérigo & Martínez-Luis, Identification of Major α -Glucosidase Inhibitors from Stem Bark of Panamanian Mangrove Plant *Pelliciera rhizophorae*, 2019).

5.2.5.5 Inmunoestimulante

Se ha informado de que el β -sitosterol puede considerarse un inmunomodulador en cerdos (Fraile, et al., 2012). El β -sitosterol se dirige a los linfocitos T específicos, las células Th1 y Th2, y ayuda a normalizar el funcionamiento y da como resultado una mejora de la actividad de los linfocitos T y las células asesinas naturales en numerosos procesos patológicos relacionados con anomalías crónicas mediadas por el sistema inmunitario, como las infecciones virales crónicas, tuberculosis, artritis reumatoide, alergias, cáncer y enfermedades autoinmunes (Bouic & Lamprecht, 1999). Los fitoesteroles podrían usarse para prevenir la inmunosupresión sutil asociada con el estrés físico excesivo (Bouic, et al., 1999).

5.2.5.6 Anticancerígeno

Muchos informes reportan su actividad anticancerígena en varios modelos celulares *in vitro* en los cuales el β -sitosterol demostró una mayor selectividad que el metotrexato (Ovesna, Vachalkova, & Horvathova, 2004). El β -sitosterol se reconoce claramente como un componente valioso de la dieta humana que posee propiedades anticancerígeno o preventivas del cáncer debido a su interacción con diversas dianas y vías celulares ya que modula el crecimiento de

células cancerosas como el cáncer de mama y de próstata los cuales son sensibles a los estrógenos (Ju, Clausen, Allred, Almada, & Helferich, 2004; Awad A. , Fink, Williams, & Kim, 2001).

Los pacientes con cáncer de mama y próstata pueden beneficiarse de los hallazgos de que el β -sitosterol dietético mejora la eficacia del tamoxifeno (Eid, El-Readi, Eldin, Fatani, & Wink, 2013). Los fitoesteroles dietéticos (incluido el β -sitosterol) inhiben el crecimiento y la metástasis de las células cancerosas (Imanaka, Koide, Shimizu, Asai, & Kinouchi Shimizu, 2008).

El β -sitosterol tiene efectos protectores contra los tumores en animales con dieta de fitoesteroles ya que fueron un 40% más pequeños los tumores de estos animales en comparación con los controles alimentados con colesterol. Además, el número de animales con metástasis en los ganglios linfáticos y los pulmones se redujo a la mitad del grupo de colesterol de control (Imanaka, Koide, Shimizu, Asai, & Kinouchi Shimizu, 2008).

En el estudio del cáncer de colon, se demostró que el β -sitosterol sirve como una sustancia eficaz que reduce el estrés oxidativo *in vivo* y, por tanto, actúa como agente quimiopreventivo en la carcinogénesis del colon (Eid, El-Readi, Eldin, Fatani, & Wink, 2013). Los experimentos se basaron en la inducción de carcinogénesis de colon por 1,2-dimetilhidrazina (DMH). DMH aumentó la peroxidación de lípidos hepáticos. El β -sitosterol fue capaz de proteger eficazmente el organismo de animales experimentales contra el agotamiento inducido por DMH de catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa y glutatión reducido en colon e hígado de ratas experimentales (Baskar, Al Numair, Gabriel Paulraj, Alsaif, & Muamar, 2012).

5.2.5.7 Toxicidad

En los ensayos donde se le administraba β -sitosterol a ratas no se encontró toxicidad en animales tratados con 20 y 30 mg de esta. Se ha informado que la administración repetida a corto plazo de β -sitosterol en ratas no produce lesiones macroscópicas o microscópicas en el hígado o el riñón (Malini & Vanithakumari, 1990), pero no se ha elaborado un informe de este tipo sobre humanos que toman β -sitosterol durante mucho tiempo. Un extenso estudio toxicológico ha demostrado una DL_{50} elevada en ratas por una concentración mayor a 2 g/kg de peso de la rata (Paniagua-Pérez, et al., 2005).

5.2.6 Actividades Biológicas de la Lupenona

La lupenona (Figura 50) es un triterpenoide, principalmente tiene un papel como metabolito que se deriva de un hidruro de un lupano. La lupenona es un polvo blanco con un peso molecular de 424,7 g/mol, su fórmula química de $C_{30}H_{48}O$ y su nombre IUPAC es (1R,3aR,5aR,5bR,7aR,11aR,11bR,13aR,13bR)-

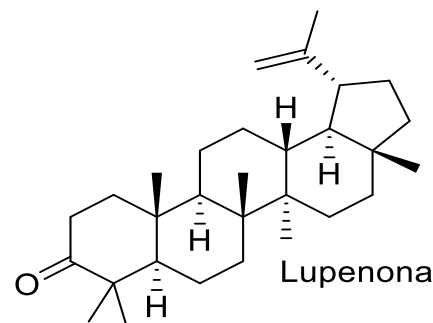


Figura 47. Lupenona

3a,5a,5b,8,8,11a-hexametil-1-prop-1-en-2-il-2,3,4,5,6,7,7a,10,11,11b,12,13,13a,13b-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]crisen-9-ona (Xu, Huang, Wu, & Wang, 2018).

Los triterpenoides se encuentran ampliamente en las plantas. La lupenona es un ingrediente natural muy común distribuido en plantas multifamiliares como Asteraceae, Balanophoraceae, Cactaceae, Iridaceae, Musaceae, Urticaceae, Leguminosae, Bombacaceae, etc., pero su distribución no es regular (Meng, Huang, & Liu, 2008). El consumo de lupenona en la dieta vegetariana es alto en vida humana. Estudios recientes han presentado que la lupenona tiene una variedad de actividades farmacológicas que incluyen la regulación de la función inmunológica antiinflamatoria, antidiabética, anticancerígena (Jin, Son, Min, Jung, & Choi, 2016; Madureira, et al., 2003; Andrade, et al., 2020; Yonemoto, Shimada, GunawanPuteri, Kato, & Kawabata, 2014).

5.2.6.1 Actividad Antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria está estrechamente relacionada con la aparición y el desarrollo de muchas enfermedades, como la diabetes y el cáncer (Dandona, Aljada, & Bandyopadhyay,

2004). En estudios previos se reportó que la lupenona podría inhibir la inflamación inducida por TPA en ratones (Yasukawa, et al., 1995), y el resultado ha sido reproducido por Sosa et al. y Romero-Estrada et al. (Sosa, et al., 2007; Romero-Estrada, et al., 2016). Además, la lupenona podría reducir la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ERO), así como los niveles de proteína inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el RAW estimulado por lipopolisacáridos (LPS), lo que indica que la lupenona puede usarse para tratar y prevenir diversas enfermedades inflamatorias y enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Jin, Son, Min, Jung, & Choi, 2016).

5.2.6.2 Actividad Antiviral

En los últimos años, se ha informado que muchos triterpenoides de origen vegetal tienen una buena actividad antiviral y reciben una atención generalizada (Kang, Seo, & Lim, 2016; Zhang, et al., 2014). En las investigaciones recientes, los resultados indican que la lupenona exhibe un fuerte efecto inhibitorio de la placa viral contra el virus del herpes simple VHS-1 y VHS-2, y también inhibe el virus de la peste porcina africana (Madureira, et al., 2003).

5.2.6.3 Actividad Antiparasitaria

Se evaluó el efecto leishmanicida de la lupenona frente a las formas promastigote y amastigote de *L. amazonensis*. Este triterpeno redujo significativamente la proliferación de promastigotes, con un valor de CI_{50} de 20 μ M, siendo menos potente que el fármaco de referencia, la anfotericina B que es utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis, que presentó una CI_{50} de 0,09 μ M. Sin embargo, la lupenona fue menos citotóxica que la anfotericina B. Esta actividad

antiparasitaria podría estar relacionada con la interferencia en las vías de biosíntesis de lípidos. No se observó actividad de la lupenona contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Andrade, et al., 2020).

5.2.6.4 Actividad Antidiabética

Un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las plantas que contienen lupenona tienen una actividad antidiabética. En algunos estudios, la lupenona ha mostrado una inhibición de la actividad de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa en los órganos digestivos, lo que previene la diabetes (Jeong, et al., 2015; Yonemoto, Shimada, GunawanPuteri, Kato, & Kawabata, 2014).

5.2.6.5 Anticancerígeno

En la actualidad, la mayoría de los informes sobre la lupenona como anticancerígeno se llevan a cabo *in vitro* y la selectividad de esta. La actividad de la enzima PTP1B está estrechamente relacionada con la aparición y el desarrollo del cáncer, incluido el cáncer de mama humano, el cáncer de colon, el cáncer de próstata, el cáncer gástrico, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer de esófago, entre otras (Wang, et al., 2012; Liu, et al., 2015). La lupenona tiene un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad de la enzima PTP1B, lo que indica que la lupenona tiene potencial para combatir el cáncer. En otro estudio, los resultados muestran que la lupenona tiene actividad anticancerígena contra las células de cáncer de mama MCF-7 utilizando un ensayo de rojo neutro (Wiener, et al., 1994).

La lupenona estimula la melanogénesis en células de melanoma murino B16 y células de melanoma B16 2F2. Esta melanogénesis es producida por la lupenona que estimula el aumento de la enzima tirosinasa a través de la inhibición de la fosforilación de las quinasas 1 y 2 que están reguladas por señales extracelulares fosforiladas de la proteína quinasa activada por mitógenos (Villareal, et al., 2013).

5.2.6.6 Toxicidad

La lupenona se evaluó frente a células de mamífero para determinar la citotoxicidad. La lupenona mostró $CC_{50} = 31,95 \mu\text{g/mL}$, siendo varias veces menos citotóxica en comparación con la violeta de genciana, el fármaco de referencia, que mostró un $CC_{50} = 1,16 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ en este ensayo (Andrade, et al., 2020).

6. Conclusiones

y

Recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Por medio del estudio fitoquímico realizado a las hojas de la *Mora oleífera* se determinó la presencia de metabolitos secundarios con esqueletos de tipo triterpeno y esterol utilizando la espectrometría de masas como herramienta de elucidación estructural.
- Los extractos de las hojas de la *Mora oleífera* (hexano, diclorometano y acetato de etilo) no son citotóxico ni fitotóxico.
- El trabajo experimental realizado permitió el aislamiento e identificación de los compuestos Lupeol, Lupenona, y β -Sitosterol en la fracción apolar del extracto de hexano. Los triterpenos pentacíclicos son inhibidores de la enzima alfa glucosidasa el esterol es inactivo.
- La presencia de los fitoquímicos en las hojas de la *Mora oleífera* permite determinar que esta especie de manglar posee potencial farmacéutico como actividad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y anticancerígeno añadiéndole un gran valor a los manglares endémicos de Panamá para su conservación.

6.2 Recomendaciones

- En este trabajo, se presentaron algunos de los compuestos aislados. Para un estudio más completo de la composición fitoquímica de las hojas de la *Mora oleífera* se requiere continuar con el análisis de cada fracción y fraccionamientos de los otros extractos.
- Para posteriores trabajos, deberán enfocarse en estudios de las hojas de la *Mora oleífera* frescas para obtener un amplio conocimiento de la composición de este manglar endémico de Panamá y Colombia.
- Debido a las cantidades significativas de triterpenos en los manglares, se recomienda hacer una correlación de los usos de estos con respecto a las condiciones y amenazas ambientales a que son sometidas los manglares.
- Para una mejor comprensión del efecto de estos triterpenos en la inhibición de la enzima alfa-glucosidasa, se recomienda realizar derivados de estas para estudiar si afecta positivamente o negativamente a la inhibición de esta enzima.

7. Referencias

7. Referencias

- Afidah, A., Emmanuel, R., Jein, S., Jain, M., Sani, M., & Hasnah, O. (2008). Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. *Food Chem.* 107, 200-207.
- Aggarwal, B., Takada, Y., & Oommen, O. (2004). From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Exp. Opin. Investig. Drugs*, 1327-1338.
- Ahmed, R., Holler, C., Webb, R., Li, F., Beckett, T., & Murphy, M. (2010). BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 112(4), 1045-1053.
- Ahmed, S., Swamy, B., Gopkumar, P., Dhanapal, R., & Chandrashekara, V. (2005). Anti-diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. *Iran J. Pharmacol. Therapeutic.* 4, 36-39.
- Ahmed, Y., Sohrab, M., Al-Reza, S., Tareq, F., Hasan, C., & Sattar, M. (2010). Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*. *Food Chem. Toxicol.*, (48) 549-552.
- American Diabetes Association, .. (2011). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care.
- Andrade, E., Teixeira, J., Silva, D., dos Santos, T., Korn, M., Brandão, H., & Júnior, A. (2020). Phytochemical Analysis, Multi-Element Composition and Biological Activities of Extracts and Lupenone from *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W.Grimes. *J. Braz. Chem. Soc.*, 31 (9), 1825-1837.
- Awad, A., & Fink, C. (2000). Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Nutr.* 130, 2127-2130.
- Awad, A., Fink, C., Williams, H., & Kim, U. (2001). In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev* 10, 507-513.
- Azebaze, A., Menasria, F., Noumi, L., Nguemfo, E., Tchamfo, M., & Nkengfack, A. (2009). Xanthenes from the seeds of *Allanblackia monticola* and their apoptotic and antiproliferative activities. *Planta Med.* (75) , 243-248.
- Babu, B., Shylesh, B., & Padikkala, J. (2001). Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia* 72, 272-277.
- Bandaranayake, W. (2002). Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetl. Ecol. Manag.* 10, 421-452.

- Baskar, A., Al Numair, K., Gabriel Paulraj, M., Alsaif, M., & Muamar, M. (2012). β -sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *J. Med. Food* 15, 335-343.
- Blaber, S. (2007). Mangroves and fishes: issues of diversity, dependence, and dogma. *Bull. Mar. Sci.*, 457-472.
- Blain, E., Ali, A., & Duance, V. (2009). *Boswellia frereana* (frankincense) suppresses cytokine-induced matrix metalloproteinase expression and production of pro-inflammatory molecules in articular cartilage. *Phytother. Res.* (24), 905-912.
- Blasco, F. (1984). *Taxonomic considerations of mangrove species. In The mangrove ecosystem: research methods.* París: UNESCO.
- Bouic, P., & Lamprecht, J. (1999). Plant sterols and sterolins: A review of their immunomodulating properties. *Altern Med. Rev.*, 170-177.
- Bouic, P., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E., & Liebenberg, R. (1999). The effects of β -sitosterol (BSS) and β -sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: Inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *Int. J. Sports Med.*, 258-262.
- Bradford, P., & Awad, A. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* (51), 161-170.
- Busch, C., Burkard, M., Leischner, C., Lauer, U., Frank, J., & Venturelli, S. (2015). Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin. Epigenetics* 7, 64-82.
- Buss, A., & Butler, M. (2010). *Natural Product Chemistry for Drug Discovery (Vol. 18 in RSC Biomolecular Sciences).* Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Cannell, R. J. (1998). *Natural products Isolation.* Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Chan, H., Sun, H., Reddy, M., & Wu, T. (2010). Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus*. *Phytochemistry* 71, 1360–1364.
- Chapman, V. J. (1976). *Mangroves Vegetation.* Alemania: J. Cramer.
- Cheng, Y., Chen, Y., Li, J., Qu, H., Zhao, Y., & Wen, C. (2020). Dietary β -sitosterol regulates serum lipid level and improves immune function, antioxidant status, and intestinal morphology in broilers. *Poultry Science* 99 (3), 1400-1408.
- Chérigo, L., & Martínez-Luis, S. (2019). Identification of Major α -Glucosidase Inhibitors from Stem Bark of Panamanian Mangrove Plant *Pelliciera rhizophorae*. *Nat. Prod. Commun.* Vol 14(1), 15-18.

- Chérigo, L., Lezcano, J., & Martínez-Luis, S. (2017). Diversity and Allelopathic Potential of Weeds among Panamanian Coffee Crops. *Online J. Biol. Sci.* 17 (3), 232-239.
- Chin, Y., Balunas, M., Chai, H., & Kinghorn, A. (2006). Drug discovery from natural sources. *AAPS Journal* 8 (2), 239-253.
- Costanza, R., de Groot, R., Sutton, P., van der Ploeg, S., Anderson, S., Kubiszewski, I., . . . Turner, R. (2014). Changes in the global value of ecosystem services. *Glob. Environ. Change*, 152-158.
- Cragg, G., & Newman, D. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.*, 7-24.
- Cuong, H., & Van, V. (1964). Nouveautés pour la Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam (Uuiizoporaceae, Sonneratiaceae, Myrtaceae). *Addisonia* 4, 343-347.
- Dandona, P., Aljada, A., & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 1, 4-7.
- Der Marderosian, A., & Beutler, J. (2003). *The Review of Natural Products*. Seattle, WA, USA: Facts and Comparisons.
- Dewick, P. (2002). *Medicinal Natural Products A Biosynthetic*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.
- Eid, S., El-Readi, M., Eldin, E., Fatani, S., & Wink, M. (2013). Influence of combinations of digitonin with selected phenolics, terpenoids, and alkaloids on the expression and activity of P-glycoprotein in leukaemia and colon cancer cells. *Phytomedicine* 21, 47-61.
- El-Harbawi, M. (2014). Toxicity Measurement of Imidazolium Ionic Liquids Using Acute Toxicity Test. *Procedia Chemistry* (9), 40–52.
- Ellison, A. M., Farnsworth, E. J., & Merkt, R. E. (1999). Origins of mangrove ecosystems and mangrove biodiversity anomaly. *Glob. Ecol. Biogeogr.*, 95-115.
- Erazo, S., Rocco, G., Zaldivar, M., Delporte, C., Backhouse, N., & Castro, C. (2008). Active metabolites from *Dunalia spinosa* resinous exudates. *Z. für Nat. C*, (63) 492-496.
- Farnsworth, N., & Soejarto, D. (1991). Global Importance of Medicinal Plants. *Conservation of Medicinal Plants*, 25-52.
- Faulkner, D. (2002). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19(1), 1-19.
- Fernandez, M., de las Heras, B., Garcia, M., Saenz, M., & Villar, A. (2001). New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.*(53), 1533–1539.

- Fraile, L., Crisci, E., Córdoba, L., Navarro, M., Osada, J., & Montoya, M. (2012). Immunomodulatory properties of betasitosterol in pig immune responses. *Int. Immunopharmacol.*, 316-321.
- Geetha, T., & Varalakshmi, P. (1999). Effect of lupeol and lupeol linoleate on lysosomal enzymes and collagen in adjuvant-induced arthritis in rats. *Mol. Cell. Biochem.*, (201) 83-87.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L. L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., . . . Duke, N. (2011). Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Glob. Ecol. Biogeogr.*, 154–159.
- Graham, A. (1995). Diversification of Gulf/Caribbean Mangrove Communities Through Cenozoic Time. *Biotropica*, 27(1), 20-27.
- Grifo, F., Newman, D., Fairfield, A., Bhattacharya, B., & Grupenhoff, J. (1997). Biodiversity and Human Health. *Island Press*, 131.
- Hamilton, S. (2020). *Mangroves and aquaculture: A five decade remote sensing analysis of Ecuador's estuarine environments*. Switzerland, Cham: Springer.
- Hamilton, S., & Casey, D. (2016). Creation of a high spatio-temporal resolution global database of continuous mangrove forest cover for the 21st century (CGMFC-21). *Glob. Ecol. Biogeogr.* 25 (6), 729–738.
- Hanson, J. R. (2003). *Natural Products: The Secondary Metabolites*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Harish, B., Krishna, V., Santosh Kumar, H., Khadeer Ahamed, B., Sharath, R., & Kumara Swamy, H. (2008). Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-beta-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. *Phytomedicine*, (15) 763–767.
- Hata, K., Hori, K., Murata, J., & Takahashi, S. (2005). Remodeling of actin cytoskeleton in lupeol-induced B16 2F2 cell differentiation. *J. Biochem.*(138), 467-472.
- Hogarth, P. (2015). *The biology of mangroves and seagrasses*. Oxford, USA: Oxford University Press.
- Huang, M., Lu, J., Huang, M., Bao, J., Chen, X., & Wang, Y. (2012). Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 1801-1818.
- Imam, S., Azhar, I., Hasan, M., Ali, M., & Ahmed, S. (2007). Two triterpenes lupanone and lupeol isolated and identified from *Tamarindus indica* linn. *Pak. J. Pharm. Sci.* (20), 125–127.

- Imanaka, H., Koide, H., Shimizu, K., Asai, T., & Kinouchi Shimizu, N. (2008). Chemoprevention of tumor metastasis by liposomal β -sitosterol intake. *Biol. Pharm. Bull* 31, 400-404.
- Ishitsuka, M., & Kusumi, T. (1988). Antitumor xenicane and norxenicane lactones from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *J. Org. Chem.* 53, 5010–5013.
- Jain, K., Afidah, A., & Azman, I. (2002). Anti-corrosive performance of wash primer based on mangrove tannin. *Proceedings of the 15th Symposium of Malaysian chemical Engineering*, 323-327.
- Jenkins, D., Kendall, C., Nguyen, T., Marchie, A., Faulkner, D., & Ireland, C. (2008). Effect of plant sterols in combination with other cholesterol-lowering foods. *Metabolism* (57), 130-139.
- Jeong, S., Nguyen, P., Zhao, B., Ali, M., Choi, J., Min, B., & Woo, M. (2015). Chemical constituents of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. and their PTP1B And α -Glucosidase inhibitory activities. *Phytother. Res.* 10, 1540-1548.
- Jin, S., Son, Y., Min, B., Jung, H., & Choi, J. (2016). Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. *Arch. Pharm. Res.* 5, 823-837.
- Ju, Y., Clausen, L., Allred, K., Almada, A., & Helferich, W. (2004). β -Sitosterol, β -sitosterol glucoside, and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *J. Nutr.* 134, 1145-1151.
- Kang, S., Seo, J., & Lim, J. (2016). Antiviral pentacyclic triterpenoids isolated from *Sanguisorba officinalis* roots against viral hemorrhagic septicemia virus and simultaneous quantification by LC-MS/MS. *Planta Med.* 1, 1013.
- Kathiresan, K., & Bingham, B. L. (2001). Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv. Mar. Bio.*, 81-251.
- Khan, S., Hossain, M., Panthi, S., Asadujjaman, M., & Hossin, A. (2013). Assessment of antioxidant and analgesic activity of *Acrostichum aureum* Linn. (Family- Pteridaceae). *Pharmacologyonline* 1, 166 – 171.
- Koirala, P., Seong, S., Jung, H., & Choi, J. (2017). Comparative molecular docking studies of lupeol and lupenone isolated from *Pueraria lobata* that inhibits BACE1: Probable remedies for Alzheimer's disease. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 10(12), 1117-1122.
- Lebovitz, H. (2020). Alpha-Glucosidase Inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*.

- Li, H., Zhao, X., Wang, J., Dong, Y., Meng, S., & Li, R. (2015). β -sitosterol interacts with pneumolysin to prevent *Streptococcus pneumoniae* infection. *Scientific Reports*, 1-9.
- Liu, H., Wu, Y., Zhu, S., Liang, W., Wang, Z., & Wang, Y. (2015). PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2, 218-225.
- Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G., & Moutsatsou, P. (2010). β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 551-558.
- Loo, A., Jain, K., & Darah, I. (2007). Antioxidant and radical scavenging activities of the pyrolygneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. *Food Chem.* 104, 300-307.
- López, D., Chérigo, L., Sedas, A., Spadafora, C., & Martínez-Luis, S. (2018). Evaluation of antiparasitic, anticancer, antimicrobial and hypoglycemic properties of organic extracts from Panamanian mangrove plants. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 32.
- López, D., Chérigo, L., Spadafora, C., Loza-Mejía, M., & Martínez-Luis, S. (2015). Phytochemical composition, antiparasitic and α -glucosidase inhibition activities from *Pellicierarhizophorae*. *Chem. Cent. J.*, 53.
- Macias-Rubalcava, M., Hernandez-Bautista, B., Jimenez- Estrada, M., Cruz-Ortega, R., & Anaya, A. (2007). Pentacyclic triterpenes with selective bioactivity from *Sebastiania adenophora* leaves, Euphorbiaceae. *J. Chem. Ecol.* (33), 147–156.
- MacNae, W. (1968). A general account of the fauna and flora of mangrove swamps and forests in the Indo-West Pacific region. *Adv. Mar. Bio.*, 73-270.
- Madureira, A., Ascenso, J., Valdeira, L., Duarte, A., Frade, J., Freitas, G., & Ferreira, M. (2003). Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. *Nat. Prod. Res.* 5, 375-380.
- Malini, T., & Vanithakumari, G. (1990). Rat toxicity studies with β -sitosterol. *J. Ethnopharmacol.* 28, 221-234.
- Mandal, R. N., & Bar, R. (2019). *Mangroves for building resilience to climate change a field manual*. Waretown, NJ: Apple Academic Press.
- Mandal, R. N., & Naskar, K. R. (2008). Biodiversity and classification of Indian Mangroves: a review. *Trop. Eco.*, 131–146.
- Marri, E. (2006). Marine natural products: drugs from the deep. *Nature* 443 (7114), 904-905.
- Mayer, A., Glaser, K., Cuevas, C., Jacobs, R., Kem, W., Little, R., . . . Shuster, D. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 31(6), 255-265.

- McConnell, O., Longley, R., & Koehn, F. (1994). *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. Boston, MA, USA: Gullo V.P., editor. Butterworth-Heinemann.
- Meng, L., Huang, C., & Liu, H. (2008). Advances in research on natural triterpenoids with bioactivities. *Guihala* 6, 856-860.
- Moreau, R., Whitaker, B., & Hicks, K. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid. Res.* 41, 457-500.
- Moreno, J. (2001). Antiflammin-2 prevents HL-60 adhesion to endothelial cells and prostanoid production induced by lipopolysaccharides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 884-889.
- Moudi, M., Go, R., Yien, C., & Nazre, M. (2013). Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.* 4, 1231-1235.
- Na, M., Kim, B., Osada, H., & Ahn, J. (2009). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lupeol and lupenone isolated from *Sorbus commixta*. *J. Enzym Inhib. Med. Chme.* (24), 1056-1059.
- Nikiéma, J., Vanhaelen-Fastré, R., Vanhaelen, M., Fontaine, J., De Graef, C., & Heenen, M. (2001). Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. *Phytother. Res.* (15), 131-134.
- Nobel Lecture. (1946). *The Chemical Structure of the Penicillins*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company.
- Ovesna, Z., Vachalkova, A., & Horvathova, K. (2004). Taraxasterol and betasitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma* 51, 407-414.
- Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Molina-Jasso, D., Gallaga, J., Silva-Miranda, A., . . . Chamorro, G. (2005). Genotoxic and cytotoxic studies of beta-sitosterol and pteropodine in mouse. *BioMed Res. Int.* 2005, 242-247.
- Patoc̣ka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. App. Biomed.*, 1.
- Polidoro, B., Carpenter, K., Collins, L., Duke, N., Ellison, A., Ellison, J., & Yong, J. (2010). The Loss of Species: Mangrove Extinction Risk and Geographic Areas of Global Concern. *PLoS ONE*.
- Poompozil, S., & Kumarasamy, D. (2014). Studies on some phytochemical constituents of some selected mangroves. *J. Artif. Intell. Res.* 2, 590-592.
- Prabhakaran, J., & Kavitha, D. (2012). Ethnomedicinal importance of mangrove species of Pitchavaram. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 3, 611-614.

- Ramanathan, T., Hariharan, B., & Ganesan, K. (2008). Antidiabetic activity of a coastal mangrove leaves of *Rhizophora mucronata*. *Plant Arch.* 8(2), 931-933.
- Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., Suganthi, P., & Ramalakshmi, A. (2010). Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. *Int. J. Med. Sci.* 2(3), 94-99.
- Rege, A., Ambaye, R., & Deshmukh, R. (2010). In vitro testing of anti- HIV activity of some medicinal plants. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 1, 193-199.
- Ricklefs, R., & Latham, R. (1993). Global patterns of diversity in mangrove florae. In Species diversity in ecological communities. Historical and geographical perspective. *University of Chicago Press: Chicago*, 215-233.
- Rohini, R., & Das, A. (2009). A comparative evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Rhizophora mucronata* bark extracts. *Pharmacologyonline* 1, 780-791.
- Romero-Estrada, A., Maldonado-Magaña, A., González-Christen, J., Bahena, S., Garduño-Ramírez, M., Rodríguez-López, V., & Alvarez, L. (2016). Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. *BMC Complementary Altern. Med.* 1, 422.
- Roome, T., Dar, A., Naqvi, S., & Choudhary, M. (2011). Evaluation of antinociceptive effect of *Aegiceras corniculatum* stems extracts and its possible mechanism of action in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 135(2), 351-358.
- Rouf, R., Uddin, S., Shilpi, J., & Alamgir, M. (2007). Assessment of antidiarrhoeal activity of the methanol extract of *Xylocarpus granatum* bark in mice model. *J. Ethnopharmacol.* 109, 539.
- Saenger, P. (2002). Mangrove ecology, silviculture and conservation. *Springer-Science +Business media*.
- Saleem, M., Afaq, F., Adhami, V., & Mukhtar, H. (2004). Lupeol modulates NFkappa B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* (23), 5203-5214.
- Saleem, M., Maddodi, N. A., Khan, N., bin Hafeez, B., Asim, M., Suh, Y., . . . Mukhtar, H. (2008). Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. *Clin. Cancer Res.* (14), 2119-2127.
- Saleem, R., Ahmad, S., Ahmed, M., Faizi, Z., Zikr-ur-Rehman, S., & Ali, M. (2003). Hypotensive activity and toxicology of constituents from *Bombax ceiba* stem bark. *Biol. Pharm. Bull.* (26), 41-46.
- Sandqvist, H., & Bengtsson, E. (1931). The empirical formula of sitosterol. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft Abhandlungen* 64, 2167-2171.

- Sarker, S., Latif, Z., & Gray, A. (2005). *Natural products isolation*. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Shanmugapriya, R., Ramanathan, T., & Renugadevi, G. (2012). Phytochemical characterization and antimicrobial efficiency of mangrove plants *Avicennia marina* and *Avicennia officinalis*. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 3, 348–351.
- Siddique, H., Naime, M., & Saleem, M. (2011). Lupeol, a novel androgen receptor inhibitor acts as a double-edged sword: competitive binding as well as transcriptional inhibition. *Endocrinology* 71, 943.
- Sobral, M., Xavier, A., Lima, T., & de Sousa, D. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Sci. World J.*, 9353451.
- Sosa, S., Morelli, C., Tubaro, A., Cairoli, P., Speranza, G., & Manitto, P. (2007). Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. *Phytomedicine* 2, 109-114.
- Spalding, M., Blasco, F., & Fields, C. (1997). *World mangrove atlas*. Okinawa: ISME/ITTO.
- Steenis, C. G. (1962). The distribution of mangrove plant genera and its significance for palaeogeography. *Proc. Kon. Net. Amsterdam Series C*, 164-169.
- Sudhahar, V., Ashok Kumar, S., Varalakshmi, P., & Sujatha, V. (2008). Protective effect of lupeol and lupeol linoleate in hypercholesterolemia associated renal damage. *Mol. Cell Biochem.* (317), 11-20.
- Tapiero, H., Townsend, D., & Tew, K. (2003). Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 57, 321-325.
- Thomas, A., Peter, K., & Chandramohanakumar, N. (2016). A profiling of anti-tumour potential of sterols in the mangrove fern *Acrostichum aureum*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 8, 1828-1832.
- Tomlinson, P. (1986). *The botany of mangroves*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Vadlapudi, V., & Naidu, K. (2009). Evaluation of Antioxidant potential of selected mangrove plants. *J. Pharm. Res.* 2(11), 1742-1745.
- Vannucci, M. (1997). Supporting appropriate mangrove management. *International News Letter of Coastal Management-Intercoast Network: Special edition 1*, 1-3.
- Verdezoto, J. (2013). Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico de *Sapium lateriflorum* (Euphorbiaceae). *Revista Química Central* 3(1), 37-42.
- Vickery, R. (1995). *A Dictionary of Plant-Lore*. Oxford, UK: Oxford University Press.

- Villareal, M., Han, J., Matsuyama, K., Sekii, Y., Smaoui, A., Shigemori, H., & Isoda, H. (2013). Lupenone from *Erica multiflora* leaf extract stimulates melanogenesis in B16 murine melanoma cells through the inhibition of ERK1/2 activation. *Planta Med.* 3 (4), 236-243.
- Vivancos, M., & Moreno, J. (2008). Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br. J. Nutr.* 99, 1199-1207.
- Wang, J., Liu, B., Chen, X., Su, L., Wu, P., Wu, J., & Zhu, Z. (2012). PTP1B expression contributes to gastric cancer progression. *Med. Oncol.* 2, 948-956.
- Watson, J. (1928). Mangrove forests of the Malay Peninsula. *Malay. Forest Rec.* 6, 275.
- Weidner, C., Krempf, M., Bard, J., Cazaubiel, M., & Bell, D. (2008). Cholesterol lowering effect of a soy drink enriched with plant sterols in a French population with moderate hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* (7), 35.
- Wiener, J., Kerns, B., Harvey, E., Conaway, M., Iglehart, J., Berchuck, A., & Bast Jr, R. (1994). Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *JNCI* 5, 372-378.
- Wu, J., Xiao, Q., Xu, J., Li, M., Pan, J., & Yang, M. (2008). Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. *Nat. Prod. Rep.* 25, 955–981.
- Xu, F., Huang, X., Wu, H., & Wang, X. (2018). Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 198-203.
- Yasukawa, K., Yu, S., Yamanouchi, S., Takido, M., Akihisa, T., & Tamura, T. (1995). Some lupane-type triterpenes inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Phytomedicine* 4, 309–313.
- Yonemoto, R., Shimada, M., GunawanPuteri, M., Kato, E., & Kawabata, J. (2014). An α -amylase inhibitory triterpene from *abrus precatorius* leaves. *J. Agric. Food Chem.* 33, 8411-8414.
- Zhang, W., Tao, J., Yang, X., Yang, Z., Zhang, L., & Liu, H. (2014). Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 307-312.
- Zhou, B., Li, J., Liang, X., Pan, X., Hao, Y., & Xie, P. (2020). β -sitosterol ameliorates influenza A virus-induced proinflammatory response and acute lung injury in mice by disrupting the cross-talk between RIG-I and IFN/STAT signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1-9.

Ziegler, H., Staalsø, T., & Jaroszewski, J. (2006). Loading of erythrocyte membrane with pentacyclic triterpenes inhibits *Plasmodium falciparum* invasion. *Planta Med.* (72), 640-642.

8. Anexos

8. Anexos

8.1 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Patrones

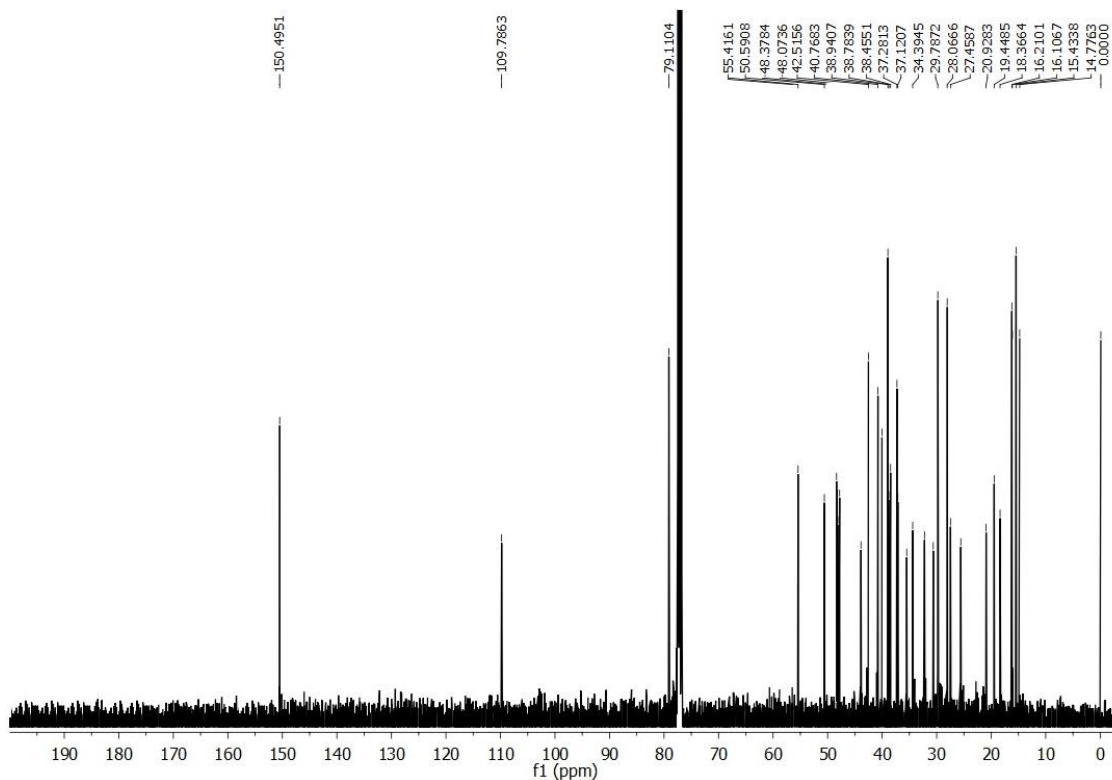


Figura 48. Espectro de ^{13}C -RMN de Lupeol

En el espectro de ^{13}C -RMN de Lupeol (Figura 42) se observa una señal a δ 159,49 ppm característica de un doble enlace carbono-carbono. Otro desplazamiento químico a destacar es el δ 109,79 ppm característico de un carbono olefínico con dos protones geminales. Y por último, la señal a δ 79,11 ppm característico de un carbono con un grupo hidroxilo. Estas señales fueron comparadas con las teóricas (ver Tabla 22) por lo que el compuesto JEL-HX-F18 corresponde con la de lupeol.

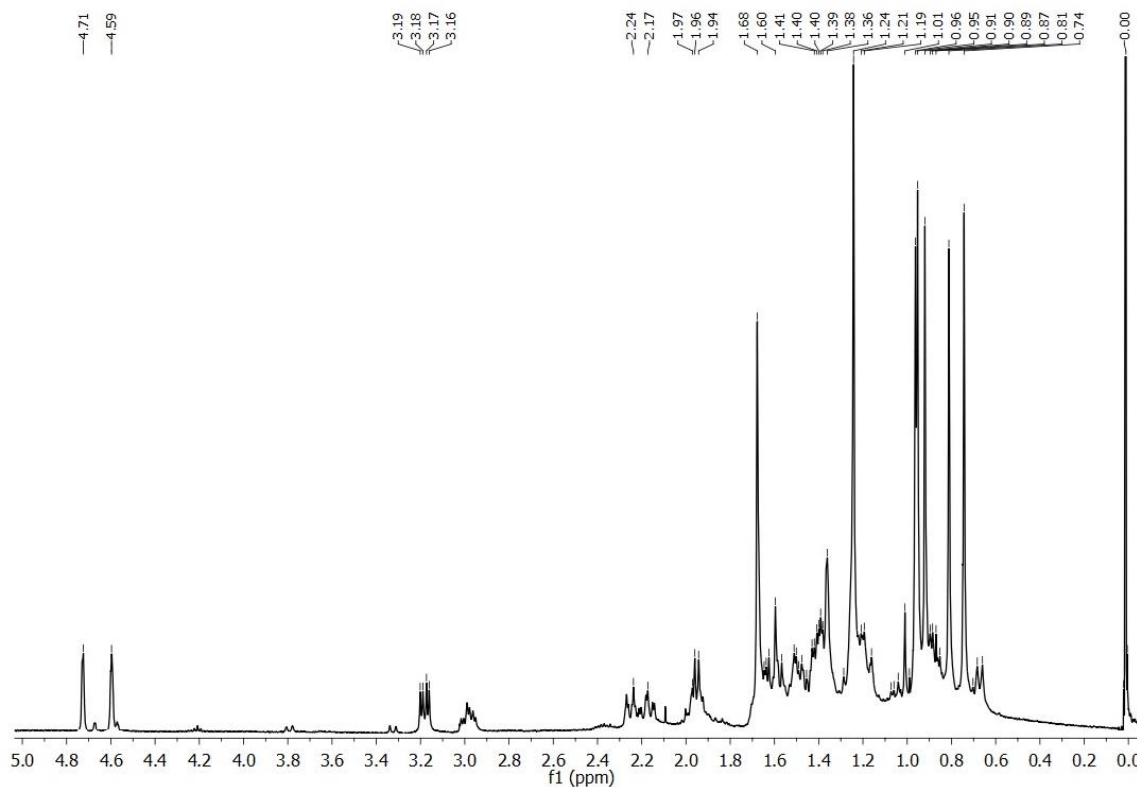


Figura 49. Espectro de ^1H -RMN de Lupeol

En el espectro de ^1H -RMN de Lupeol (Figura 43) se observa señales singuletes a δ 1,68, 1,24, 0,96, 0,95, 0,81 y 0,74 ppm que corresponde a grupos metilos. Además de una señal doblete de doblete a δ 3,20 ppm que corresponde a los H 3- α del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno de los triterpenos unidos a un metino hidroxilado. También, se destaca dos protones olefínico gemínales con desplazamiento químico de δ 4,72 y 4,60 ppm característico del lupeol. Estas señales fueron comparadas con las teóricas (ver Tabla 22) por lo que el compuesto JEL-HX-F18 corresponde con la del lupeol.

Tabla 22. Desplazamientos Químicos del Espectro de RMN de Lupeol				
No.	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Literatura*	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Obtenidos	$\delta^1\text{H}$ (ppm) Literatura*	$\delta^1\text{H}$ (ppm) Obtenidos
1	38,86	38,78		
2	27,59	27,52		
3	79,14	79,11	H 3- α 3,19 dd	H 3- α 3,20
4	39,01	38,94		
5	55,45	55,41		
6	18,47	18,36		
7	34,43	34,39		
8	40,98	40,76		
9	50,59	50,59		
10	37,32	37,28		
11	21,08	20,92		
12	25,29	25,57		
13	38,20	38,45		
14	42,98	42,51		
15	27,57	27,45		
16	35,73	35,66		
17	43,15	43,09		
18	48,13	48,07		

19	48,45	48,37		
20	151,11	150,49		
21	30,00	29,78		
22	40,15	40,09		
23	28,14	28,06	0,97 s	0,96
24	15,52	15,43	0,76 s	0,74
25	16,27	16,21	0,83 s	0,92
26	16,13	16,10	1,03 s	1,24
27	14,70	14,77	0,94 s	0,95
28	18,15	18,09	0,79 s	0,81
29	109,48	109,78	H-29a 4,57	H-29a 4,60
			H-29b 4,69	H-29b 4,72
30	19,46	19,44	1,68 s	1,68

¹H-RMN: Datos registrados a 400 MHz en CDCl₃, ¹³C-RMN: Datos registrados a 100 MHz en CDCl₃

Referencia= *: (Verdezoto, 2013)

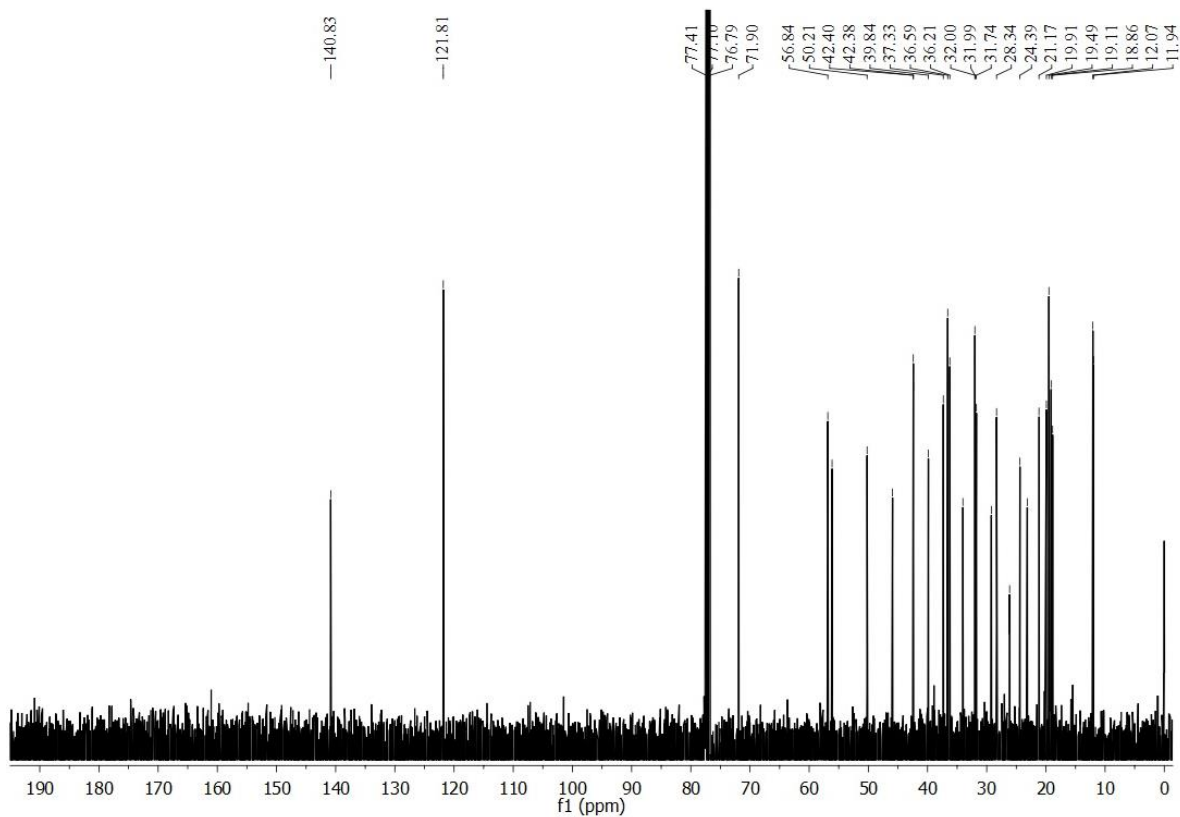


Figura 50. Espectro de ^{13}C -RMN de β -Sitosterol

En el espectro de ^{13}C -RMN de β -Sitosterol (Figura 44) destacan las señales δ 140,83 y 121,81 ppm las cuales corresponde a los carbonos olefínicos. También, un desplazamiento químico a δ 71,90 ppm característica de carbonos con un grupo hidroxilo. Estas señales fueron comparadas con las teóricas (ver Tabla 23) por lo que el compuesto JEL-HX-F14 corresponde con la de β -sitosterol.

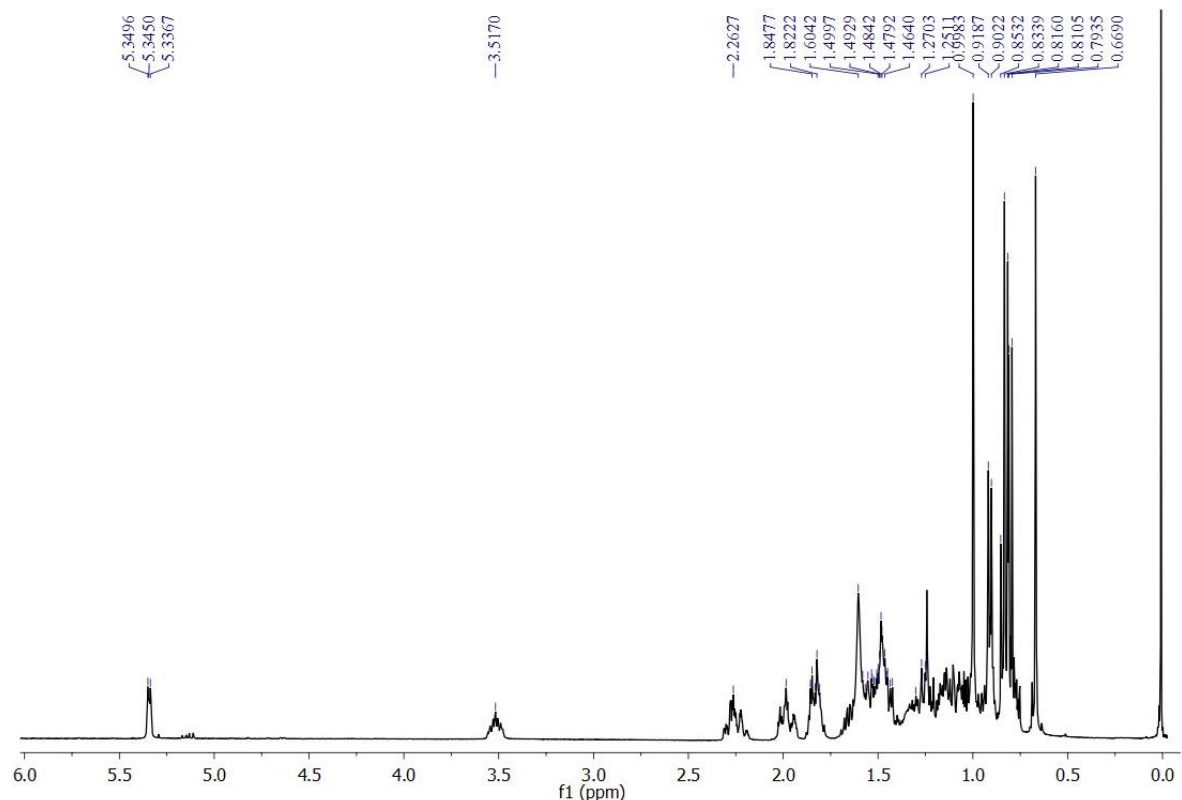


Figura 51. Espectro de ^1H -RMN de β -Sitosterol

En el espectro de ^1H -RMN de β -Sitosterol (Figura 45) destacan las señales de dos singuletes con desplazamiento químico δ 0,99 y 0,66 ppm las cuales corresponde a los protones de H-18 y H-19 característico de un fitoesterol. También, un doblete con desplazamiento químico de δ 0,91 ppm con una constante de acoplamiento $J= 6,6$ Hz característica de los protones de un grupo metilo del H-21. Por último, un doblete con un desplazamiento químico de δ 5,34 ppm con una constante de acoplamiento $J= 5,3$ Hz característico de un protón olefínico para el H-6 y un múltipleto con un desplazamiento químico de δ 3,51 ppm correspondiente al H-3. Estas señales fueron comparadas con las teóricas (ver Tabla 23) por lo que el compuesto JEL-HX-F14 corresponde con la de β -sitosterol.

Tabla 23. Desplazamientos Químicos del Espectro de RMN de β -Sitosterol		
No.	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Literatura*	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Obtenidos
1	37,41	37,33
2	29,85	31,74
3	71,98	71,90
4	39,93	39,84
5	140,92	140,83
6	121,88	121,81
7	32,07	32,00
8	31,82	31,99
9	50,29	50,21
10	36,30	36,21
11	21,24	21,17
12	40,65	39,85
13	42,46	42,40
14	56,93	56,84
15	24,46	24,39
16	28,40	28,34
17	56,21	56,13
18	12,01	12,07
19	19,19	19,11
20	36,66	36,59
21	18,93	18,86

22	34,11	34,00
23	26,24	26,00
24	46,00	45,90
25	29,31	29,00
26	19,97	19,91
27	19,55	19,49
28	23,22	23,00
29	12,14	11,94

¹H-RMN: Datos registrados a 400 MHz en CDCl₃, ¹³C-RMN: Datos registrados a 100 MHz en CDCl₃

Referencia= *: (Verdezoto, 2013)