

Características descriptivas de la raíz de wereke (*Ibervillea sonora* Greene) y generalidades bioquímicas de su extracto acuoso

Wereke root (*Ibervillea sonora* Greene) descriptive characteristics and biochemical generalities of its aqueous extract

Sinagawa-García SR¹, A Gutiérrez-Díez¹, A Mora-Olivo², MC Juárez-Aragón², JA Torres-Castillo²

Resumen. En el presente trabajo se determinó la descripción general de un extracto acuoso obtenido de la raíz de *Ibervillea sonora*; además, se incluyó una descripción histológica de la misma raíz. Un análisis bromatológico general efectuado indicó que la raíz posee valores nutrimentales similares a los reportados para raíces tuberosas comestibles incluyendo al camote, yuca, jícama y arracacha. Por primera vez en la raíz de wereke se reportó la presencia de una proteasa activa a pH alcalino y la actividad inhibitoria de tripsina. A esta raíz se le han atribuido numerosas propiedades medicinales y bioactivas. No obstante, se requieren estudios más profundos para determinar las moléculas responsables y sus mecanismos de acción. Este trabajo contribuyó al conocimiento de algunos aspectos bioquímicos de la raíz de wereke.

Palabras clave: Raíz tuberosa; Proteínas; Proteasa; Inhibidor de tripsina.

Abstract. A general biochemical description of an aqueous extract obtained from *Ibervillea sonora* root was reported; furthermore, a histological description for the root is included. A bromatological analysis was carried out, and it indicated that the study nutritional variables were similar to those reported in other edible tuberous roots including sweet potatoe, mandioca, bean yam and arracacha. For the first time, the presence of an active proteinase at alkaline pH and the inhibitory activity of trypsin were reported for this root. Several medical and bioactive properties have been attributed to the wereke root. Nevertheless, deeper studies are needed to determinate the importance of molecules and their action mechanisms. This work contributed to the knowledge of some biochemical aspects of the wereke root.

Keywords: Tuberous root; Proteins; Proteinase; Trypsin inhibitor.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Francisco Villa S/N, Col. Ex-Hacienda El Canadá. CP. 66050. General Escobedo, Nuevo León. México.

² Universidad Autónoma de Tamaulipas. Instituto de Ecología Aplicada. División del Golfo No. 356. Colonia Libertad. CP. 87019. Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

Address Correspondence to: Jorge Ariel Torres-Castillo, e-mail: jorgearieltorres@hotmail.com

Recibido / Received 1.III.2014. Aceptado / Accepted 31.VIII.2014.

INTRODUCCIÓN

La familia Cucurbitaceae incluye 95 géneros que abarcan de 950 a 980 especies (Kocyan et al., 2007; Schaefer y Renner, 2011). Esta familia botánica tiene relevancia económica a nivel mundial ya que muchas de sus especies domesticadas forman parte de la dieta humana. En México se cultivan alrededor de 13 miembros de la familia Cucurbitaceae, las cuales sirven en su mayoría como alimento para los humanos; entre estas figuran las calabazas, el chilacayote, el chayote y el pepino del monte como especies nativas mientras que el pepino, melón y sandía figuran entre las especies introducidas. Además de su utilización como alimento, algunas de las especies de esta familia poseen usos en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones (Lira et al., 1998). Entre las cucurbitáceas más estudiadas y sus efectos figuran *Trichosanthes tricuspidata*, de la cual se han caracterizado 14 glucósidos de cucurbitano, un glucósido de hexanocucurbitano y un octanocucurbitano, los que se han asociado con las propiedades atribuidas a los frutos de esta planta (Kanchanapoom et al., 2002). En el caso de la diabetes mellitus, hay reportes que muestran la efectividad de algunas cucurbitáceas para tratar el padecimiento; entre ellas se pueden mencionar a *Mormordica dioica*, *M. foetida* y *M. charantia* (Fernandopulle et al., 1994; Raman y Lau, 1996). Estas especies muestran efectos notorios al provocar una reducción de los niveles de glucosa sanguínea cuando se emplearon para tratar ratas. Entre las cucurbitáceas con usos medicinales tradicionales, y que recientemente se ha empezado a estudiar con mayor detalle, se destaca el wereke, wareque o güereque (*Ibervillea sonora* Greene). Esta especie es conocida por sus propiedades medicinales, asociadas primordialmente a la disminución en los niveles de glucosa sanguínea en pacientes diabéticos. Aunque dichas propiedades se conocen desde hace tiempo, los principios bioquímicos no son claros (Alarcón-Aguilar et al., 2005). La parte vegetativa de mayor importancia de *Ibervillea sonora* es la raíz de aspecto tuberculoso, que usualmente es la parte más característica y la que se comercializa. El wereke es una planta generalmente distribuida en la zona árida del norte de México (Hernández et al., 2007). Los usos etnobotánicos de esta planta incluyen el tratamiento de padecimientos dérmicos, artritis, reumatismos y afecciones cardiacas (Hernández, 2007); recientemente se ha asociado al wereke con potencial anticancerígeno, debido a que presentó efecto citotóxico en líneas celulares cancerígenas T47D (Vega-Avila, 2009). Dentro de la composición química reportada para esta planta cabe mencionar a los alcoholes, cetonas, alcanos y amidas, al ácido palmítico y al palmitato de metilo los cuales se asocian con actividades hipoglucemiantes (Morales y Siles, 2013). Los polifenoles también se podrían asociar con las diversas propiedades del wereke, los que se acumulan en diversas cantidades en diferentes partes de la planta (Estrada-Zúñiga et al., 2012). Efectos hipoglucemiantes se han reportado cuando un extracto fue incorporado

en la dieta de ratones, lo que promovió una disminución en la toma de alimentos con una subsiguiente disminución del peso corporal, y una disminución en los niveles de obesidad en ratones tratados con dietas preparadas (Rivera-Ramírez et al., 2011). Sin embargo, aún resta hacer estudios sobre la posible toxicidad que el extracto de wereke pudiera tener. Al wereke también se le atribuyen propiedades antibióticas, antifúngicas y antivirales (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). No obstante, falta determinar qué tipos de compuestos se encuentran presentes en la planta, y cuales presentan efectos biológicos. En este trabajo se analizaron muestras de la raíz de wereke para realizar una descripción general de su morfología y anatomía, como auxiliar en la identificación correcta de esta especie y contribuir a diferenciarla de otras raíces semejantes con propiedades diferentes. Se determinó la constitución bromatológica general para conocer el potencial alimenticio, y se analizaron algunas características del extracto acuoso desde que se ha informado que ésta es la forma más empleada en los usos tradicionales. Varios reportes han demostrado diversos efectos biológicos con dicho sistema de extracción (Alarcón et al., 2005; Morales y Siles, 2013). Debido a esto, se determinó la presencia de componentes bioquímicos con potencial biotecnológico extraídos en fase acuosa. Estos componentes incluyeron un patrón de proteínas hidrosolubles, entre ellas glicoproteínas; algunas enzimas e inhibidores de proteasas. También se realizaron pruebas inhibitorias contra tres especies de hongos fitopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras y preparación del extracto.

Treinta muestras de raíz de wereke fueron obtenidas del mercado local de diferentes proveedores. Las raíces fueron observadas y se realizó una descripción de sus características físicas generales (tamaño, color, textura, olor). Las características macroscópicas de la raíz se hicieron directamente de los ejemplares; se incluyó además una tinción rápida y superficial de algunos fragmentos con safranina para observar la distribución del sistema vascular. Con este objetivo, se les aplicó safranina al 0,1% por 30 s a las secciones, seguido de un enjuague con agua corriente y un lavado con etanol al 70% por 1 min. Para realizar la identificación correcta, las raíces lavadas se dejaron reposar en peat-moss húmedo por tres semanas. Esto permitió que algunos tallos remanentes se desarrollaran, lo que condujo a una identificación correcta de las especies, y a garantizar la homogeneidad de las muestras. Debido a que los principales usos de la raíz se realizan en fases acuosas, se decidió trabajar con el extracto acuoso. Por lo tanto, las muestras de wereke fueron licuadas en agua destilada en proporción 1:2 (p/v). La mezcla resultante se dejó reposar 15 min a 4 °C, y después fue centrifugada a 10000 x g a 4 °C por 5 min. La pastilla fue descartada y el sobrenadante se sometió a un proceso de clarificado, con una centrifugación a 13000 x g a 4 °C por 5 min.

El sobrenadante clarificado fue utilizado para la detección de fitoquímicos y del efecto antifúngico. Parte del sobrenadante fue precipitado empleando acetona fría en proporción 1:3 (v/v). La mezcla se dejó reposar por 10 min a 4 °C y luego fue centrifugada a 13000 x g. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue empleado como fuente de proteínas para el análisis mediante electroforesis, y la inhibición de enzimas proteolíticas (Aguirrezabala-Cámpano, et al., 2013).

Análisis histológico. Las muestras de wereke se fijaron en una solución de formaldehído, etanol y ácido acético en agua destilada (5:25:10:60 v/v) durante 48 h. Después, las muestras fueron enjuagadas con agua destilada durante 2 h. Las secciones de los órganos fijados fueron hechas manualmente con navajas de afeitar. Las secciones adecuadas fueron seleccionadas y sometidas a una deshidratación secuencial en etanol del 30 al 70% y teñidas con una solución de 0,1% de Safranina O durante 4 h a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas dos veces con etanol al 70 % por 15 min para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, los cortes fueron sometidos a deshidratación hasta el etanol absoluto por 10 min en los alcoholes al 30, 50, 70, 90 y 100% y luego teñidos mediante inmersión en una solución de 0,05% de Fast Green por 1 min. El exceso de colorante fue eliminado con un lavado continuo de etanol al 95% durante 5 min, y luego los cortes teñidos se deshidrataron durante 15 min. Seguidamente se efectuó una inmersión secuencial en mezclas de etanol-xileno que gradualmente incrementaron la concentración de xileno hasta alcanzar el 100% (en proporciones 90:10, 70:30, 50:50, 30:70 y xileno puro). Finalmente, las preparaciones fueron montadas usando bálsamo de Canadá (Torres-Castillo et al., 2013).

Análisis bromatológico de la raíz del wereke. La determinación de los porcentajes de humedad, cenizas, proteínas totales, grasa y fibra cruda fue realizada a través de un servicio del Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

La determinación de humedad fue realizada de acuerdo al protocolo reportado por la AOAC 950.46B, el cual se basó en el método de secado al horno. Se colocaron 2 g de muestra en la estufa de secado a 100-102 °C por 16-18 h. La muestra fue luego enfriada en un desecador. La pérdida de peso de la muestra se utilizó para calcular el contenido de humedad de la misma.

La determinación de cenizas fue realizada en base al protocolo reportado por la AOAC 938.08, el cual se basó en el análisis de residuos inorgánicos después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica. Se tomaron 2 g de muestra que fueron previamente secados, y después colocados en una mufla a 550 °C por 2-3 h. El porcentaje (%) de ceniza fue calculado con el peso del residuo inorgánico remanente.

La cantidad de proteína presente en la harina fue determinada de acuerdo al método reportado por la AOAC 928.08, el cual se basó en la determinación del nitrógeno total por Kjeldahl. Se utilizaron 2 g de muestra que fueron digeridos con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. La muestra digerida fue neutralizada con NaOH concentrado de tal forma que el amonio formado fue colectado, y posteriormente se cuantificó el nitrógeno presente en la muestra a través de una titulación. Para el cálculo del porcentaje de proteína en la muestra se utilizaron factores de conversión de nitrógeno a proteína.

Los contenidos de grasa en la harina de Wereke fueron obtenidos de acuerdo al método reportado por la Norma Oficial Mexicana NMX-F-615 (NOM, 2004). El extracto etéreo fue realizado utilizando 2 g de muestra, la cual fue colocada en un extractor Soxhlet y la grasa fue extraída durante 4 a 6 h. El porcentaje (%) de grasa fue calculado como la diferencia en peso del recipiente que contiene la grasa extraída con éter de petróleo menos el peso del matraz sin grasa a peso constante.

Finalmente, el contenido de fibra cruda presente en la harina de wereke fue calculada en base al método de la AOAC 962.09. El porcentaje (%) de fibra cruda se calculó como la pérdida sobre la ignición de residuo seco que permanece después de la digestión de 2 g de muestra con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio bajo condiciones específicas. La diferencia de pesos después de la calcinación indicó la cantidad de fibra presente.

Detección de fitoquímicos. El análisis fitoquímico de la raíz se realizó por triplicado. El resultado se tomó de manera cualitativa como presencia o ausencia, relacionada a los cambios de color y turbidez en la mezcla de reacción (Torres-Castillo et al., 2013).

Detección de polifenoles mediante $KMnO_4$. Una alícuota de 50 μ L de extracto fue diluida con 50 μ L de agua y colocada en un pozo de placa de ELISA, seguida de la adición de 30 μ L de $KMnO_4$ registrando la coloración obtenida. Tonalidades verdosas a amarillas indicaron la presencia de polifenoles. La reacción se realizó por triplicado para cada fracción de cada solvente.

Detección de compuestos fenólicos mediante cloruro férrico. Un volumen de 50 μ L de extracto fue diluido con 50 μ L de agua y colocado en un pozo de placa de ELISA. Luego se depositaron 20 μ L de cloruro férrico al 1% y se observó la coloración. Tonalidades azules a negras indicaron la presencia de polifenoles. La reacción se realizó por triplicado para cada fracción de cada solvente.

Detección de taninos mediante precipitación de gelatina. Alícuotas de 50 μ L de extracto fueron mezcladas con 150 μ L de NaCl al 10% como control incubándose a temperatura

ambiente por 10 min. Otros 50 μL de extracto se mezclaron con 150 μL de gelatina de piel porcina al 1% en 10% de NaCl, y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se mezclaron 50 μL de extracto con 150 μL de gelatina de piel porcina al 1% y se incubó la mezcla por 10 min a temperatura ambiente. La reacción se consideró positiva cuando hubo precipitado blanquecino en las mezclas con gelatina, pero no en la de NaCl solo.

Detección de alcaloides. Alícuotas de 250 μL de extracto se mezclaron con 250 μL de HCl al 10% y se calentaron a 90 °C por 10 min en tubos de 1,5 mL cerrados. Después de enfriar se tomaron 100 μL del extracto y se hicieron reaccionar con 10 μL de la solución de Wagner. Precipitados color marrón se consideraron como resultado positivo.

Electroforesis y Zimografía. La electroforesis SDS-PAGE fue realizada de acuerdo a Laemmli (1970) usando geles de poliacrilamida al 10%. Las condiciones de electroforesis fueron 80 V por 20 min seguidos de 120 V por 40 min. Para el caso de las tinciones, los geles se fijaron en solución de etanol, ácido acético y agua (proporción 40:10:50, respectivamente), y luego se tiñeron con azul de Coomassie al 0,1% o con tinción para glicoproteínas, la cual se realizó siguiendo el protocolo de Packer et al. (2002).

Para la detección de proteinasas mediante zimogramas, los geles se prepararon con gelatina de piel porcina al 0,2%, copolimerizada con poliacrilamida y usando las mismas condiciones de electroforesis (Mochizuki, 1998). Después de la electroforesis los geles fueron enjuagados con agua destilada para remover el exceso de SDS seguidos de una incubación por 1 a 2 h a 37 °C a pH 5 (48,5 mL de 0,1 M de ácido cítrico con 51,50 mL de 0,2 M Na_2HPO_4), pH 6 (36,85 mL de 0,1 M ácido cítrico con 63,15 mL de 0,2 M Na_2HPO_4), pH 7 (17,65 mL de 0,1 M de ácido cítrico con 82,35 mL de 0,2 M Na_2HPO_4) y pH 8 (0,25 M Tris-HCl). Después de la incubación, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie; las bandas claras sobre fondo oscuro indicaron bandas con actividad de proteinasa (Mochizuki, 1998). Para la detección de amilasas se emplearon geles de poliacrilamida con almidón de maíz (Sigma-Aldrich) copolimerizado con poliacrilamida (solución de 4 mg/mL). Después de la electroforesis los geles fueron enjuagados con agua destilada, y luego incubados en 100 mL de buffer 0,25 M de Tris-HCl pH 7,0. Después de la incubación, los geles se tiñeron con solución de yodo lugol e inmediatamente se observaron. Las bandas claras sobre fondo café oscuro indicó la presencia de amilasas (Torres-Castillo et al., 2013).

Detección de inhibidores de proteinasas. Para detectar actividad inhibitoria de enzimas proteolíticas se empleó un protocolo basado en la hidrólisis de sustratos sintéticos con p-nitroanilida (Erlanger et al., 1961). El blanco de reacción se preparó usando

450 μL de buffer 0,01 M Tris-HCl pH 8 y 50 μL de sustrato sintético para enzimas tipo (1) tripsina N-benzoil-DL-Arginina-p-nitroanilida (abreviado como BApNa) (Sigma-Aldrich); (2) quimotripsina Ala-Ala-Phe-p-nitroanilida (abreviado como AAPpNA) (Sigma-Aldrich), y (3) elastasa N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida (abreviado como N-SAAA pNA) (Sigma-Aldrich). La reacción control de enzima fue estructurada con 425 μL de buffer y 25 μL de enzima (tripsina, quimotripsina o elastasa), incubándose por 15 min a 37 °C, registrando posteriormente la absorbancia a 405 nm. La reacción de inhibición se preparó basada en la reacción control, ajustando el volumen de buffer de acuerdo a la cantidad de muestra de inhibidor (volumen de 10 a 50 μL). Esta se mezcló con 25 μL de enzima que se incubó a 37 °C durante 5 min. Seguidamente, se efectuó una incubación con 50 μL de sustrato por 15 min, para el registro posterior de la absorbancia a 405 nm (Aguirrezabala-Cámpano et al., 2013). Una unidad de inhibición (UI) fue definida como la disminución de absorbancia en 0,01 por volumen de inhibidor usado, y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$UI = \left[\frac{UA - (UA + I)}{0,01 * V_I} \right] / [P_I]$$

Donde UA= Unidades de Absorbancia de la Enzima, $UAE+I= UAE$ en presencia del inhibidor, $V_I=$ Volumen de muestra de inhibidor en mL, y $P_I=$ la concentración de proteína en mg/mL

Actividad antifúngica. Las fracciones acuosas fueron esterilizadas con filtros Millipore con poro de 0,22 μm (MA, USA). En cajas Petri con medio PDA, se depositaron 120 μL de cada fracción y con una varilla de vidrio se dispersó en toda la caja para que se absorbiera. La caja se inoculó inmediatamente en el centro con un explante de 3 mm de micelio de cada uno de los hongos fitopatógenos a evaluar (*Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Alternaria sp.*). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (30 °C) y se registró el crecimiento radial de micelio cada 24 h hasta alcanzar 72 h. Los controles fueron las medidas del crecimiento micelial en medio PDA al cual se le agregó agua. El experimento se realizó por triplicado.

RESULTADOS

Las raíces analizadas en el presente estudio presentaron formas irregulares, hinchadas, desde globosas hasta con forma de botella o guaje, con textura áspera y agrietada, de color grisáceo a café claro. La mayor parte de la raíz tuvo un aspecto seco agrietado a excepción de la zona de la corona donde se presentan brotes en una zona restringida, que se desarrollaron en tallos volubles (Fig. 1). Presentaron una consistencia firme y fibrosa, más difícil de cortar que una papa o una jícama; el interior presentó un color amarillento pálido uniforme (Fig. 2

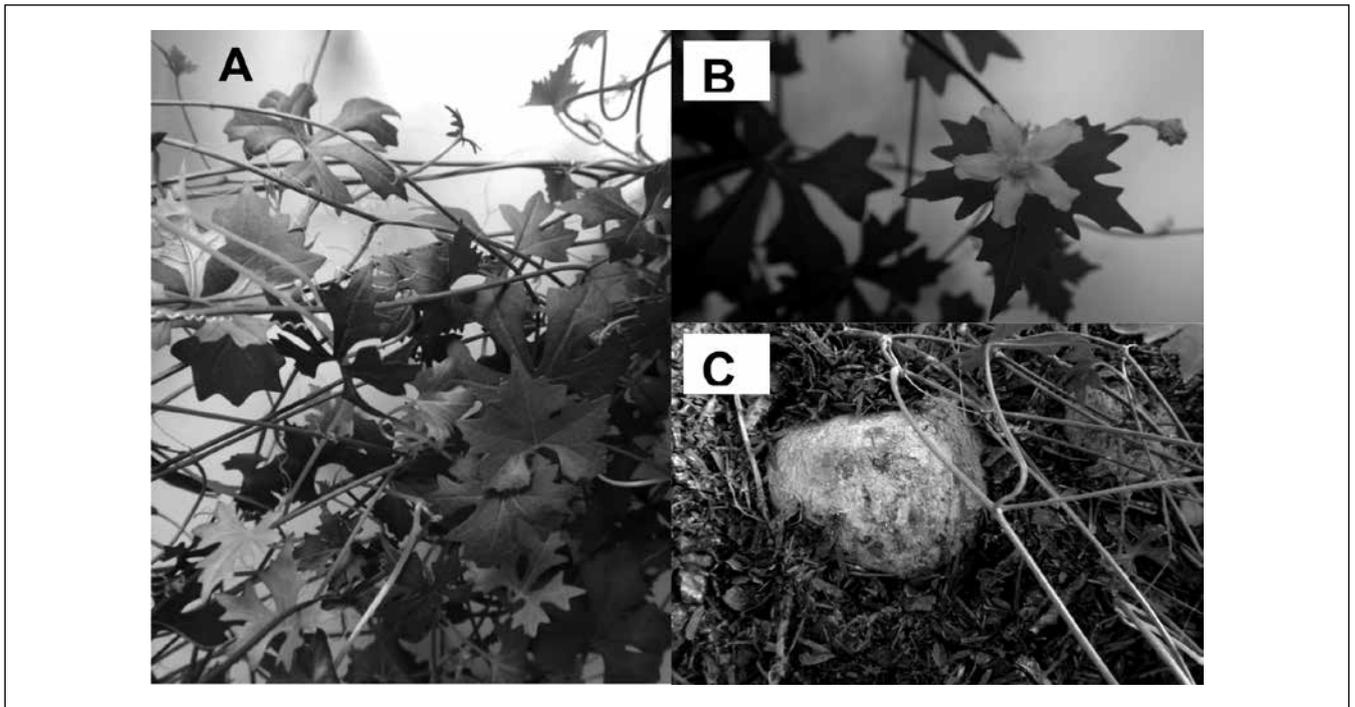


Fig. 1. Planta de wereke. (A) Hojas típicas de *Ibervillea sonora*, y su crecimiento típico como enredadera. (B) Acercamiento de una flor masculina. (C) Raíz tuberosa de wereke, parcialmente emergida del sustrato.

Fig. 1. Wereke plant. (A) typical leaves of *Ibervillea sonora*, and its typical growth as a vine. (B) Close view of a masculine flower. (C) Tuberous root of wereke, partially emerged from the substrate.

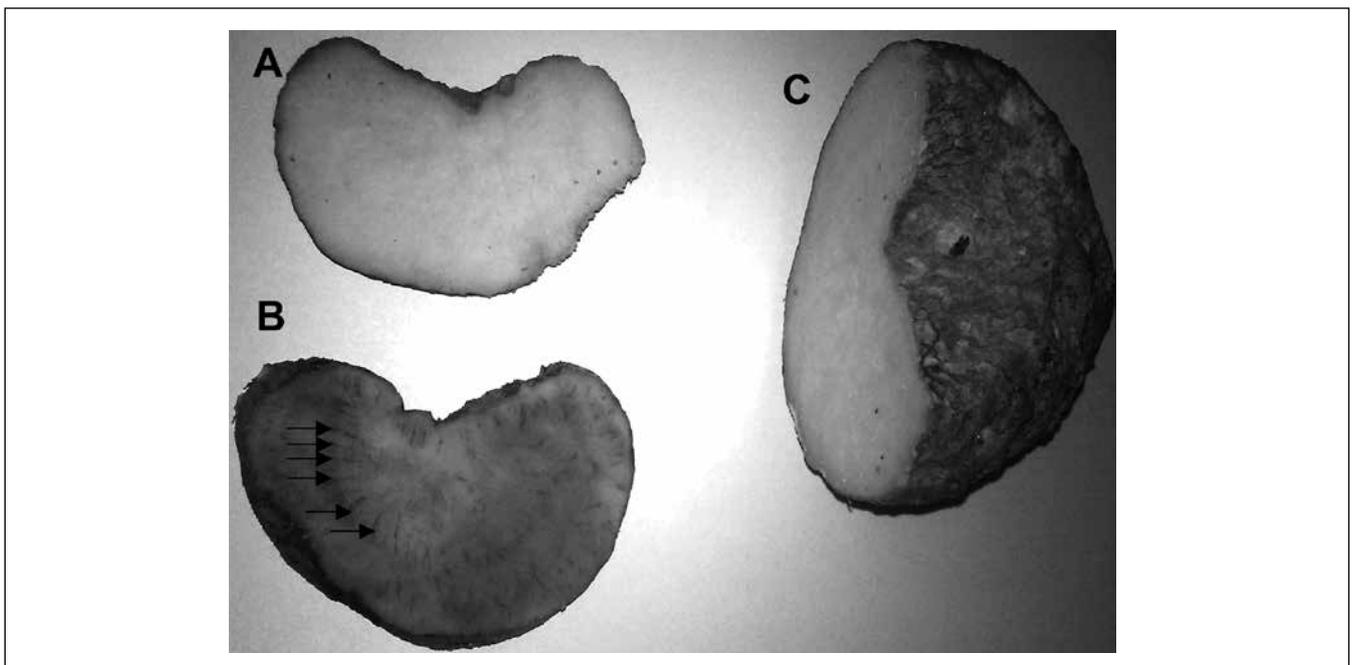


Fig. 2. Wereke en sección transversal. (A) Sección transversal donde se muestra la peridermis y el interior parenquimatoso de una tonalidad clara. (B) Fragmento de wereke teñido para resaltar las áreas de sistema vascular, la cual se aprecia en las zonas señaladas por flechas. (C) Raíz de wereke mostrando el aspecto rugoso y agrietado de la peridermis y el interior parenquimatoso.

Fig. 2. Transverse section of wereke. (A) Transverse section where the periderm and the clear tone-parenchyma are shown. (B) Stained section of wereke to highlight the vascular system indicated by arrows. (C) wereke root showing the rugose epidermal surface and the clear parenchyma.

A). La presencia del sistema vascular fue revelada con la tinción rápida con safranina, mostrando que todo el órgano estuvo inervado (Fig. 2 B). En la parte más externa se encontró una peridermis áspera que dio un aspecto rocoso (Fig. 2 C).

En el caso del análisis histológico del órgano, como auxiliar para su identificación, se encontró una disposición de tejidos característica en órganos de reserva subterráneos. De la parte más externa a la interna, se pudo encontrar inicialmente una peridermis continua, cuya parte externa presentó una textura áspera y hacia el interior formada por hasta 15 capas de células con lúmenes de tonalidad marrón y paredes celulares delgadas sinuosas, algunas veces colapsados (Fig. 3 A). Inmediatamente bajo la peridermis se encontró abundante parénquima, lo que constituyó el volumen mayor del interior del órgano; a pesar de tratarse de un mismo tipo de tejido, se pudieron apreciar

diferencias en el tipo de células presentes. El parénquima que está inmediatamente adyacente a la zona periférica y con ubicación más externa estuvo constituido primordialmente por células con lúmenes amplios y claros, sin contenido ni estructuras coloreadas (Fig. 3 B). El parénquima más interno, usualmente más compacto, estuvo normalmente inervado por escasas divergencias del sistema vascular y presentó células de lúmenes amplios con granulaciones en el citoplasma, al parecer de almidón o alguna sustancia de reserva (Fig. 3 C). El sistema vascular, presentó un arreglo típico al de una raíz dicotiledónea con crecimiento secundario, con una distribución irregular, con zonas de tejido vascular rodeado por áreas de parénquima. Los radios vasculares se encontraron tan atravesados por parénquima en algunas zonas, que dieron la apariencia de estar dispersos (Fig. 3D), que se distribuyen en el

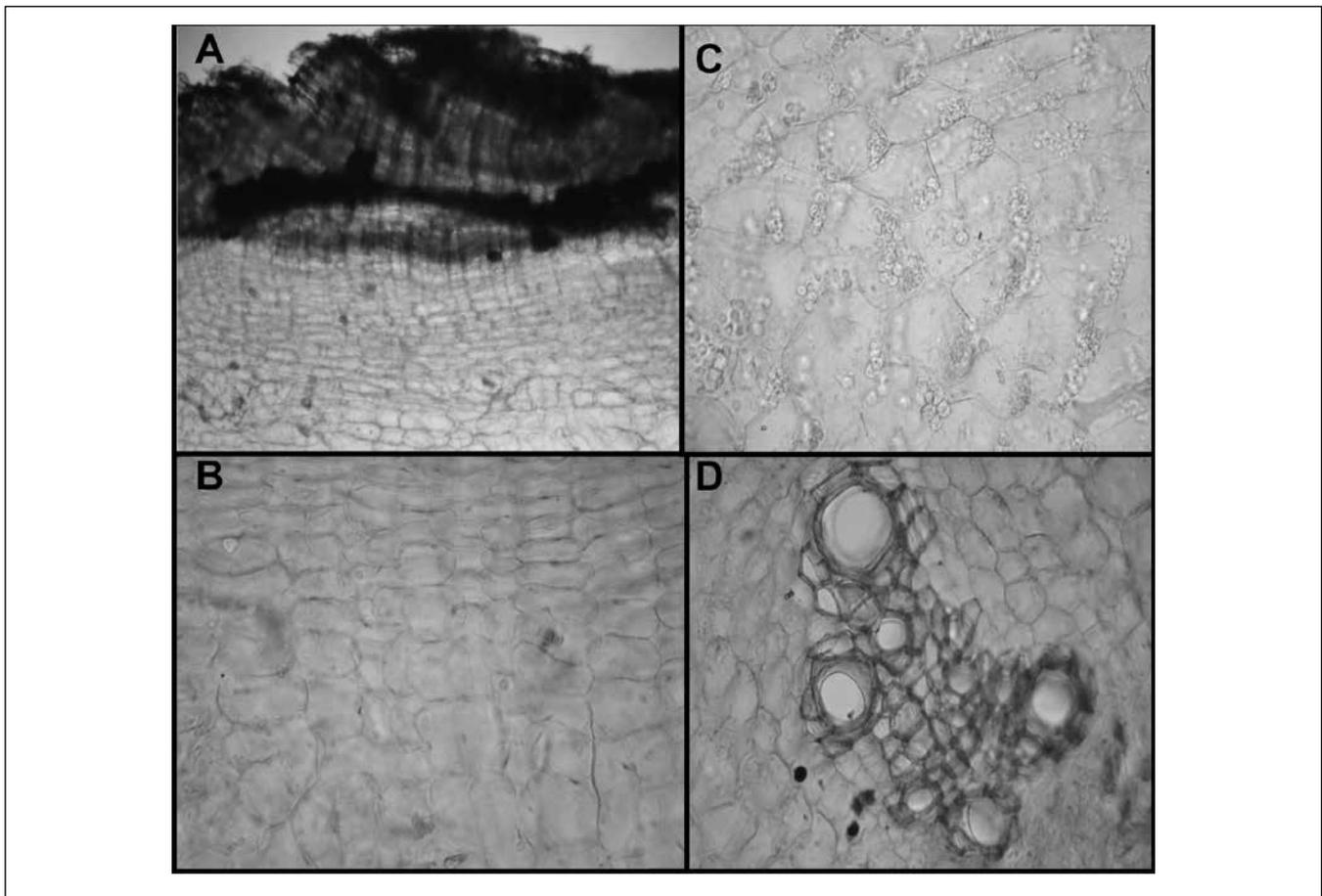


Fig. 3. Arreglo histológico de la raíz de *Ibervillea sonora*. (A) Peridermis con contenidos oscuros en la parte más externa del corte, seguido de parénquima con células de forma prismática regular. (B) acercamiento del parénquima más externo de la raíz; se alcanzan a distinguir los lúmenes amplios y sin contenido especial aparente. (C) Acercamiento del parénquima más interno, donde se aprecian gránulos refringentes, de composición desconocida. (D) Acercamiento de una región vascular típica de la raíz de wereke, inmersa en una matriz de naturaleza parenquimatosa.

Fig. 3. Histological pattern of a root of *Ibervillea sonora*. (A) Periderm with darkened content in the outer part, followed by parenchyma with regular prismatic shaped cells. (B) Close view of the outermost root parenchyma; wide and clear cellular lumen can be distinguished. (C) Close view of more innermost root parenchyma, where refringent granules of unknown composition can be distinguished. (D) Close view of a typical vascular region of the wereke root, it is immersed in a parenchymatous space.

órgano. En las zonas periféricas, dichos radios fueron menos evidentes, mientras que en regiones más internas se pudieron apreciar numerosas ramificaciones un poco más densas.

La composición porcentual de humedad, cenizas, proteína, grasa y fibra dietética de la raíz del wereke se muestran en la Tabla 1. En el análisis para la detección de fitoquímicos solamente se pudo detectar la presencia de compuestos fenólicos reactivos con KMnO_4 , más no para las reacciones de detección de fenólicos con FeCl_3 , saponinas, taninos y alcaloides.

Tabla 1. Valores del análisis bromatológico de la raíz de wereke.

Table 1. Bromatological analysis of the wereke root.

Componente	%
Humedad	80,03
Ceniza	2,44
Proteína total	2,10
Grasa	0,54
Fibra dietética	2,65

La fase acuosa se concentró y fue sometida a electroforesis para visualizar el perfil proteico. Como parte de las proteínas hidrosolubles se encontró un patrón en el que resalta la presencia de dos bandas muy abundantes con pesos moleculares de 48 y 46 kDa, además de otras bandas menos abundantes de 124, 36, 34, 26 y 8 kDa, respectivamente (Fig. 3). También se pudo observar la presencia de bandas más tenues entre cada una de las bandas principales; sin embargo, debido a su poca nitidez no se les reconoce. Debido a que usualmente los órganos de reserva presentan péptidos y proteínas con diversas actividades bioquímicas, se consideró la posibilidad de encontrar hemaglutininas y lectinas dentro del arsenal bioquímico. Por este motivo, se realizó la tinción para la detección de glicoproteínas, aunque el resultado fue negativo (datos no mostrados). La posible presencia de amilasas se analizó mediante los ensayos de zimografía; no obstante, el resultado fue negativo al menos para las condiciones de ensayo empleadas (datos no mostrados). El escrutinio de proteinasas se realizó en un amplio rango de pH desde 5 hasta 8, y la detección de proteinasas solo arrojó la presencia de una banda de actividad proteolítica activa en el pH 8 y con un peso molecular relativo de 60 kDa (Fig. 4). A pesar de que se evaluaron diferentes condiciones de pH y se prolongó el tiempo de incubación por 2 horas no se detectó actividad en otros pH. En el caso del escrutinio de inhibidores de proteinasas, solo se detectó actividad inhibitoria contra proteinasas tipo tripsina. Sin embargo, no se detectó actividad inhibitoria contra enzimas tipo quimotripsina y elastasa, cuyas lecturas fueron prácticamente de cero. Se lograron detectar $0,5 \pm 1,2$ unidades inhibitorias quimotripsina/mg proteína por min; $0,3 \pm 0,5$ unidades inhibitorias elastasa/mg proteína por min, y 14324 ± 120 unidades inhibitorias de tripsina (UIT)/mg proteína por min.

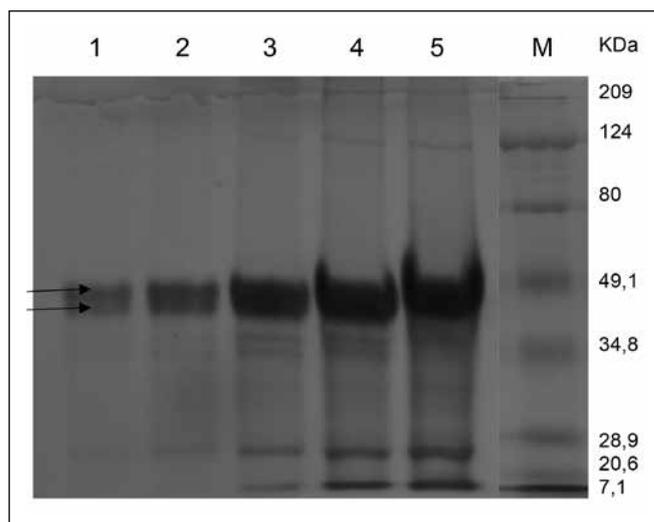


Fig. 4. Perfil proteico del extracto acuoso de wereke. 1 al 5 indican los carriles donde se cargaron diferentes concentraciones de proteína: 2; 5; 10; 20 y 30 μg , respectivamente. Se aprecia la presencia de dos proteínas muy abundantes de 48 y 46 kDa, señaladas por flechas. M: marcador de peso molecular.

Fig. 4. Proteinic profile of aqueous extract of wereke. 1 to 5 indicate the wells where different protein concentrations (2; 5; 10; 20 and 30 μg , respectively) were charged. It is appreciated the presence of two abundant proteins of 48 and 46 kDa, indicated by arrows. M: Molecular weight marker.

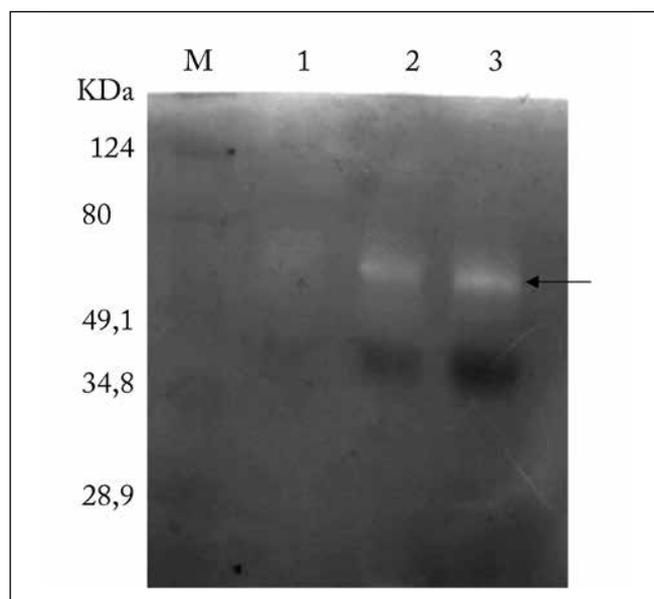


Fig. 5. Presencia de proteasa alcalina en raíz de wereke. 1, 2 y 3 indican los carriles donde se cargaron 2, 5 y 10 μg de proteína, respectivamente. Solo se detectó una banda de actividad proteolítica a pH 8, la cual es señalada con una flecha. M: marcador de peso molecular.

Fig. 5. Presence of alkaline proteinase in the wereke root. 1, 2 and 3 indicate wells where 2, 5 and 10 μg of protein were charged, respectively. Only one proteolytic band was detected at pH 8, which is indicated by an arrow. M: molecular weight marker.

En el caso del escrutinio de actividad antifúngica, se evaluaron tres hongos fitopatógenos, encontrándose que la fracción acuosa no presentó efectos en la disminución del crecimiento del micelio, ni en la densidad del mismo con respecto a los controles. Sin embargo, se pudieron apreciar cambios en la morfología del micelio, aunque estos no fueron homogéneos en las diferentes repeticiones (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

A la fecha existen pocos reportes sobre estudios de las raíces de especies de la familia Cucurbitaceae, aunque hay estudios profundos sobre moléculas bioactivas y algunas aplicaciones potenciales de ciertas especies. En el caso de *I. sonorae*, la parte más utilizada de manera tradicional es la raíz, por lo que los análisis realizados en este trabajo se enfocaron en este órgano, que desde el punto de vista morfológico se puede considerar como una raíz tuberosa. Esto se debe a que presentó una rizodermis a nivel histológico, abundante parénquima interno, y la dispersión del sistema vascular, característico de las raíces tuberosas de dicotiledóneas con crecimiento secundario. Además, careció de escamas así como de nudos y entrenudos. La presencia de yemas estuvo confinada a la zona de la corona, lo cual concuerda con lo encontrado para las descripciones morfológicas e histológicas de algunas especies del género *Momordica*, perteneciente a las Cucurbitaceae (John et al., 2009; Mishra et al., 2009).

Actualmente son bien conocidos los casos en los que muchas raíces tuberosas se emplean como fuente de alimento. Por este motivo, se decidió evaluar a la raíz del wereke mediante un análisis bromatológico general. Dicho análisis fue similar a aquellos efectuados en las principales raíces tuberosas empleadas para la alimentación humana. En el caso de la humedad, presentó un porcentaje mayor que el reportado para la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y el camote (*Ipomoea batatas*), cuyos valores oscilan de 71,3 a 73,8 y de 69,9 a 70,9%, respectivamente. Se presentó también un contenido mayor de cenizas que la arracacha (0,59 a 0,74), que el camote (1,80 a 1,43), y que la yuca (*Manihot esculenta*, 1,35) pero menor que la jícama (*Pachyrhizus abipha*, 3,5%). En el caso de la fibra dietética presentó valores dentro del rango de los contenidos reportados para el camote (2,30 a 3,42%). El contenido de grasa fue similar al de la yuca (0,61%) y al de la jícama (0,65), pero mayor que el contenido lipídico en el camote (0,20 a 0,33%). Finalmente, el contenido de proteína total fue mayor que el de la yuca (0,43%) y la arracacha (0,55 a 0,76%), similar al de la variedad Koganesengan de camote (2,13%), y menor que el de la jícama (8,61%) (Ishida et al., 2000; Doporto et al., 2010; Palacios et al., 2011; Luna et al., 2013). La información precedente podría ser complementada con descripciones organolépticas y toxicológicas. Esto permitiría sugerir a esta raíz como un candidato para ser empleado como fuente de alimento para humanos y/o el ganado, o como materia prima

para procesos industriales. Esto es debido a que sus valores bromatológicos oscilan cercanos a los efectuados en otras raíces de dicotiledóneas comestibles.

La detección de fitoquímicos mediante las reacciones utilizadas permitió únicamente la detección de compuestos fenólicos con permanganato de potasio. Esto indica que en fase acuosa la diversidad de metabolitos extraídos es reducida, siendo los predominantes los compuestos fenólicos hidrosolubles. Las técnicas empleadas en este trabajo fuer similares a las informadas para detectar fitoquímicos en raíces, tallos y hojas de *Moringa oleifera*. En esta especie, se presentó una mayor diversidad de compuestos secundarios en fase acuosa a nivel de raíz (Torres-Castillo et al., 2013) en comparación con los obtenidos en esta investigación. Se han reportado diversos fitoquímicos extraídos de las raíces de diversas especies dentro de la familia Cucurbitaceae, entre los que se distinguen alcaloides, fenólicos, antioxidantes, lípidos esteroidales, taninos, flavonoides y glicósidos cardíacos, los que fueron extraídos en fases orgánicas polares y no polares (Kumar et al., 2009; Shri et al., 2010; Saboo et al., 2013). Estos resultados están en desacuerdo con la poca diversidad de fitoquímicos detectados en el extracto acuoso de *I. sonorae*. Estudios previos han informado más componentes en el caso de la raíz investigada, por lo que muy probablemente otras fases de extracción permitirían la obtención de una mayor diversidad de metabolitos. En el caso de los extractos de raíces de cucurbitáceas, también se han detectado actividades diversas, incluyendo actividades antioxidantes extraídas en fases alcohólicas como en *Coccinia grandis*, *Citrullus colocynth* y *Corallocarpus epigaeus*, vinculadas posiblemente a la presencia de polifenoles, alcaloides y terpenoides (Bhadauria et al., 2012; Shri et al., 2010; Singh, 2010).

Los patrones proteicos extraídos de la raíz del wereke fueron similares a aquellos de otras raíces tuberosas, como el caso del camote. En éste se informaron dos proteínas muy abundantes que alcanzan hasta el 80% del total, denominadas sporamin A y sporamin B. Estas proteínas tienen pesos moleculares muy cercanos, y fueron obtenidas con sistemas de extracción con baja molaridad, en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo. Esto permitió la obtención del patrón proteico descrito anteriormente con dos bandas muy abundantes y de pesos muy cercanos (Maeshima et al., 1985). Así mismo, el perfil proteico de la raíz de wereke mostró una similitud con el patrón de las proteínas de reserva más abundantes de la raíz de *Dioscorea* spp.; si bien hubo una diferencia en pesos moleculares, el patrón de abundancia fue similar (Hou et al., 2000). Por el contrario, en el caso de los perfiles de las proteínas de reserva extraídas de la raíz de jícama de diversas accesiones, existió una abundancia más o menos homogénea entre las diversas proteínas extraídas. Sin embargo, en este estudio (Forsyth y Shewry, 2002) el sistema de extracción estuvo enfocado en proteínas solubles en altas concentraciones de sal ya que se empleó NaCl 1M en el buffer de extracción.

Los aspectos funcionales de las proteínas obtenidas incluyen la presencia de propiedades antioxidantes, como el caso de las enzimas dehidroascorbato reductasa y la monodehidroascorbato reductasa detectadas en la raíz de *Dioscorea batatas* Decne (Hou et al., 1999); también se ha detectado actividad de amilasas, usualmente vinculadas con la degradación de las reservas propias de la planta durante los procesos de rebrote de raíces (Hagenimana et al., 1994; Pires et al., 2002). En el presente trabajo no se detectó la presencia de amilasas bajo las condiciones de análisis. Sin embargo, se logró la detección de una proteinasa activa bajo condiciones de pH alcalino, similarmente a lo reportado para el camote. En éste se encontró la actividad de una serin proteinasa de 82 kDa activa a pH 7,9 e inhibida selectivamente por un inhibidor químico específico; dicha enzima fue asociada con funciones endógenas (Chen et al., 2004). Otro tipo de actividad bioquímica relacionada con proteínas, y que ha sido reportada para raíces tuberosas, son los inhibidores de proteinasas. Estos se han detectado ampliamente en diversas especies del género *Dioscorea*, dirigidos específicamente contra enzimas de tipo tripsina (Hou et al., 2000). Una de las proteínas más abundantes en la raíz de *I. batatas* resultó ser un inhibidor de tripsina de 33 kDa. A esta proteína se le atribuyen además propiedades antioxidantes, con posibles beneficios al ser consumida como parte de la dieta. En el caso de la raíz de wereke, solo se detectó la actividad contra tripsina a pesar de que se emplearon reacciones para la detección de inhibición de tres tipos catalíticos de serin proteinasas. Por otra parte, también se ha reportado la presencia de algunas proteínas en las raíces tuberosas de otras cucurbitáceas pertenecientes a los géneros *Momordica* spp. y *Trichosanthes* spp., las cuales presentaron actividad antitumoral, inductora de abortos, inactivadora de ribosomas e inmunomoduladora (Ng et al., 1992; Yeung et al., 2009). Estas proteínas podrían además tener diversas aplicaciones biotecnológicas. Existen reportes de algunas actividades antimicrobianas atribuidas al wereke (Ruiz-Bustos et al., 2009). Sin embargo, en el presente estudio no se detectó actividad antifúngica con las especies de hongos empleadas. Esto fue posiblemente debido a que los componentes activos no se extrajeron en una concentración adecuada, o que los hongos evaluados fueron resistentes a los compuestos antimicrobianos. Los resultados obtenidos sugieren aumentar la cantidad de microorganismos a evaluar y las concentraciones del extracto para aumentar las posibilidades de encontrar compuestos antimicrobianos de interés biotecnológico en el extracto acuoso.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por las facilidades prestadas para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Aguirrezabala-Cámpano, M.T., R.I. Torres-Acosta, A. Blanco-Labra, M.E. Mediola-Olaya, S.R. Sinagawa-García, A. Gutiérrez-Díez y J.A. Torres-Castillo (2013). Trypsin inhibitors in xocconostle seeds (*Opuntia joconostle* Weber.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22: 261-268.
- Alarcón-Aguilar, F.J., F. Calzada-Bermejo, E. Hernández-Galicia, C. Ruiz-Angeles y R. Roman-Ramos (2005). Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 447-452.
- Andrade-Cetto, A. y M. Heinrich (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 325-348.
- AOAC (2000). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry. 16 ed. Arlington. 1025 p.
- Bhadauria, P., B. Arora, B. Vimal y A. Kulshrestha (2012). *In vitro* antioxidant activity of *Coccinia grandis* root extracts. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences* 2: 230-238.
- Chen, T.E., D.J. Huang y Y.H. Lin (2004). Isolation and characterization of a serine protease from the storage roots of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. *Plant Science* 166: 1019-1026.
- Doporto, M.C., A. Mugridge, A.R. Chaves, M.A. García y S.Z. Viña (2010). Valor nutritivo y parámetros fisiológicos relativos a la conservación poscosecha de raíces de ahípa (*Pachyrhizus abípa*). *Revista Iberoamericana de Tecnología de Postcosecha* 11: 75-81.
- Erlanger, B.F., N. Kokowski y W. Cohen (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.
- Estrada-Zúñiga, M.E., H. Arano-Varela, L. Buendía-González y J. Orozco-Villafuerte (2012). Fatty acids, phenols content and antioxidant activity in *Ibervillea sonora* callus cultures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11: 89-96.
- Fernandopulle, B.M.R., E.H. Karunanayake y W.D. Ratnasooriya (1994). Oral hypoglycaemic effects of *Momordica dioica* in the rat. *Medical Science Research* 22: 137-139.
- Forsyth, J.L. y P.R. Shewry (2002). Characterization of the major proteins of tubers of Yam bean (*Pachyrhizus abípa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1939-1944.
- Hagenimana, V. y R.E. Simard (1994). Amylolytic activity in germinating sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *Journal of American Society for Horticultural Science* 119: 313-320.
- Hernández, E., F. Calzada, R. Román R y F.J. Alarcón (2007). Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* Root: Isolation and Hypoglycaemic activity. *Planta Medica* 73: 236-240.
- Hou, W.C., H.J. Chen y Y.H. Lin (1999). Dioscorins, the major tuber storage proteins of yam (*Dioscorea batatas* Decne), with dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities. *Plant Science* 149: 151-156.
- Hou, W.C., H.J. Chen y Y.H. Lin (2000). Dioscorins from different *Dioscorea* species all exhibit both carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 41: 191-196.
- Ishida, H., H. Suzuno, N. Sugiyama, S. Innami, T. Tadokoro y A. Maekawa (2000). Nutritive evaluation on chemical components of leaves stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* poir). *Food Chemistry* 68: 359-367.

- John, K.J., V.T. Antony, J. Marydas y R. Karuppaiyan (2009). Tuber morphology, germination behavior and propagation efficiency in three edible *Momordica* (Cucurbitaceae) species of India. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 861-868.
- Kanchanapoom, T., R. Kasai y K. Tamasaki (2002). Cucurbitane, hexanorcucurbitane and octanorcucurbitane glycosides from fruits of *Trichosanthes tricuspidata*. *Phytochemistry* 59: 215-228.
- Kocyan, A., L.B. Zhang, H. Schaefer y S.S. Renner (2007). A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 553-577.
- Kumar, P., D. Rao, L. Bilakanti y R. Setty (2008). Pharmacological studies on tubers of *Momordica tuberosa* Cogn., Cucurbitaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20: 7-11.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lira, R., C. Rodríguez-Jiménez, I. Rodríguez, J. Castrejón y A. Domínguez-Mariani (1998). Diversidad e Importancia de la familia Cucurbitaceae en México. *Acta Botánica Mexicana* 42: 43-77.
- Luna, A.T., F.F.G. Rodrigues, J.G.M. Costa y A.O.B. Pereira (2013). Physical-chemical study, microbial and bromatological of *Manihot esculenta* Crantz (Mandioca). *Revista Interfaces* 1: 1-11.
- Maeshima, M., T. Sasaki y T. Asahi (1985). Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry* 24: 1899-1902.
- Mishra, V., G. Srivastava y S.M. Prasad (2009). Antioxidant response of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seedlings to interactive effect of dimethoate and UV-B irradiation. *Scientia Horticulturae* 120: 373-378.
- Mochizuki, A. (1998). Characteristics of the digestive proteases in the gut of some insect orders. *Applied Entomology and Zoology* 33: 401-407.
- Morales, D.M. y S. Siles (2013). Identificación de los principales componentes de la raíz de wereke, extraíbles en medio acuoso, por GC-MS. *Avances en Ciencias e Ingeniería* 4: 15-21.
- Ng, T.B., W.Y. Chan y H.W. Yeung (1992). Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti AIDS activities from Cucurbitaceae plants. *General Pharmacology: The vascular system* 23: 575-590.
- NOM (2004). NMX-F-615-NORMEX-2004. Alimentos-determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos-métodos de prueba (cancela a la NMX-F-089-S-1978). Diario Oficial de la Federación, 21 de mayo de 2004. México.
- Palacios, R., M. Morales y G.C. Arias (2011). Bromatological chemical evaluation of three varieties of *Arracacia xanthorrhiza* "arracha". *Ciencia e investigación* 14: 12-14.
- Pires T.C.R., E.M. de Veiga y F. Hinardi Filho (2002). Enzimas amilolíticas de Mandioquinha-Salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 22: 278-284.
- Raman, A. y C. Lau (1996). Anti-Diabetic Properties and Phytochemistry *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine* 2: 349-362.
- Rivera-Ramírez, F., G.N. Escalona-Cardoso, L. Garduño-Siciliano, C. Galaviz-Hernández y N. Paniagua-Castro (2011). Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Iberivillea sonora* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 1-6.
- Ruiz-Bustos, E., C. Velázquez, A. Garibay-Escobar, Z. García, M. Plascencia-Jatomea, M.C. Cortez-Rocha, J. Hernández-Martínez y R.E. Robles-Zapeda (2009). *Journal of Medicinal Food* 12: 1398-1402.
- Saboo, S.S., P.K. Thorat, G.G. Tapadiya y S.S. Khadabad (2013). Evaluation of phytochemical and anticancer potential of chloroform extract of *Trichosanthes tricuspidata* Lour roots (Cucurbitaceae) using in-vitro models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5: 203-208.
- Schaefer, H. y S.S. Renner (2011). Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *Taxon* 60: 122-138.
- Shri, C.N., J. Balaji, S. Venkatramanan y K.L. Madhumathi (2010). Pharmacognostical and preliminary phytochemical screening of the root and rhizome of *Corallocarpus epigaeus*. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research* 1: 24-27.
- Singh, S. (2010). Phytochemical investigation of *Sonchus oleraceus* leaves and *Citrullus colocynthis* root. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 4: 159-162.
- Torres-Castillo, J.A., S.R. Sinagawa-García, G.C.G. Martínez-Ávila, A.B. López-Flores, E.I. Sánchez González, V.E. Aguirre-Arzola, R.I. Torres-Acosta, E. Olivares-Sáenz, E. Osorio-Hernández y A. Gutiérrez-Díez (2013). *Moringa oleifera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 82: 193-202.
- Vega-Avila, E., A. Espejo-Serna, F. Alarcón-Aguilar y R. Velasco-Lezama (2009). Citotoxic Activity of Four Mexican Medicinal Plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 52: 78-82.
- Yeung, H.W., T.B. Ng, N.S. Wong y W.W. Li (2009). Isolation and characterization of an abortifacient protein, momorcochin, from root tubers of *Momordica cochinchinensis* (Family Cucurbitaceae). *International Journal of Peptide and Protein Research* 30: 135-140.