



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

TESIS DOCTORAL

**“GLICÓSIDOS DE FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
CITOTÓXICA DE *Calia secundiflora* (ORT.) YAKOVLEV”**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

ROSARIO MELINA BARRÓN YÁNEZ

Chapingo, Estado de México, junio de 2011



“GLICÓSIDOS DE FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
CITOTÓXICA DE *Calia secundiflora* (ORT.) YAKOVLEV”

Tesis realizada por **Rosario Melina Barrón Yáñez** bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el
grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



DRA. MA. DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESOR:



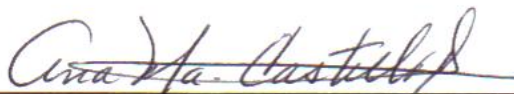
DR. R. MARCOS SOTO HERNANDEZ

ASESOR:



DRA. MA. TERESA COLINAS LEÓN

ASESOR:



DRA. ANA MARÍA CASTILLO GONZÁLEZ

LECTOR EXTERNO:



DRA. MARÍA ANTONIA PÉREZ OLVERA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para llevar a cabo los estudios de Doctorado en Ciencias en el Departamento de Fitotecnia.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Programa Docente de Horticultura por la oportunidad que me brindo para mi superación profesional.

A la Dra. Ma. del Rosario García Mateos, Dr. Marcos Soto Hernández, Dra. María Teresa Colinas León, Dra. Ana María Castillo González y la Dra. Antonia Pérez Olvera por sus atinados consejos en este trabajo de investigación.

Al Dr. Alberto Medina, por el apoyo en la parte de citotoxicidad en este trabajo de investigación.

Al M.C. Luis Emilio Catillo Márquez, por su apoyo en la parte estadística

Y a personas como el Químico Cecilio del área de Fisiología Vegetal de Fitotecnia, al M.C. Emmanuel Ibarra, a la Dra. Maribel, al Sr Domingo González Meráz del Colegio de Posgraduados, que de una u otra manera aportaron parte importante de sus conocimientos para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Quiero hacer un agradecimiento especial al Dr. Alejandro Rodríguez, por haberme motivado a iniciar con los estudios de doctorado. Por el tiempo que compartimos juntos, por los momentos especiales que siempre quedarán grabados en mi mente y en mi corazón. El Creador te llene de bendiciones!!

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este triunfo, en primer lugar, a Petra y José Luis, porque con sus sabios consejos y apoyo pude realizar este sueño. Los quiero y amo papás.

Corazoncito, te dedico este trabajo y esfuerzo que, como sabes, ha sido un logro de las dos. Te amo y te adoro Z. Yoali.

Para mis hermanos, amigos y familiares, quienes han formado parte importante en este proceso de formación. Muy en especial a Marta Carrillo, Miryam Chávez, Maribel, Cecilia, Nancy, Erika Barreto, Luis Barron, Magnolia Valdes, a la fam. Tafoya Carrillo, fam. Valdes Velazquez y a la fam. Rodríguez Ortega.

Todo existe por causalidad,

Y no por casualidad.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis, Ingeniero Agrónomo Rosario Melina Barrón Yáñez, es originaria de Pachuca, Hidalgo, donde nació el 05 de Octubre de 1979. Realizó estudios de Educación Media Superior y Educación Superior en la Universidad Autónoma Chapingo donde curso la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola de la que egresó en junio del 2002. Realizó estudios de Maestría en Ciencias en Horticultura de 2004 a 2007. En el 2009 publicó el primer artículo derivado del trabajo de investigación realizado en los estudios de maestría en ciencias intitulado: “VALOR NUTRICIO Y CONTENIDO DE SAPONINAS EN GERMINADOS DE HUAUZONTLE (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), CALABACITA (*Cucurbita pepo* L.), CANOLA (*Brassica napus* L.) Y AMARANTO (*Amaranthus Ceucocarpus* S. Watson syn. *hypochondriacus* L.)” en la Revista Chapingo, serie Horticultura. Del 2008 al 2010 apoyó en las prácticas de química agroecológica para los estudiantes de postgrado en el departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Ha participado como ponente en el Congreso Nacional Agronómico en 2007, 2009 y 2010 con trabajos de investigación derivados de la tesis de Doctorado. En el 2010 envió un manuscrito a la revista Fitotecnia Mexicana, titulado: FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Calia secundiflora* (ORT.) YAKOVLEV”, esperando sea aprobado para su publicación. Ha participado como asistente a Cursos-Talleres como “Mariposas en el paisaje” y “Resistencia de plantas a herbicidas”.

INDICE

ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Descripción de <i>Calia secundiflora</i>	3
2.1.1. Distribución de <i>Calia secundiflora</i>	3
2.1.2. Características taxonómicas.....	3
2.1.3. Características morfológicas de <i>Calia secundiflora</i>	4
2.1.3.1. Hojas y flores	4
2.1.3.2. Fruto	4
2.1.3.3. Semilla	5
2.1.3.4. Ecología.....	6
2.1.3.5. Propiedades biológicas.....	8
2.1.4. Fitoquímica	9
2.1.4.1. Alcaloides quinolizidínicos en <i>Calia secundiflora</i>	9
2.1.4.2. Isoflavonoides.....	9
2.2. Metabolitos secundarios.....	10
2.3. Los terpenoides.....	13
2.3.1. Estructura de los terpenoides	14
2.3.2. Clasificación de los terpenoides	15
2.3.3. Actividad biológica de los terpenos.....	16
2.4. Los esteroides.....	17
2.4.1. Biogénesis de los esteroides	18
2.4.2. Actividad biológica de los esteroides	19
2.4.2.1. Actividad citotóxica	19
2.5. Los compuestos fenólicos	23

2.5.1.	Estructuras de los compuestos fenólicos.....	24
2.5.2.	Clasificación de los compuestos fenólicos.....	25
2.5.3.	Identificación de los compuestos fenólicos.....	26
2.5.4.	Actividad biológica de los compuestos fenólicos	27
2.6.	Los compuestos flavonoides	28
2.6.1.	Estructura de los flavonoides.....	29
2.6.2.	Clasificación de flavonoides	30
2.6.3.	Identificación de flavonoides.....	31
2.6.4.	Actividad biológica de los flavonoides	32
2.6.4.1.	Actividad antioxidante	33
OBJETIVOS		43
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1.	Recolecta del material vegetal	44
3.2.	Estudio preliminar de compuestos fenólicos y terpenoides.....	44
3.3.	Estudio fitoquímico de <i>C. secundiflora</i>	46
3.3.1.	Compuestos fenólicos y actividad antioxidante	46
3.3.1.1.	Cuantificación de fenoles y flavonoides totales	46
3.3.1.2.	Separación de flavonoides.....	47
3.3.1.3.	Identificación de flavonoides por cromatografía de líquidos- espectrometría de masas (CL-EM).....	50
3.3.1.4.	Actividad antioxidante del extracto metanólico y butanólico	51
3.3.2.	Estudio del extracto de acetato de etilo y actividad citotóxica	53
3.3.2.1.	Determinación de la Concentración Letal media (CL ₅₀) sobre <i>Artemia salina</i>	54
3.3.2.2.	Evaluación citotóxica del extracto de acetato de etilo.....	56
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	58
4.1.	Recolecta del material vegetal	58
4.2.	Estudio preliminar de compuestos fenólicos y terpenoides.....	58
4.3.	Estudio fitoquímico de <i>C. secundiflora</i>	60
4.3.1.	Compuestos fenólicos y actividad antioxidante	60
4.3.1.1.	Cuantificación de fenoles y flavonoides	60

4.3.1.2.	Separación de flavonoides.....	61
4.3.1.3.	Identificación de flavonoides por cromatografía de líquidos- espectrometría de masas (CL-EM).....	63
4.3.1.4.	Actividad antioxidante del extracto metanólico y butanólico	67
4.3.2.	Estudio del extracto de acetato de etilo y actividad citotóxica	70
4.3.2.1.	Determinación de la Concentración Letal media (CL ₅₀) sobre <i>Artemia salina</i>	70
4.3.2.2.	Evaluación citotóxica del extracto de acetato de etilo.....	72
5.	CONCLUSION	74
6.	LITERATURA CITADA.....	75

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diferencias del tipo de suelo de los sitios en los que se colectó la especie <i>C. secundiflora</i> (Zavala <i>et al.</i> , 2006).	7
Cuadro 2. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica (Harborne, 1989).	25
Cuadro 3. Rendimiento de los extractos de hojas y semillas obtenidos de <i>Calia secundiflora</i> (g/100 g de muestra seca).	59
Cuadro 4. Tiempo de retención (t_R), peso molecular relativo (M_t), azúcares localizados en la posición C-3 y C7 de las agliconas de los flavonoides identificados en las hojas de <i>Calia secundiflora</i> de Hidalgo.	63
Cuadro 5. Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de DPPH con los extractos y fracciones de <i>Calia secundiflora</i>	68
Cuadro 6. Dosis Letal Media del extracto de acetato de etilo de <i>C. secundiflora</i> recolectadas en Cardonal, Hidalgo y Cadereyta, Querétaro, aplicado a crustáceos de <i>A. salina</i>	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flores, frutos y semillas de <i>Calia secundiflora</i>	5
Figura 2. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario de las plantas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009)	11
Figura 3 Estructura de la cafeína	13
Figura 4. Estructura química del isopreno	15
Figura 5 Estructuras químicas de estigmasterol y sitosterol (Ávalos y Perez-Urria)	17
Figura 6. Enumeración de los átomos de carbono en la molécula de colesterol...	18
Figura 7. Estructura química de un fenol.....	25
Figura 8. Estructura básica de los flavonoides	30
Figura 9. Estructura de los Flavonoides.	31
Figura 10. Estructura de DPPH, derecha radical libre, izquierda no radical	42
Figura 11. Diagrama de flujo para la extracción de metabolitos secundarios de <i>C. secundiflora</i>	46
Figura 12. Diagrama del proceso del extracto metanólico de <i>C. secundiflora</i>	48
Figura 13. Partición del extracto metanolico con diclorometano: agua y, posteriormente, con butanol.	49
Figura 14. Cromatografía en capa fina preparativa con el extracto butanólico.	50
Figura 15. Diagrama de flujo para evaluar actividad citotóxica en células HeLa...	54
Figura 16. Obtención de nauplios de <i>Artemia salina</i> en solución salina.....	55
Figura 17. Incubación de los crustáceos con el extracto acetato de etilo.....	56
Figura 18. Ubicación de las zonas de recolecta del material vegetal, Cardonal, Hgo. y Cadereyta, Qro., Méx.....	58

Figura 19. a) Placa cromatográfica en capa fina revelada con NP y PEG, observada bajo lámpara UV (1: recolecta Hgo; 2: recolecta Qro.). b) Placa cromatográfica en capa fina revelado con vainillina y ácido sulfúrico (1: β -sitosterol estandar; 2: Hoja Hgo; 3: semilla Hgo; 4: Hoja Qro; 5: semilla Qro)	59
Figura 20. Cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de hojas de <i>C. secundiflora</i> a) blanco; b) hoja de Qro.; c) estándar quercetina; d) hoja de Hgo.....	60
Figura 21. Placa cromatográfica preparativa ya revelada. Se observan dos manchas color amarillo a simple vista.....	62
Figura 22. Estructura de las agliconas de los glicósidos identificados en <i>C. secundiflora</i>	64
Figura 23. Cromatograma de la fracción 1 comparada con el extracto crudo de <i>Calia secundiflora</i> y la especie de <i>Cladrastis</i>	65
Figura 24. Cromatogramas EM-EM comparativos de la fracción 2, extracto crudo de <i>C. secundiflora</i> y <i>Cladrastis</i> de dos flavonoides acilados aun no identificados antes en las especies.....	66
Figura 25. Cambio de coloración del radical DPPH del púrpura al amarillo. a) DPPH; b) quercetina; c) hoja de Hidalgo; d) hoja de Querétaro.....	67
Figura 26 Actividad antioxidante de los extractos y fracciones en relación a la variación de la concentración de DPPH remanente en función del tiempo.	69
Figura 27. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos de acetato de etilo de <i>Calia secundiflora</i> evaluado en líneas celulares cancerígenas HeLa.....	73

“GLICÓSIDOS DE FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE *Calia secundiflora* (ORT.) YAKOVLEV”

"FLAVONOID GLYCOSIDES AND ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *Calia secundiflora* (ORT.) YAKOVLEV"

Barrón-Yáñez, R.M.¹; García-Mateos, M. R.²

RESUMEN

Los estudios fitoquímicos en *Calia secundiflora* (Ortega) Yakovlev (Fabaceae) se han dirigido hacia la investigación de alcaloides, sin embargo se desconoce el perfil de flavonoides y de otros metabolitos secundarios. Las investigaciones han mostrado que los metabolitos de algunas plantas se asocian con la capacidad antioxidante y la actividad citotóxica. El objetivo de esta investigación fue el fraccionamiento del extracto de acetato de etilo con la finalidad de aislar e identificar y cuantificar el contenido de flavonoides y evaluar el potencial antioxidante en las hojas; así como detectar la presencia de terpenoides y la posible relación con la actividad citotóxica que pueden presentar las hojas y semillas de la misma especie. La actividad antioxidante se evaluó por el método de DPPH. El contenido de compuestos fenólicos totales ($8.31 \pm 0.38 \text{ mg g}^{-1}$ de materia seca) fue mayor al de flavonoides ($3.08 \pm 0.32 \text{ mg g}^{-1}$ de materia seca). El análisis por CL-EM permitió identificar siete di, tri y tetra glicósidos descritos por primera vez en *Calia secundiflora*. La presencia de los glicósidos de los flavonoles: quercetina, isoramnetina y kaempferol explican la actividad antioxidante. Mediante un ensayo, se evaluó la actividad citotóxica de los extractos de *C. secundiflora* en *Artemia salina*, y en células HeLa por el método MTT. Los extractos de las hojas de *C. secundiflora* presentaron mayor citotoxicidad en células HeLa a concentraciones mayores ($166.7\text{-}500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Palabras clave: actividad antioxidante, *Calia secundiflora*, *Artemia salina*, citotoxicidad, fenoles, flavonoides.

SUMMARY

Phytochemical studies on *Calia secundiflora* (Ortega) Yakovlev (Fabaceae) have been directed towards researching alkaloids. However, the profile of flavonoids and other secondary metabolites is unknown. Research has shown that the metabolites of some plants are associated with antioxidant and cytotoxic activity. The objectives of this research were to identify and quantify flavonoid content, evaluate the antioxidant potential in the leaves, and detect the presence of terpenoids and the possible relationship to cytotoxic activity that leaves and seeds of the same species may have. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH assay. The total phenolic compounds content ($8.31 \pm 0.38 \text{ mg g}^{-1}$ dry matter) was higher than that of flavonoids ($3.08 \pm 0.32 \text{ mg g}^{-1}$ dry matter). The LC-MS analysis identified seven di-, tri- and tetra-glycosides described for the first time in *Calia secundiflora*. The presence of flavonol glycosides, quercetin, isorhamnetin and kaempferol, explains the antioxidant activity. Using a biological assay, the cytotoxic activity of *C. secundiflora* extracts in *Artemia salina* was evaluated, whereas the MTT method was used to assess the activity in HeLa cells. Extracts from the leaves of *C. secundiflora* showed higher cytotoxicity in HeLa cells at concentrations higher ($166.7\text{-}500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Keywords: antioxidant activity, *Calia secundiflora*, *Artemia salina*, cytotoxicity, phenols, flavonoids.

¹ Autor de la tesis, requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. México.

^{2*} Profesor-investigador. Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. México. 56230. Tel. 01 (595 95 215 00 Ext. 5797).

1. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales presentan propiedades medicinales tales como antibióticas, anticancerígenas, antibacterianas, antiviral, etcétera, sin embargo existe un gran número de especies que aun no son estudiadas. Por tal motivo, surge la necesidad de realizar estudios fitoquímicos y evaluar la actividad biológica de plantas con la finalidad de identificar los principios activos en beneficio del hombre, sobre todo aquellas que no han sido estudiadas. Además, el estudio fitoquímico de algunas especies puede contribuir al conocimiento taxonómico de las mismas, como es el caso de *Calia secundiflora*.

C. secundiflora (Ortega) Yakovlev (Fabaceae) se encuentra distribuida en África, América y Asia (Hatfield *et al.*, 1977; Shulthes y Hofmann, 1982). En México, se localiza en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, Querétaro e Hidalgo (Rzedowski, 1978; Aguilar y Zolla, 1982), se le conoce vulgarmente como Patol, Pitol, Coca, Colorín, Chicolón y Frijolillo, sin embargo, es mas ampliamente conocida como *Sophora secundiflora* (Ortega) Lag. ex DC. Debido a sus efectos alucinógenos, era utilizada en rituales por grupos étnicos del suroeste de los Estados Unidos (Murakoshi *et al.*, 1986; Keller, 1975).

Los estudios fitoquímicos de *Calia secundiflora* solo se han dirigido hacia la investigación de alcaloides, se desconoce la presencia de flavonoides, que justifica los efectos benéficos que puede aportar la especie. Se ha observado que los flavonoides presentan propiedades anticancerígenas, cardiotónicas,

antitrombóticas, vasculares, disminuyen el colesterol, contribuyen en la protección del hígado, entre otras (Robards *et al.*, 1999). Los flavonoides presentan potencial citotóxico, bien por estimular el bombeo de ciertos agentes cancerígenos hacia el exterior de las células o bien por actuar mediante la inducción de enzimas de detoxificación (Fukumoto y Mazza, 2000). Sin embargo, la actividad citotóxica que presentan las especies vegetales puede deberse a otro tipo de metabolito como son los terpenoides (Sparg *et al.*, 2004). En *Calia secundiflora* se desconoce la presencia de flavonoides y si presentan algún tipo de actividad antioxidante o citotóxica. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar y cuantificar el contenido de flavonoides y evaluar el potencial antioxidante, además de detectar la presencia de terpenoides y la posible relación con la actividad citotóxica.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción de *Calia secundiflora*

Las leguminosas (Fabaceae), integran la tercera familia mas importante en todo el mundo. Tiene gran importancia agrícola y económica e incluye especies destinadas como alimento, aceites, fibra, combustible, madera, uso terapéutico, numerosos productos químicos, enriquecimiento del terreno (Sousa y Rudd., 1993).

La subfamilia Papilionoideae, contiene aproximadamente 483 genera y 12,000 especies; (Lewis *et al.*, 2005) y se encuentran ampliamente distribuida. A este grupo pertenecen los géneros como *Sophora* y *Calia* (Wojciechowski, 2003).

2.1.1. Distribución de *Calia secundiflora*

La especie *Calia secundiflora* (Ort) Yakovlev, se encuentra presente en África, específicamente en Kenya; en Asia se le encuentra en India y Pakistan; en América está distribuida en los Estados Unidos de Norteamérica en Texas, Suroeste de Nuevo México, Hawaii y Guam; en México se ha reportado en varios estados como Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Rzedowski, 1978; Aguilar y Zolla, 1982; Lagunes *et al.*, 1990; Anónimo, 2002; Anónimo, 2005).

2.1.2. Características taxonómicas

La planta de *Calia secundiflora* pertenece al Reino Plantae, de la división Magnoliophyta; Clase Dicotyledoneae; Orden Rosales; Familia Fabaceae;

Subfamilia Papilionoideae y del género *Calia*. El género *Calia* anteriormente era nombrado como *Sophora*, sin embargo los estudios moleculares demostraron la diferencia entre géneros.

2.1.3. Características morfológicas de *Calia secundiflora*

2.1.3.1. Hojas y flores

Las hojas son alternas tienen de 7 a 11 folíolos alternos de 2.5 a 6.0 cm de largo, de 1 a 3 cm de ancho, son elípticos, oblongos, suborbiculares e incluso romboideos. Son coriáceos, el ápice desde redondeado hasta emarginado, la base es aguda a redondeada, haz lustroso y glabro; el envés es glabro a seríceo, al menos cuando joven, las nervaduras son algo prominentes; el raquis es acanalado; pedicelo de 6 a 8 mm de largo (Sousa y Rudd, 1993).

Las inflorescencias se presentan en racimos de 5 a 10 cm de largo, terminales; con brácteas y bractéolas lineares (Sousa y Rudd, 1993).

Las flores son de 20 a 30 mm de largo, de color azul violeta, agrupadas en racimos terminales de cinco a diez centímetros, cáliz de 5 a 7 mm de largo, campanuladas, la floración se desarrolla de marzo a abril (Sousa y Rudd, 1993; Vines, 1960) (Figura 1).

2.1.3.2. Fruto

En la Figura 1 se muestran los frutos, son vainas indehiscentes de color café, pubescentes, que van de 2.5 hasta 12.5 cm de largo, epicarpio pardo, amarillo,

rojizo o negro en la madurez, pedúnculo de 1 cm de largo, grueso, cada vaina produce de una a ocho semillas, su fructificación se presenta en el mes de septiembre (Vines, 1960; Sousa y Rudd, 1993).

2.1.3.3. Semilla

Las semillas se producen de manera abundante, su tamaño es en promedio de 1.5 cm de largo; son de forma globosa; la testa es gruesa y dura, su color va de un anaranjado a rojo brillante, puede llegar a confundirse con la semilla de la especie *Erythrina americana* Miller (Figura 1). La semilla es el principal medio de reproducción (reproducción sexual). El número cromosómico $2n=18$ (Vines, 1960; Sousa y Rudd, 1993).

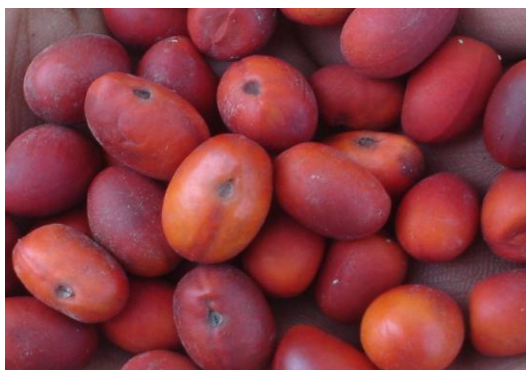


Figura 1. Flores, frutos y semillas de *Calia secundiflora*.

2.1.3.4. Ecología

Debido a la presencia de *C. secundiflora* en diferentes lugares del país y a sus diferencias climáticas, no se han determinado las características ecológicas particulares relacionadas con su hábitat (Zavala *et al.*, 2006).

Zavala *et al.* (2006), en un estudio ecológico realizado en dos regiones del país, encontraron que en el estado de Querétaro la vegetación se encuentra dominada por tres especies, las cuales son *Dodonea viscosa*, *Montanoa tormentosa* y *C. secundiflora*, esta última se encuentra en mayor proporción en comparación con las anteriores. En el estado de Hidalgo, ésta especie se encuentra en segundo lugar en dominancia de la vegetación en comparación con dos especies que son *Flourensia resinosa* y *Myrtilocactus geometrizans*.

Zavala *et al.* (2006), analizaron dos sitios en donde crece *C. secundiflora*, Hidalgo y Querétaro, encontrando que crece en suelos de diferente estructura, arcillosa y arenosa, también encontraron que hay diferencias en la cantidad de materia orgánica, siendo mayor en Querétaro, por el contrario en Hidalgo se encontró un suelo más somero y mas degradado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferencias del tipo de suelo de los sitios en los que se colectó la especie *C. secundiflora* (Zavala *et al.*, 2006).

	Hidalgo	Querétaro
pH	7.5	7.7
Conductividad eléctrica (CE dS m ⁻¹)	1.6	1.1
Fe (mgkg ⁻¹)	11	6
Materia Orgánica (%)	9	21
N (mgkg ⁻¹)	32	64
P (mgkg ⁻¹)	6	19
K (mgkg ⁻¹)	742	349
CaCO ₃ (mgkg ⁻¹)	1	7
Carbón orgánico (%)	2.96	---

Estas características del suelo sugieren que las condiciones de Querétaro son más propicias para el desarrollo de *C. secundiflora*, sin embargo, no es una planta exigente en cantidad de materia orgánica ya que se le localiza en suelos de piedra caliza y generalmente se encuentra dispersa en barrancas o cuevas (Vines, 1960). Las plantas recolectadas en Hidalgo contienen una mayor cantidad de compuestos alcaloides, posiblemente en respuesta al grado de deterioro del lugar en donde crece.

2.1.3.5. Propiedades biológicas

Murakoshi *et al.* (1986) y Keller (1975) mencionan que en el suroeste de los Estados Unidos las semillas de *C. secundiflora* se utilizaban por los grupos étnicos en rituales por sus efectos alucinógenos, aunque no se ha comprobado. Hasta el momento se desconoce si presenta propiedades antioxidantes o citotóxicas.

Hatfield *et al.* (1977) demostró en diferentes pruebas de laboratorio que los alcaloides quinolizidinicos presentes en *C. secundiflora* causan la muerte de ratas de laboratorio.

Lagunes *et al.* (1990), menciona que un extracto acuoso a base de las hojas de *C. secundiflora* o en forma de polvo se utiliza en el combate de insectos plaga como *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* y *Pseudolateria unipuncta*. Los extractos acuosos de *C. secundiflora* también demostraron tener actividad contra organismos fitopatógenos como *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Monilia fructicola*, *Pseudomonas* sp, *Xanthomonas campestris* y *Erwinia carotovora* debido a la presencia de alcaloides como lupanina, citicina y lupinina (Pérez-Laínez *et al.*, 2008). Por otro lado, Zárate *et al.* (2006), mencionan que los extractos de *C. secundiflora* presentan efecto fitotóxico sobre la germinación de semillas y desarrollo de plantas de *Lactuca sativa*, *Amaranthus hybridus*, *Lolium perenne*, *Ipomoea purpurea* y *Bidens odorata*.

2.1.4. Fitoquímica

2.1.4.1. Alcaloides quinolizidínicos en *Calia secundiflora*

Kite y Pennington (2003), realizaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas un análisis de extractos de hoja de la especie y detectaron presencia de alcaloides quinolizidínicos.

El estudio más reciente sobre *C. secundiflora* fue realizado por Zavala *et al.* (2006), en donde compararon el perfil de alcaloides contenidos en diferentes tejidos como: hoja, raíz y semillas colectadas en Querétaro e Hidalgo, con lo que detectaron 11 estructuras alcaloidales en el material recolectado en Hidalgo, número mayor al de la muestra de Querétaro. Algunas de estas estructuras no se habían reportado para la especie. En un estudio preliminar realizado por Zárate *et al.*, (2006), encontró presencia de alcaloides en hojas y raíz de *C. secundiflora*. García *et al.* (2007), consideran que es una fuente de alcaloides ya que contienen mas de 0.01% de estos metabolitos, en peso seco.

2.1.4.2. Isoflavonoides

También se han realizado análisis fitoquímicos de *C. secundiflora* en los que se encontraron isoflavonoides, llamados secundifloroles A-F, en las raíces. Tanaka *et al.* (1998), encontraron en un estudio fitoquímico nuevos tipos de isoflavonoides en *C. secundiflora* (anteriormente llamada *Sophora secundiflora*), *S. arizonica* y *S. gysophila* y determinaron que únicamente la primera especie presenta en sus tallos una mayor cantidad de isoflavonoides que el resto de estas. Los isoflavonoides detectados fueron: isoflavanos, pterocarpanos, dos tipos de 3-

hidroxiisoflavanonas (secundiflorano y secundiflorona A), siete isoflavonoides (formononetina, genisteína, prunetina, biochanina A, secundiflorol B y secundiflorol C) y una isoflavanona (secundiflorol F). En *S. arizonica* se encontraron diez tipos de isoflavonoides y en *S. gypsophylla* solo ocho estructuras distintas de este tipo de metabolitos (Tanaka *et al.*, 1998).

Los alcaloides y las isoflavonas son compuestos presentes en las plantas, en diferentes concentraciones y forman parte de los metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios juegan un papel muy importante en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Rhodes, 1994).

2.2. Metabolitos secundarios

En las plantas, el proceso de síntesis primario es la fotosíntesis y los productos iniciales son los carbohidratos, lípidos y proteínas, cuyas transformaciones dan origen a los procesos metabólicos primarios y secundarios (Waizel, 2006). Los metabolitos primarios son aquellos que requiere la planta para desarrollar funciones esenciales como el crecimiento y desarrollo. Muchas plantas presentan una proporción significativa de carbono y energía, derivados de la fotosíntesis y la respiración, que no juegan un rol importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas, estos compuestos se denominan metabolitos secundarios (Hopkins y Hüner, 2004).

Los metabolitos secundarios son compuestos no esenciales para las funciones principales de las plantas, tienen distribución restringida y son característicos de

los grupos biológicos, como familia, género y aún especie. Son sintetizados por una o mas rutas metabólicas (Waizel, 2006). Los metabolitos secundarios se caracterizan por tener una gran diversidad química (Verpoorte y Alfermann, 2000). Sus procesos sintéticos parecen estar relacionados al mecanismo de evolución de las especies y pocos son los que tienen una función definida conocida en las actividades metabólicas de los organismos. Durante muchos años se consideraban poco frecuentes en las plantas y no utilizados por estas. (Rhodes, 1994). En la Figura 2 se ilustra la relación del metabolismo primario con el metabolismo secundario de las plantas.

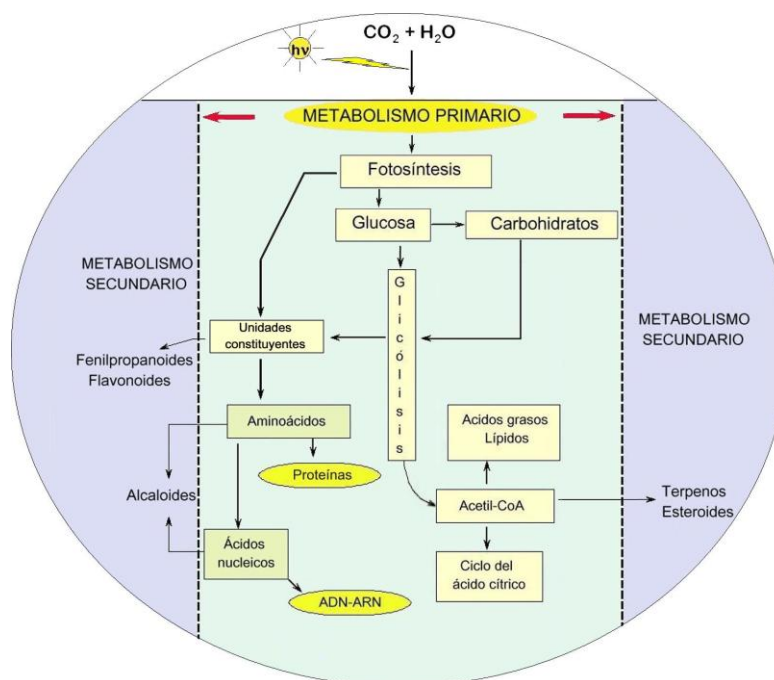


Figura 2. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario de las plantas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009)

La clasificación de los metabolitos secundarios, según Hopkins y Hüner (2004), es la siguiente:

1. Compuestos nitrogenados
2. Terpenoides
3. Compuestos fenólicos

Compuestos nitrogenados

Entre los que se encuentran los alcaloides, que son uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios que se encuentran en la naturaleza. Estos compuestos están contenidos en alrededor del 20 % del total de las especies vegetales (De Luca y Pierre, 2000). En el grupo de los alcaloides se agrupan una gran variedad de sustancias químicas, por lo que estos metabolitos se han estructurado de acuerdo a su origen biogenético. Con base en lo anterior, surge la siguiente clasificación de alcaloides: 1) alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico; 2) alcaloides purínicos; 3) terpenos aminados y 4) alcaloides policétidos (Loyola-Vargas *et al.*, 2004). En la Figura 3 se muestra la estructura química de la cafeína, la cual es un ejemplo muy conocido de los alcaloides.

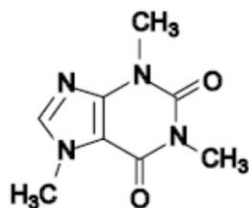


Figura 3 Estructura de la cafeína

Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es dañada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN).

Los glucosinolatos, también llamados glicósidos del aceite de mostaza, se degradan y desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor y el gusto de condimentos como la mostaza y el brócoli.

2.3. Los terpenoides

Los terpenoides son un grupo importante de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, los glicósidos cardíacos y las saponinas. Están formados por unidades de isopreno C5, unidas de manera cabeza-cola. Proviene de la ruta biosintética del mevalonato (Dewick, 2009). Se ha estimado que existen más de 20,000 terpenoides en la naturaleza y se encuentran predominantemente en la cutícula de las plantas (Liby *et al.*, 2007). Los terpenoides son biosintetizados en las plantas por la ciclación del escualeno (Phillips *et al.*, 2006). Estos metabolitos secundarios son utilizados con fines medicinales en muchos países asiáticos por sus efectos antiinflamatorios,

analgésicos, antipiréticos, hepatoprotector, cardiotónico y sedante (Ovensná *et al.*, 2004). Estudios recientes han detectado y confirmado algunas de las propiedades farmacológicas de los triterpenoides como la actividad antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antialérgica y espasmolítica (Shah *et al.*, 2009). Se ha demostrado que un número cada vez mayor de terpenoides exhiben citotoxicidad contra una variedad de células cancerosas sin manifestar ningún tipo de toxicidad en células normales (Setzer y Setzer, 2003).

2.3.1. Estructura de los terpenoides

Los terpenoides son también llamados isoprenoides debido a que el isopreno es su estructura básica. Presentan una gran variedad estructural, derivan de fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos (Figura 4) basadas en la estructura del isopentenilo.

La ruta biogenética se inicia por condensación de dos moléculas de AcCoA, dando acetoacetil-CoA el cual se condensa a su vez con otra molécula de AcCoA originando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Este compuesto se reduce para convertirse en ácido mevalónico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriánico) y posteriormente por fosforilación y descarboxilación, en isopentenilpirofosfato (IPP), el cual, por isomerización da lugar a dimetilalil-pirofosfato (DAMPP), compuesto altamente reactivo (Rohmer *et al.*, 1993).

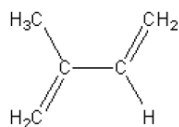


Figura 4. Estructura química del isopreno

La condensación, mediante unión “cabeza-cola” de estos dos últimos compuestos origina el geranil-pirofosfato (GPP) que posee 10 átomos de carbono y es precursor de un gran número de principios activos vegetales como los monoterpenos.

El acoplamiento a este GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco en cinco: sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30) (Hemmerlin *et al.*, 2003).

2.3.2. Clasificación de los terpenoides

Los terpenoides son monómeros considerados como unidades isoprénicas y se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos (C5)_n, llamados hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40). El esculeno y el fitoeno se generan de las combinaciones cola-cola en el centro de la molécula. Los productos que provienen del metabolismo del isopreno incluyen a los terpenos, carotenoides, vitaminas y esteroides.

Desde el punto de vista farmacéutico, los principios activos de naturaleza terpénica con mayor importancia por su uso, son: monoterpenos y sesquiterpenos (aceites esenciales), derivados de monoterpenos (iridoides), lactonas sesquiterpénicas (principios amargos), algunos diterpenos y, por último, triterpenos y esteroides (Dudareva *et al.*, 2005).

2.3.3. Actividad biológica de los terpenos

Existen evidencias en donde se evaluó la actividad antiviral de varios terpenos en líneas celulares de linfocitos T infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (células linfocíticas H9), identificándose para estos metabolitos valores significativos con dosis mínimas inhibitorias que oscilan desde 3.7 hasta 100 µg/mL, permitiendo con ello sugerir su potencial uso farmacológico en la prevención de esta enfermedad. Algunos de los mecanismos de acción antiviral propuestos para los terpenos son: inhibición de la transcriptasa inversa, de las proteasas, inhibición de la α -glucosidasa I, interferencia con el ensamblaje de viriones, entre otras (Macías *et al.*, 2010).

Actualmente es de amplio conocimiento la actividad antimicrobiana que poseen los terpenoides presentes en especies tales como *Menta piperita*, *Orégano* sp., *Salvia fruticosa* (Gokalp *et al.*, 2002; Sivropoulou *et al.*, 1996; Sivropoulou *et al.*, 1997). Investigaciones recientes han mostrado que el sitio de acción de los terpenoides es la membrana celular de los microorganismos y que los mecanismos de acción propuestos varían de acuerdo con el grupo funcional de la molécula de terpenoide aunque la efectividad de los compuestos está muy sujeta a su solubilidad en agua

y a su habilidad para penetrar esa membrana celular. (Griffin, 1979).

Boliver *et al.* (2011), estudiaron la planta *Galium mexicanum*, detectaron actividad citotóxica en células de cáncer de útero, lo cual puede deberse a la presencia de terpenoides.

2.4. Los esteroides

Los esteroides se encuentran en el grupo de los triterpenos y son derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esterol. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, (Figura 5) que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C 22 y C 23. La principal función de los esterol en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y estabilidad (Ávalos y Perez-Urria)

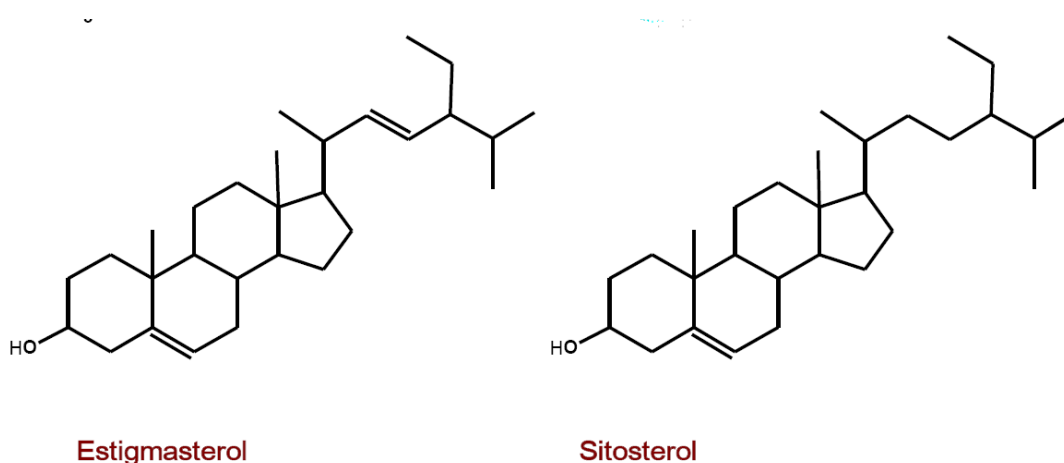


Figura 5 Estructuras químicas de estigmasterol y sitosterol (Ávalos y Perez-Urria)

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de los esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5.

2.4.1. Biogénesis de los esteroides

Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoA (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol. En la biogénesis de los esteroides también están implicados procesos tales como hidrogenaciones y deshidrogenaciones C-C, metilaciones (vía Sadenosilmetionina), hidroxilaciones, etc. En la Figura 6 se muestra la estructura de un colesterol con los átomos de Carbono enumerados.

Un hecho estructural notable es que la gran mayoría de esteroides naturales tienen sustituyentes alquílicos sobre los carbonos 4 y 24 fundamentalmente, y este hecho es justificado por la misma biogénesis.

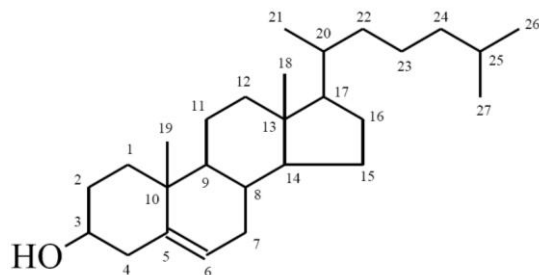


Figura 6. Enumeración de los átomos de carbono en la molécula de colesterol

2.4.2. Actividad biológica de los esteroides

Los esteroides son el grupo mas ampliamente estudiados. Shang et al., (2011) aislaron dos nuevos esteroides del extracto etanólico de *Monascus purpureus*, los cuales mostraron tener actividad citotóxica contra el adenocarcinoma de pulmón (A549) y una actividad moderada contra el cáncer de ovario humano (A2780). Por otro lado, Tian et al., (2011) encontraron seis nuevos esteroides en *Cryptosula pallasiana*, estos mismos compuestos presentaron citotoxicidad moderada contra la línea celular humana de leucemia mieloide (HL-60). Guil-Guerrero et al., (2011) observaron que los extractos de tomate “Racimo” presentaron alta citotoxicidad en células HT-29, debido a la presencia de esteroides.

2.4.2.1. Actividad citotóxica

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado (Repetto, 2002). El ciclo celular tiene como función formar una célula nueva y completa, evitando en lo posible la alteración y creación de células con múltiples errores. Esto le permite al organismo permanecer en un equilibrio constante (Murray, 2004).

En la búsqueda de nuevas sustancias anticancerosas, se ha evaluado el efecto citotóxico de algunos metabolitos secundarios aislados de especies vegetales. En los extractos de las hojas de *Magnolia officinalis* se han realizado recientemente ensayos de proliferación celular *in vitro* con la línea tumoral humana derivada de un carcinoma colorrectal RKO, encontrándose una importante inhibición del

crecimiento de las células tumorales debido a la interrupción del ciclo celular en la fase G1 y una inducción de apoptosis por activación de la cascada de caspasas (Liou *et al.*, 2003). Esta actividad citotóxica esta atribuida al complejo de metabolitos secundarios presentes en las especies, entre los que se encuentran los flavonoides, alcaloides y terpenoides.

Actividad citotóxica

Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) (Fentem, 1994.). A continuación se describen cada uno de estos ensayos.

a) Ensayo de captación del rojo neutro

En este ensayo, la medición de la toxicidad se lleva a cabo en un corto o largo plazo y esta determinada por la liberación de colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular.

El ensayo esta fundamentado en el hecho de considerar que un compuesto es citotóxico independientemente de su mecanismo de acción. Ello conlleva a una reducción de la velocidad de crecimiento celular reflejándose en el número de

células presentes en el cultivo. El índice de toxicidad se determina por el grado de inhibición del crecimiento relacionado con la concentración del compuesto que se evalúa (Reinecke y Helling, 2002; Norton, 2000; Giron *et al.*, 2005; Doillon *et al.*, 2004; Zuang, 2001).

b) Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid

Mediante este ensayo es medido el cambio en el contenido de proteínas totales, lo cual constituye un reflejo de la proliferación celular. Si un compuesto es citotóxico a la célula debe afectar al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular como son: la síntesis del ADN, el adecuado funcionamiento de los organelos como mitocondrias, lisosomas, o producir una afectación de la integridad de la membrana o en la síntesis de proteínas. Al encontrarse afectado el crecimiento celular debe reducirse el número de células presentes en el cultivo tratado con respecto al control, por lo que la medida de la concentración de proteínas presentes en el cultivo constituye un índice de toxicidad. Por lo general se exponen las células al producto que se evalúa durante un período de 72 horas y seguidamente se retira el producto y se exponen las células al colorante, el cual enlaza a las proteínas celulares. Por último se determina la cantidad de azul de kenacid retenido por las células y se cuantifica el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (Lodish *et al.*, 2002)

c) Ensayo de reducción del MTT

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables (Eisenbrand *et al.*, 2002). El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul (Eisenbrand *et al.*, 2002).

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Jiménez *et al.*, 2007)

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190 °C). El período de exposición de la sustancia de ensayo varia, puede ser durante períodos cortos (1-2 h de tratamiento), o largos de 24 ó 72 h. La

absorbancia_{550nm} se debe medirla al concluir el tiempo de incubación y utilizando un filtro de 620 nm como referencia (Jiménez *et al.*, 2007).

Si se alcanzan concentración de 1000 µg/mL y no se observa toxicidad, entonces resulta necesario aumentar el rango de concentraciones hasta 100 000 µg/mL o hasta la máxima concentración soluble del compuesto en el medio. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo (Jiménez *et al.*, 2007).

Los resultados se expresan como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% = (\text{Absorbancia}_{550\text{nm}} \text{ del tratamiento} \times 100) / \text{Absorbancia}_{550\text{nm}} \text{ del control}$$

La curva dosis respuesta debe ser calculada teniendo en cuenta el rango de concentración utilizado y el porcentaje de reducción del crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se calcula la concentración que produce la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

2.5. Los compuestos fenólicos

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas como fenoles, glucósidos, alcaloides y terpenoides entre otros, como consecuencia de su metabolismo secundario.

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan en diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente (Waitzel, 2006).

Los compuestos fenólicos incluyen cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos. Están distribuidos en todas las plantas y en su origen biogenético tienen la unidad C6-C3. Estos ácidos son derivados hidroxilados del ácido benzoico y se pueden encontrar en forma libre o conjugada. También son comunes los aldehídos derivados de estos ácidos la vainillina, anisaldehído o salicilaldehído. Están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Robbins, 2003; Kähkönen *et al.*, 2001).

2.5.1. Estructuras de los compuestos fenólicos

El grupo de los fenólicos comprende aproximadamente 8,000 compuestos que aparecen en la naturaleza y poseen una estructura común: un anillo fenólicos es decir, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Bravo, 1998). Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del mevalonato es posible pero menos común. (Figura 7).

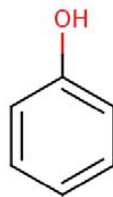


Figura 7. Estructura química de un fenol

2.5.2. Clasificación de los compuestos fenólicos

Una de las clasificaciones mas utilizadas es la propuesta por Harborne *et al.* (1989), que agrupa a los fenoles en diez clases, dependiendo de su estructura química básica y se describen a continuación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica (Harborne, 1989).

Número de átomos de carbono	Esqueleto	Clase
6	C ₆	Fenoles simples, Benzoquinonas
7	C ₆ – C ₁	Ácidos fenólicos
9	C ₆ – C ₃	Acidohidroxicinámico, cromonas, coumarinas, isocoumarinas, polipropenos
13	C ₆ – C ₁ – C ₆	Xantonas
14	C ₆ – C ₂ – C ₆	Estilbenos, atnraquinonas
15	C ₆ – C ₃ – C ₆	Flavonoides, Isoflavonoides
18	(C ₆ – C ₃) ₂	Lignanos, neolignanos
30	(C ₆ – C ₁ – C ₆) ₂	Biflavonoides
n	(C ₆ – C ₃) ₂	Ligninas
	(C ₆ – C ₃ – C ₆) _n	(Taninos condensados)

Los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples, como los ácidos benzoicos que forman polímeros complejos, hasta los taninos condensados. Cada una de las familias agrupa un número de compuestos fenólicos más o menos variado.

2.5.3. Identificación de los compuestos fenólicos

La identificación de los componentes fenólicos ha despertado un gran interés por su importancia en medicina y alimentación, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de alimentos y plantas. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de desarrollar técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Martínez-Valverde y Periago, 2000).

Dentro de las técnicas analíticas para la identificación y/o cuantificación de compuestos fenólicos se encuentran las técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía de gases (CG) y la de líquidos de alta resolución (HPLC), (Escarpa y González, 2001); también se encuentran las técnicas espectrofotométricas (Martínez-Valverde y Periago, 2000).

Técnicas espectrofotométricas

Los métodos espectrofotométricos no son nuevos en el campo de la química analítica y hasta hoy en día son usados frecuentemente para la determinación de fenólicos (Escarpa y González, 2001). Entre este tipo de técnicas, destaca el

ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas (Martínez-Valverde y Periago, 2000) y el ensayo de Folin- Ciocalteu para la cuantificación de fenóles totales, esta técnica llegó a ser la mas utilizada para determinar de manera cuantitativa a los fenoles. Este método consiste básicamente en generar cierto color a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra. Swain y Goldstein (1964), revisaron diversos métodos espectrofotométricos, y con base en esta revisión recomendaron el ensayo de Folin-Ciocalteu como el reactivo más conveniente para la determinación espectrofotométrica de fenoles totales (Escarpa y González, 2001).

2.5.4. Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentan acción moluscicida, antihelmíntica, antihepatotóxica, antiinflamatoria, antidiarreica, antiúlceras, antiviral, antialérgica y vasodilatadora (Muñoz y Ramos, 2007). Se ha verificado que los compuestos fenólicos inhiben la replicación del *virus de la inmunodeficiencia Humana* (HIV) y del *virus simplex humano* (HSV), inhiben la glucosil transferasa del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autooxidación del ascorbato, también inhiben la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es la base de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienviejecimiento (Velioglu *et al.*, 1998; Proestos *et al.*, 2005).

Las plantas utilizadas para realzar y complementar los sabores de los alimentos son fuentes de compuestos fenólicos; el consumo de vegetales está asociado con una baja incidencia de cáncer y baja mortalidad por esta misma enfermedad (Zheng y Wang, 2001).

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticáncer, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, cicloxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria (Siddhuraju y Becker, 2003).

2.6. Los compuestos flavonoides

Dentro de los compuestos fenólicos de las plantas, el grupo más abundante son los flavonoides (latín *flavus*: amarillo). Comprenden alrededor de 4,000 compuestos identificados (Vinson y Hontz, 1995). La identificación de flavonoides ha sido relevante en la quimiotaxonomía, ya que provee de marcadores útiles para diferenciar especies a nivel de familia y géneros (Singh *et al.*, 1991).

Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, que se originan mediante una ruta biosintética mixta (a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos). Presenta una estructura base que es un esqueleto C6-C3-C6, en donde los átomos de carbono en los anillos A y C se enumeran desde el número 2 al 8, mientras que los del anillo B van desde el 2' al 6'. Esta estructura base puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser solubles en agua (Harborne y Williams, 2000).

Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo, además sirven como atrayentes de los polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores (Winkel-Shirley, 2001).

2.6.1. Estructura de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos

de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. (López, 2002) (Figura 8).

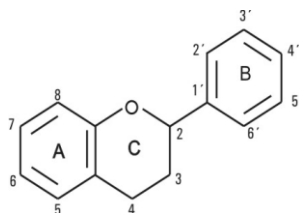


Figura 8. Estructura básica de los flavonoides

2.6.2. Clasificación de flavonoides

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Martínez-Flores *et al.*, 2002). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanoles: posee un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

En la Figura 9 se muestran algunas estructuras químicas de los flavonoides.

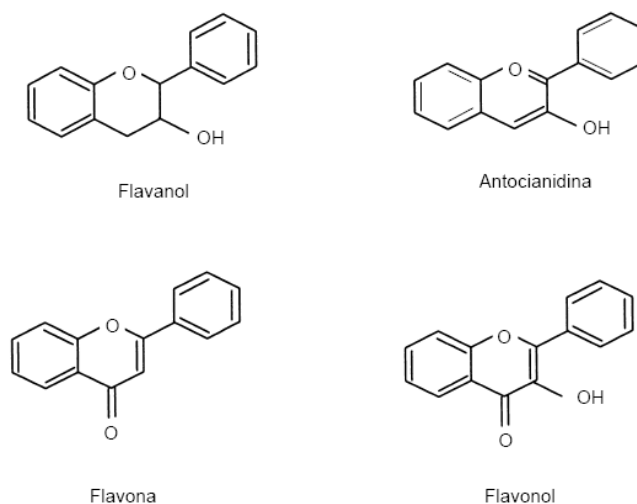


Figura 9. Estructura de los Flavonoides.

2.6.3. Identificación de flavonoides

Los flavonoides se pueden identificar con métodos cromatográficos y espectrofotométricos, a partir de pequeñas muestras de material fresco e incluso de plantas conservadas en herbarios (Harborne, 1972). El estudio de los flavonoides en los frutos tiene gran interés debido a que estas sustancias influyen en sus caracteres organolépticos: color, sabor y textura (Winkel-Shirley, 2001).

Se han utilizados diversas técnicas analíticas para la identificación de flavonoides entre las que se pueden mencionar la espectrometría de masas (MS), la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de líquidos (LC), electroforesis (CE) y la combinación de algunas de estas como cromatografía de líquidos con la de resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masas (EM). El impacto de este tipo de técnicas en la fitoquímica ha sido enorme ya que proporcionan la información estructural de los componentes que se encuentran en

los extractos de las plantas (Stobiecki, 2001). La identificación de flavonoides es importante para los estudios fitoquímicos en los que la presencia y tipo de compuestos son específicos en los grupos taxonómicos.

2.6.4. Actividad biológica de los flavonoides

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, anti inflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora (Yen *et al.*, 1993; Siddhuraju y Becker, 2003).

Los flavonoides provenientes de verduras y frutas consumidos en la dieta están inversamente relacionados con la mortalidad causada por la enfermedad coronaria. Se ha demostrado que los flavonoides del vino tinto presentan fuerte actividad de inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (por sus siglas en ingles *Low density lipoprotein* LDL); *in vitro* e *in vivo* reducen la agregación de las plaquetas y esto se asocia con la reducción de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Se ha probado que existe una relación entre el incremento de la ingesta de antioxidantes en la dieta, así como de vitaminas C y E, y β -caroteno y la prevención de enfermedades coronarias. (Robbins, 2003; Hertog *et al.*, 1993).

Los cítricos contienen flavonoides en forma de flavonas polimetoxiladas y flavanonas glicosiladas. Éstas presentan propiedades anticancerígenas,

antivirales, antiinflamatorias, evitan la fragilidad capilar y tienen la capacidad de inhibir la agregación de las plaquetas humanas (Bocco *et al.*, 1998).

Los flavonoides están entre los más potentes antioxidantes de las plantas, debido a que poseen uno ó más de los siguientes componentes estructurales que están involucrados en la actividad antirradical o antioxidante: un grupo o-difenol en el anillo B, un doble enlace conjugado en 2-3, con una función oxo en el C₄ y grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (Velioglu *et al.*, 1998; Siddhuraju and Becker, 2003).

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular.

2.6.4.1. Actividad antioxidante

Los radicales libres son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad (Halliwell y Gutterioge, 1999; Basaga, 1989). Estas partículas, altamente reactivas, pueden activar toda una serie de reacciones en cadenas, capaces de dañar fibras de colágeno, membranas celulares, estructuras nucleares, etcétera. También promueven la permeabilidad vascular y activan a una gran cantidad de sustancias que atraen

neutrófilos, lo que desencadena la infiltración por los mismos en el músculo esquelético, originando una respuesta inflamatoria (Clarkson y Thompson, 2000).

Los antioxidantes son sustancias que reducen el daño oxidativo creado por los radicales libres. Este sistema defensivo incluye antioxidantes endógenos como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatiónperoxidasa (GPX) y glutatión (GSSH) y antioxidantes exógenos como la vitamina E (α tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), coenzima Q10 y β -carotenos (provitamina A), que ejercen cada uno su propio efecto protector (Knez *et al.*, 2006)

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano (Namiki, 1990).

Gordon (1990) da una clasificación de los antioxidantes, menciona que hay dos tipos principales de antioxidantes, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el "secundario" o "preventivo". Los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", y la eliminación de oxígeno singulete (Chipault, 1962).

Aproximadamente dos terceras partes del grupo de los compuestos fenólicos son consumidos en la dieta humana, en este grupo están incluidos principalmente los flavonoides. El rango de consumo es de 25 mg a 1g de compuestos fenólicos por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias) (Robbins, 2003; Hagerman *et al.*, 1998).

Las frutas como arándanos (*Vaccinium myrtillus*), cassis ó corintos negros (*Ribes nigrum*), grosella (*Ribes grossularia*), frambuesa (*Rubus idaeus*), corintos rojos (*Ribes rubrum*) y fresa (*Fragaria x ananassa*) son una fuente importante de antioxidantes en la dieta. En estas frutas se encuentran presentes derivados de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, antocianos, flavonoles, catequinas y taninos (hidrolizables y condensados). Muchos de estos compuestos exhiben una variedad de efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y acciones vasodilatadoras. Los extractos de las frutas antes mencionadas resultaron altamente antioxidantes, inhibieron la formación de hidroperóxidos en metil linoleato y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de los liposomas. También tienen capacidad para capturar especies reactivas del oxígeno generadas químicamente (Kähkönen *et al.*, 2001).

La presencia de compuestos fenólicos le confieren alta actividad antioxidante a los bebidas de café, cacao, te verde y te negro. La composición química de dichas bebidas son principalmente epicatequinas, taninos, catequinas, procianidinas, antocianinas, ácido clorogénico y ácido caféico (Ricchelle *et al.*, 2001).

El té verde contiene 30 a 42 % de catequinas sobre la masa total seca, mientras que el té negro contiene 3 al 10 % y el té Oolong, semifermentado, contiene de 8 a 20 % de catequina. Los extractos de té verde tienen fuerte acción antioxidante, debida a la presencia de catequina, epigallocatequin-galato, epicatequingalato, epigallocatequina y epicatequina. El extracto crudo de té verde tiene mayor actividad antioxidante que una mezcla de catequina reconstituida. Las propiedades antioxidantes del té verde parecen explicar la acción antimutagénica. El té verde no fermentado tiene un poder antioxidante superior al del té negro fermentado (Roedig-Penman y Gordon, 1997; Vinson y Hontz, 1995; Yen y Chen, 1995; Benzie y Szeto, 1999).

Los compuestos fenólicos también se encuentran presentes en otros alimentos, como el chocolate. Los granos de cacao no fermentados son ricos en fenoles, los cuales comprenden del 12 al 18% del peso seco total del grano entero. Los compuestos fenólicos en cacao, particularmente flavonoides, son catequinas, procianidinas y antocianidinas. Luego de la fermentación y el secado, los flavonoides sufren una variedad de reacciones de oxidación y polimerización que originan taninos.

Existe una correlación en forma directa entre el contenido de procianidinas de las muestras de cacao y su potencial antioxidante. Las muestras que han fermentado más intensamente tienen menor poder antioxidante y menor contenido de procianidina (Adamson *et al.*, 1999).

Las semillas y cáscaras de trigo sarraceno, lino, semillas y cáscaras de girasol, raíces de ginseng, raíces y flores de *Echinacea* sp, pulpa de las papas, arándanos, cerezas, hojas de cebolla morada, raíces y aceite de rábano picante y trigo fueron estudiadas en cuanto a su actividad antioxidante. Se detectó una correlación directa entre concentración fenólica y actividad antioxidante de las especies antes mencionadas (Velioglu *et al.*, 1998).

En plantas como salvia, tomillo, ginkgo biloba, menta, artemisia, aloe, valeriana, cebollín, diente de león, eneldo, lavanda, hinojo, orégano, mejorana, melisa, perejil, romero, albahaca, laurel, sauco, cilantro, perejil, azafrán, manzanilla y tila, se estudió el poder antioxidante y la composición de compuestos fenólicos. Cada especie tiene una composición fenólica diferente, y el poder antioxidante de cada uno de estos compuestos también es diferente. La actividad antioxidante de los flavonoides se incrementa con el número de grupos hidroxilo sustituyentes del anillo B, específicamente en el C-3'. Existe una correlación lineal positiva entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de las plantas (Proestos *et al.*, 2005).

Capacidad antioxidante total

La actividad antioxidante es ampliamente utilizada para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación, involucrando especies reactivas del oxígeno. Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras

biológicas. Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos (Clarkson y Thompson, 2000).

Un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro* no existe, debido a que la actividad anti-radicalaria depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. La elección de un sistema químico para generar especies reactivas es un punto crítico en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante con el fin de obtener resultados relevantes (Aruoma, 2003).

Se han desarrollado varios métodos espectrofotométricos para la determinación del potencial antioxidante de diferentes sistemas bioquímicos. Estos métodos son de rápida aplicación, escasa manipulación de material biológico y bajas necesidades instrumentales, por lo que su aplicación es sencilla. La eficacia antioxidante de las muestras ensayadas se compara con patrones conocidos como ácido ascórbico o Trolox capacidad antioxidante equivalente (Huang *et al.*, 2005). Estos ensayos se pueden diferenciar por la forma en que interactúan los reactivos. Algunos utilizan el retraso en la oxidación (fase lag) como parámetro de la actividad antioxidante, otros analizan la capacidad de captación del radical libre, reducción del ion metálico o catión radical (Arnao *et al.*, 1999).

La actividad antioxidante de un compuesto puede evaluarse *in vitro* por medio de experimentos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas.

Los resultados de los ensayos *in vitro* pueden usarse como un indicador directo de la actividad antioxidante *in vivo*; un compuesto que es poco efectivo *in vitro*, no será mejor *in vivo* (Aruoma *et al.*, 1997). Estos ensayos también pueden alertar sobre posibles efectos dañinos de los compuestos químicos. La mayoría de los métodos para determinar actividad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema lipídico, usualmente por calentamiento y monitoreo del consumo de oxígeno, la pérdida de sustrato o bien la formación de producto. Debido a que muchos factores pueden afectar la oxidación, incluyendo la temperatura, la presión de oxígeno y catalizadores metálicos; los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones de oxidación empleadas. Los ensayos que miden sustratos o productos, también pueden dar resultados variables dependiendo de su especificidad (Fukumto y Mazza, 2000).

Los siguientes son ejemplos de los modelos *in vitro* más frecuentemente usados para la evaluación de la actividad antioxidante total.

- a) Ensayo FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power). Consiste en la reducción de un compuesto o mezcla de compuestos sobre el Fe^{+3} presente en el complejo orgánico Tripyridyltriazina (TPTZ). Cuando el hierro del complejo es reducido a la forma ferrosa toma un color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm y cuya intensidad de color es proporcional a la capacidad reductora de los compuestos ensayados (Benzie y Strain, 1996).

- b) Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Éste método determina en forma directa la capacidad antioxidante hidrofílica frente a una fuente radicalaria. Es una metodología en donde se utiliza la proteína fluorescente ficoeritrina como sustrato oxidable y 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) como generador de radicales peroxilo o el sistema $\text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ como generador de radical hidroxilo. Este método registra la acción de la especie radicalaria hasta el final y usa el área bajo la curva (ABC) de decaimiento de fluorescencia para realizar la cuantificación de la capacidad antioxidante (Cao *et al.*, 1996).
- c) Método del 6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina (ABTS) o método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay). El radical $\text{ABTS}^{•+}$ se obtiene tras la reacción de ABTS con persulfato potásico incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad. Las muestras se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0 - 15 μM en etanol, en las mismas condiciones. Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C). El método ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también eletroquímica. El método tiene como ventajas que se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica; y además, su espectro presenta máximos

de absorbancia de 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Re *et al.*, 1999).

- d) Método del N, N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD). El método DMPD se basa en añadir 1 mL de la disolución de DMPD 100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD^{•+}). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90, a 506 nm. Se añade 50 µL de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o µM) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g). La desventaja de éste método es que solo se pueden analizar muestras en medio acuoso, y su espectro de absorbancia es de 505nm (Fogliano *et al.*, 1999).
- e) Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]). La forma de evaluación es: EC50 ó IC50 (Brand-Williams *et al.*, 1995).

A continuación se describe el método utilizado en el presente trabajo:

Método del DPPH

Brand-Williams *et al.*, (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) en una solución metanólica. La reducción del DPPH[•] se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH[•] absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH[•] proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación (Figura 10):

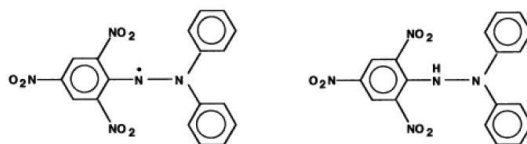
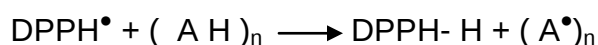


Figura 10. Estructura de DPPH, derecha radical libre, izquierda no radical

Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A[•]) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH[•] y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas.

OBJETIVOS

1. Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, así como, identificar las estructuras de los flavonoides en hoja de *Calia secundiflora*.
2. Evaluar el potencial antioxidante de los flavonoides.
3. Determinar la presencia de compuestos terpenoides (esteroles) y evaluar la actividad citotóxica de las hojas y semillas de *C. secundiflora* recolectadas en los estados de Hidalgo y Querétaro, mediante un estudio primero con *Artemia salina* y posteriormente con células HeLa.

HIPÓTESIS

- La presencia de fenoles y flavonoides permiten inferir actividad antioxidante.
- Existe una relación entre la actividad citotóxica y la presencia metabolitos secundarios como compuestos terpenoides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolecta del material vegetal

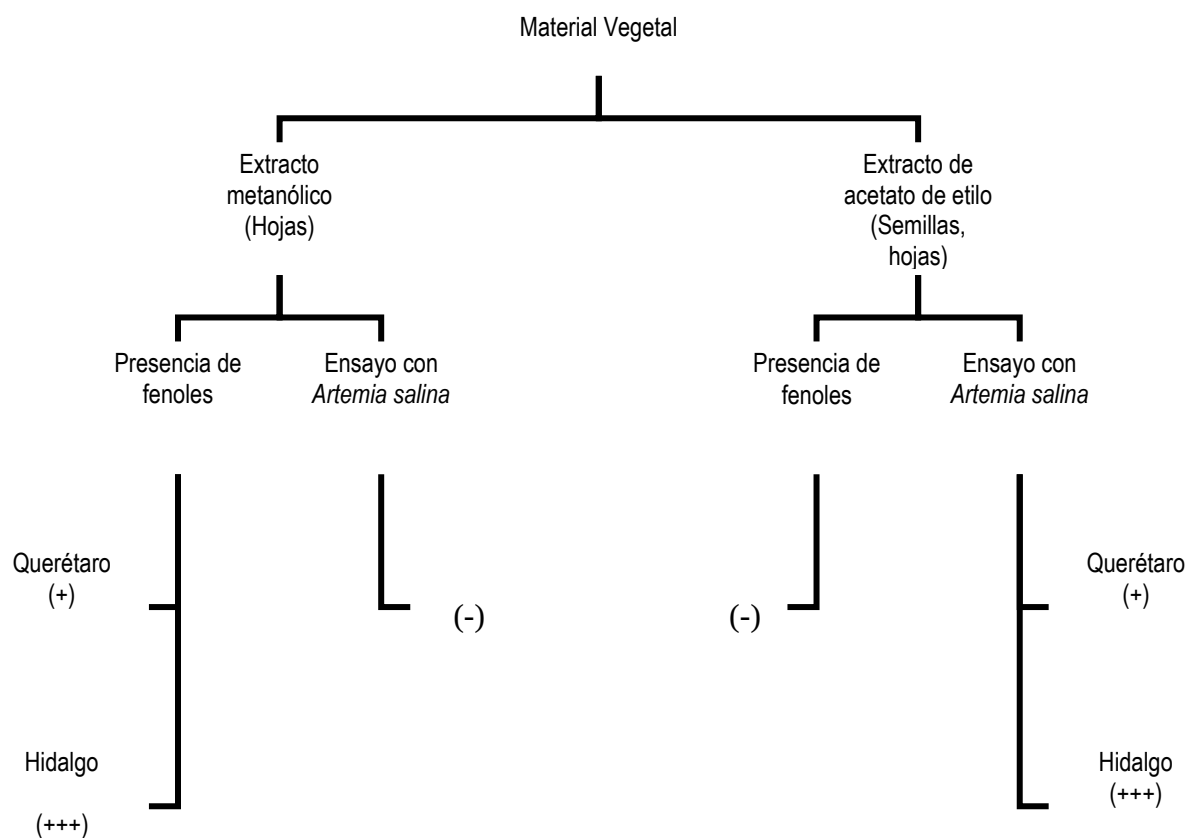
El material vegetal (hojas y semillas) se recolectó aleatoriamente en los estados de Hidalgo y Querétaro. Se eligieron ejemplares adultos, en etapa de floración (abril de 2007). La primera población de plantas se ubicó en el transecto El Cardonal–Santuario, Municipio El Cardonal, estado de Hidalgo, entre laderas con exposición al SSE y SE con pendiente de 40° , en las coordenadas 20° 36' N y 99° 07' W, a 2130 msnm; el clima es seco, predominantemente. La segunda población de plantas se ubicó en el transecto Vizarrón del Monte-San Joaquín, en el municipio de Cadereyta, estado de Querétaro, se encuentra situado entre laderas (pendiente de 45°), con exposición al SE; a 2070 msnm, en las coordenadas 20° 41'N y 99°49' S, el clima es semiseco.

Se prepararon dos ejemplares de herbario, que fueron identificados por el Dr. Mario Sousa, del Instituto de Biología de Universidad Nacional Autónoma de México, y fueron depositados en el Herbario Nacional (MEXU) bajo el número de registro 1155623 y 1155624.

3.2. Estudio preliminar de compuestos fenólicos y terpenoides

Por separado, se obtuvieron extractos metanólico y de acetato de etilo de hojas y semillas de las plantas recolectadas en las localidades de Cardonal, Hgo., y Cadereyta, Qro. Se realizaron dos placas en cromatografía en capa fina, en donde se aplicaron pequeñas cantidades de los extractos para determinar la presencia

de compuestos fenólicos y terpenoides. En la primer placa se aplicaron los extractos metanólicos, el medio de elución utilizado fue BAW (butanol: ácido acético: agua 4:1:5, v/v), y se reveló con los reactivos NP (ácido 2-amino etil éster difenilbórico al 1 % en metanol, p/v) y PEG (polietilenglicol 4 000 al 5 % en metanol, p/v), específicos para compuestos fenólicos. Para la segunda placa se aplicaron extractos de acetato de etilo junto con un estándar (β -sitosterol) y se utilizó como medio de elución el tolueno: acetato de etilo (93:7, v/v), y los reveladores fueron vainillina (1 % en etanol, p/v) y ácido sulfúrico (10 % en etanol, v/v), específicos para compuestos terpenoides. Se realizó un ensayo preliminar de los cuatro extractos con el crustáceo *Artemia salina*, organismo ampliamente utilizado para pruebas de toxicidad. La Figura 11 muestra el diagrama de flujo para el estudio preliminar de los extractos obtenidos.



+: Indica presencia del compuesto; +++: mayor presencia; -: Ausencia del compuesto

Figura 11. Diagrama de flujo para la extracción de metabolitos secundarios de *C. secundiflora*.

3.3.1. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

3.3.1.1. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

Se pesó 1g de hoja molida y seca y se maceró en 25 mL de etanol al 95 %.

Después de 24 h, debido a la pérdida de disolvente, nuevamente se ajustó el volumen a 25 mL con etanol al 80 %, se centrifugó la mezcla a 2000 rpm.

Cuantificación de fenoles totales

Se cuantificó el contenido de fenoles totales de acuerdo al método propuesto por Waterman y Mole (1994). Se tomaron 0.5 mL del sobrenadante del extracto etanólico preparado anteriormente, se adicionaron 10 mL de una solución de Na_2CO_3 al 10 %, se homogenizó e incubó la mezcla a 38 °C por 15 min. Se tomó 1 mL de la mezcla, se le adicionaron 3 mL de agua y 1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu: agua (1:1). La mezcla se dejó reposar por 15 min en la oscuridad. Finalmente, se tomó lectura de la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro. La concentración se obtuvo a partir de una curva patrón a base de fenol de 0.02 a 1 mg/mL. Los análisis se realizaron por triplicado.

Cuantificación de flavonoides totales

Se tomó una alícuota de 0.5 mL del sobrenadante del extracto etanólico preparado anteriormente, se le agregaron 1.5 mL de etanol al 95 %, 0.1 mL de una solución de AlCl_3 al 10 %, 0.1 mL de solución de acetato de potasio 1 M y 2.8 mL de agua destilada. Se incubó la mezcla por 30 min. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Genesis 10s a una longitud de onda 415 nm. Para la cuantificación se realizó una curva patrón a base de quercetina 0.02 a 1 mg/mL 0.02 a 1 mg/mL (Chang *et al.*, 2002).

3.3.1.2. Separación de flavonoides

Las hojas de *Calia secundiflora* se secaron a temperatura ambiente durante tres semanas, posteriormente, en una estufa a 45° C por 24 h. Después se molieron en un molino Thomas-Wiley con un tamiz de molido del número 2. Las hojas molidas

se dejaron con metanol en maceración durante 48 h. La Figura 12 muestra el diagrama de flujo del proceso que se le siguió al extracto metanólico.

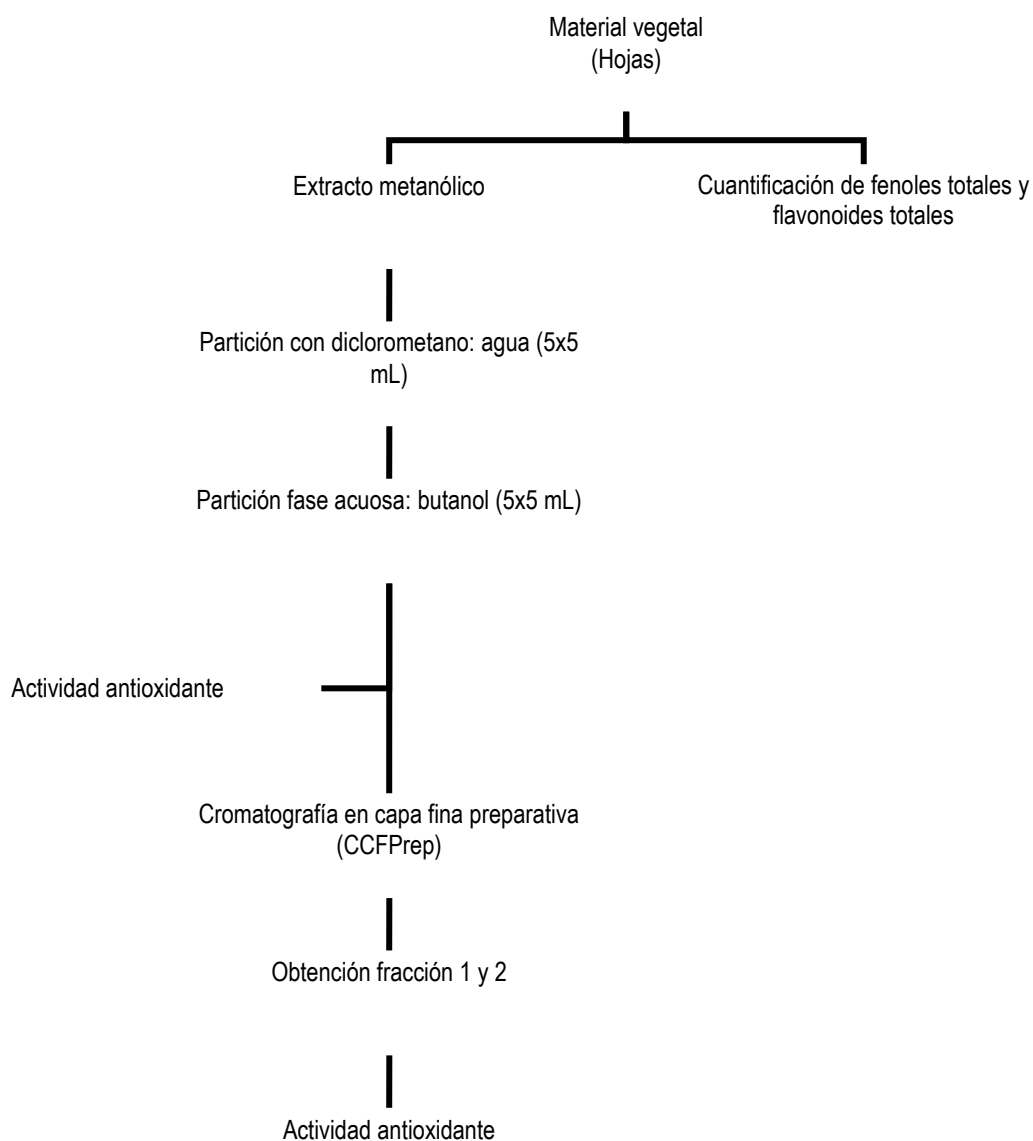


Figura 12. Diagrama del proceso del extracto metanólico de *C. secundiflora*

Obtención del extracto butanólico por partición

El material vegetal (1 kg) se sometió a un proceso de extracciones exhaustivas (3 x 48h) con metanol, seguido de una decantación del disolvente, el cual se concentró a sequedad mediante vacío en un rotaevaporador Büchi R-210 a 45 °C. Se tomaron 5 g del extracto anterior para hacer una partición con diclorometano: agua (5 X 5 mL). A la fase acuosa se le realizó una partición con butanol (5 X 5 mL) (Figura 13). La porción butanólica se concentró a sequedad mediante vacío.



Figura 13. Partición del extracto metanólico con diclorometano: agua y, posteriormente, con butanol.

Se realizó un monitoreo de los flavonoides de los extractos metanólico y butanólico por cromatografía en capa fina en gel de sílice 60 F254 (Merck), como eluyente se utilizó una mezcla de butanol: ácido acético: agua (BAW) en una proporción de 40:10:50 % v/v, las placas cromatográficas se revelaron por aspersión sucesiva de los reactivos NP (ácido 2-amino etil éster difenilbórico al 1 % en metanol, p/v) y PEG (polietilenglicol 4 000 al 5 % en metanol, p/v). Las placas se visualizaron a una longitud de onda larga (365 nm). Se observó una fluorescencia color anaranjado (Wagner y Bladt, 1996).

Fraccionamiento del extracto butanólico por cromatografía en capa fina preparativa

Se aplicaron 20 mg del extracto butanólico en cada placa preparativa de gel de sílice 60 (Merck) de 2 mm de grosor (Figura 14). Como eluyente se utilizó una mezcla de BAW en la proporción 40:10:50 (% v/v). Las placas se visualizaron con luz UV a 365 nm y se reveló solo un extremo con el reactivo NP al 1 % y PEG al 5 % en metanol (Wagner y Bladt, 1996). Se identificaron dos flavonoides (fracción 1 y 2) de color anaranjado, las cuales se rasparon y con la adición de metanol se extrajeron los componentes de cada banda. Se obtuvieron dos fracciones (1 y 2) y se llevaron a sequedad mediante vacío.



Aplicación del extracto butanólico

Figura 14. Cromatografía en capa fina preparativa con el extracto butanólico.

3.3.1.3. Identificación de flavonoides por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM)

La identificación de flavonoides se efectuó en un cromatógrafo de líquidos (CL) modelo Waters LC600 acoplado a un espectrómetro de masas. Se utilizó una columna C18 Phenomex Luna (150 mm x 4.6 mm de d.i. y tamaño de partícula de

5 μm). Como fase móvil se empleó un gradiente de elución para la mezcla metanol / agua / ACN + ácido fórmico 1 %: 0:90:10 (0'); 40:50:10 (30'); 40:50:10 (40'); 90:0:10 (45'); 90:0:10 (47'); 0:90:10 (55'), velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 μL . Para el detector del espectrómetro de masas se utilizó una trampa de iones cuadrupolo (Finnigan LCQ, Hemmel Hempstead, U.K) acoplado con una fuente iónica APCI. La temperatura de vaporización fue de 550 °C, y la de calentamiento de la columna capilar fue de 150 °C. Se utilizó una corriente de nitrógeno y un flujo auxiliar del mismo gas a 80 y 10 unidades, respectivamente. La identificación de los flavonoides en las fracciones estudiadas (1 y 2) se llevó a cabo por comparación con muestras auténticas y por cotejo con la biblioteca de espectros del equipo (Cuychens y Claeys, 2004).

3.3.1.4. Actividad antioxidante del extracto metanólico y butanólico

La prueba seleccionada para el estudio de la actividad antioxidante en *Calia secundiflora* fue la del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH).

El fundamento de esta técnica consiste en la medición a 516 nm de la reducción del radical estable DPPH[·]. La absorbancia característica de este radical, que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (AH) u otro radical (R[·]). Por tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen algunos compuestos mediante la determinación del grado de pérdida de color que provocan a una disolución metanólica de DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

El análisis se realizó mediante el método del radical libre DPPH, descrito por Liu *et al.* (2009). La capacidad antioxidante de las muestras fue monitoreada a 516 nm por el cambio de coloración gradual del DPPH (púrpura) a DPPH-reducido (amarillo) (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Cotelle *et al.*, 1996).

Se preparó una solución de DPPH 0.1mM (2,2-difenil-1-picrilhidracil). Los extractos metanólico, butanólico y las fracciones **1** y **2**, se diluyeron con metanol para obtener las concentraciones de 0.2, 0.15, 0.1, 0.05 mg mL⁻¹. A cada concentración de los extractos (1 mL) y de las fracciones (1 mL) se le adicionaron 3 mL de la solución de DPPH (0.1 mM), se mezclaron separadamente. Se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se realizaron las lecturas de absorbancia a 516 nm. Se determinó el porcentaje de DPPH remanente mediante la fórmula:

$$\% \text{ DPPH} = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) * 100 / A_{\text{control}}$$

En donde A_{control} es la absorbancia del control (DPPH 0.1mM), A_{muestra} es la absorbancia obtenida después de 30 minutos de cada muestra con DPPH 0.1mM. La actividad antioxidante de las muestras se determinó mediante el cálculo de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀), que es la concentración requerida por la muestra para disminuir la absorbancia ₅₁₆ del DPPH al 50 %. La baja absorbancia de la mezcla de reacción indicó alta actividad antioxidante.

Para la determinación de la cinética de reacción de los extractos y de las fracciones **1** y **2** con el DPPH remanente se siguió el método modificado de Sánchez-Moreno *et al.* (1998). Se preparó separadamente una solución de cada muestra (1 mg mL^{-1} en metanol), de donde se tomó 0.1 mL de la mezcla y se adicionaron 3.9 mL de la solución de DPPH ($5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de metanol). Posteriormente, se midieron las absorbancias del DPPH a partir del tiempo cero ($\text{DPPH}_{t=0}$) con intervalos de 30 seg hasta concluir los 30 min (DPPH_{rem}) en un espectrofotómetro Genesis 10s, a una longitud de onda de 516 nm para calcular el DPPH remanente en el medio de reacción. Cada lectura se realizó por triplicado y como blanco se uso metanol. La concentración de DPPH_{rem} se calculó a partir de la ecuación:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{rem}} = 100 \times (\text{DPPH})_{\text{rem}} / (\text{DPPH})_{T=0}$$

3.3.2. Estudio del extracto de acetato de etilo y actividad citotóxica

En el análisis preliminar, el extracto de acetato de etilo mostró prueba positiva ante el crustáceo *Artemia salina*, mientras que, el extracto metanólico presentó prueba negativa ante el mismo organismo. El diagrama de flujo (Figura 15) muestra el procedimiento que se siguió para evaluar la actividad citotóxica al extracto de acetato de etilo.

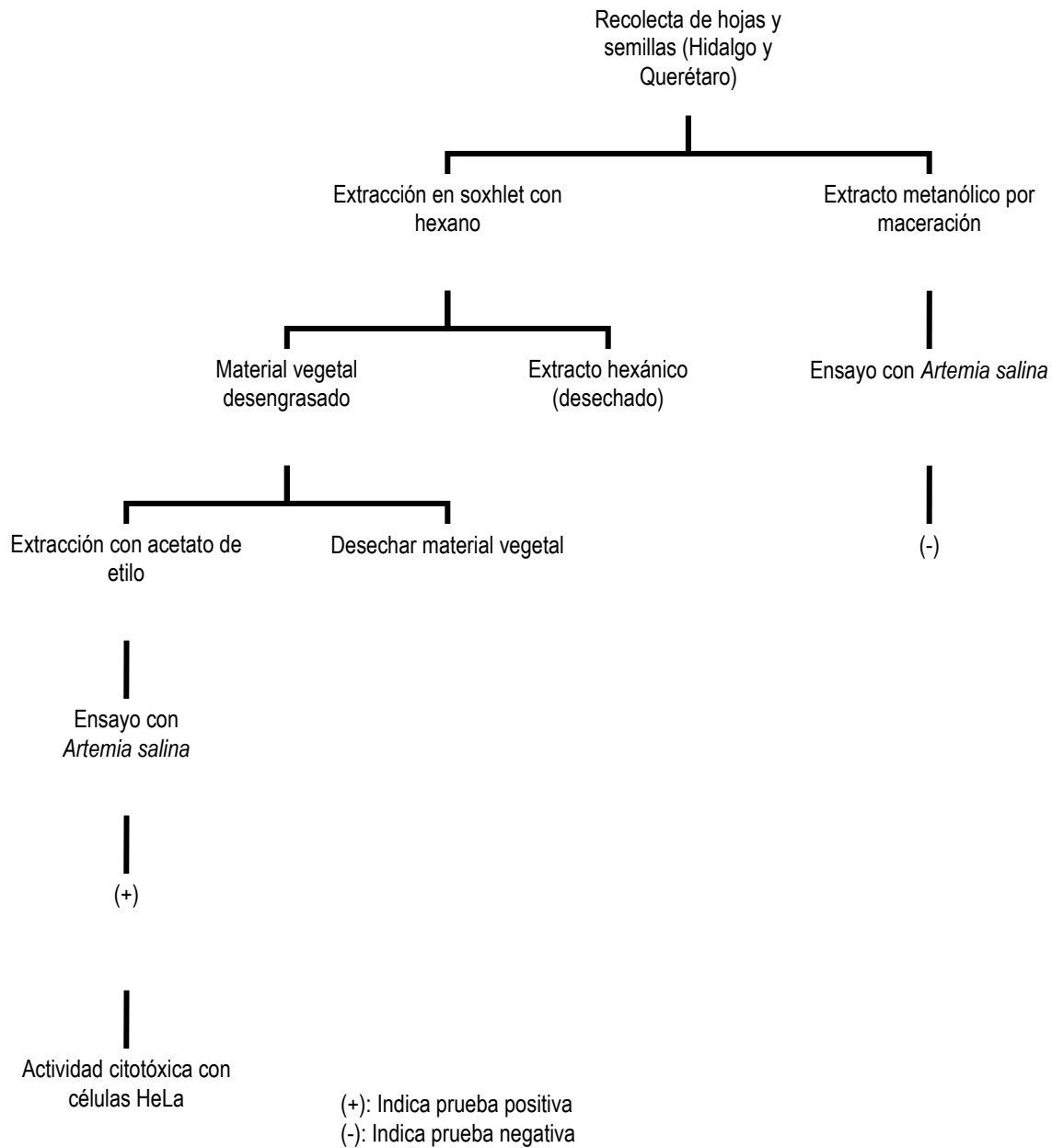


Figura 15. Diagrama de flujo para evaluar actividad citotóxica en células HeLa.

3.3.2.1. Determinación de la Concentración Letal media (CL₅₀) sobre *Artemia salina*

El material vegetal (80 g de semilla y 50 g de hoja molida), seco y molido, se sometió a un proceso de extracciones exhaustivas en equipo soxhlet con acetato

de etilo durante 48 h. El extracto obtenido se concentró a sequedad mediante vacío en un rotaevaporador Büchi R-210 a 45 °C.

Incubación de quistes de Artemia salina y preparación de los extractos.

Para obtener las larvas de *A. salina* (Figura 16) se agregaron 100 mg de quistes por cada litro de solución de sal marina al 3.8% en agua destilada previamente oxigenada a 25 ° C, durante 24 h.



Figura 16. Obtención de nauplios de *Artemia salina* en solución salina

Por serapado, se tomaron 20 g del extracto de acetato de etilo de hojas y semillas de *Calia secundiflora*, y se disolvieron en 2 mL de acetato de etilo. Con el extracto anterior se realizaron diluciones de 500, 50 y 5 µl de cada extracto y se transfirieron a viales, para obtener concentraciones final de 1000, 100 y 10 ppm con un blanco donde solo se le adicionó solución salina. A cada vial se le adicionaron 20 nauplios y se aforó cada uno a 5 mL con solución salina al 3.8 %, todos los ensayos se realizaron por triplicado. Después de 24 h se realizaron las lecturas del número de nauplios muertos (Figura 17).



Figura 17. Incubación de los crustáceos con el extracto acetato de etilo.

Análisis estadístico de la Concentración Letal media (CL_{50})

Los resultados obtenidos se procesaron en un ordenador transformando los porcentajes de mortalidad en probits, los cuales se utilizaron para efectuar una regresión lineal que permitió calcular la Concentración Letal Media (CL_{50}) de los extractos con un intervalo de confianza del 95 %.

3.3.2.2. Evaluación citotóxica del extracto de acetato de etilo

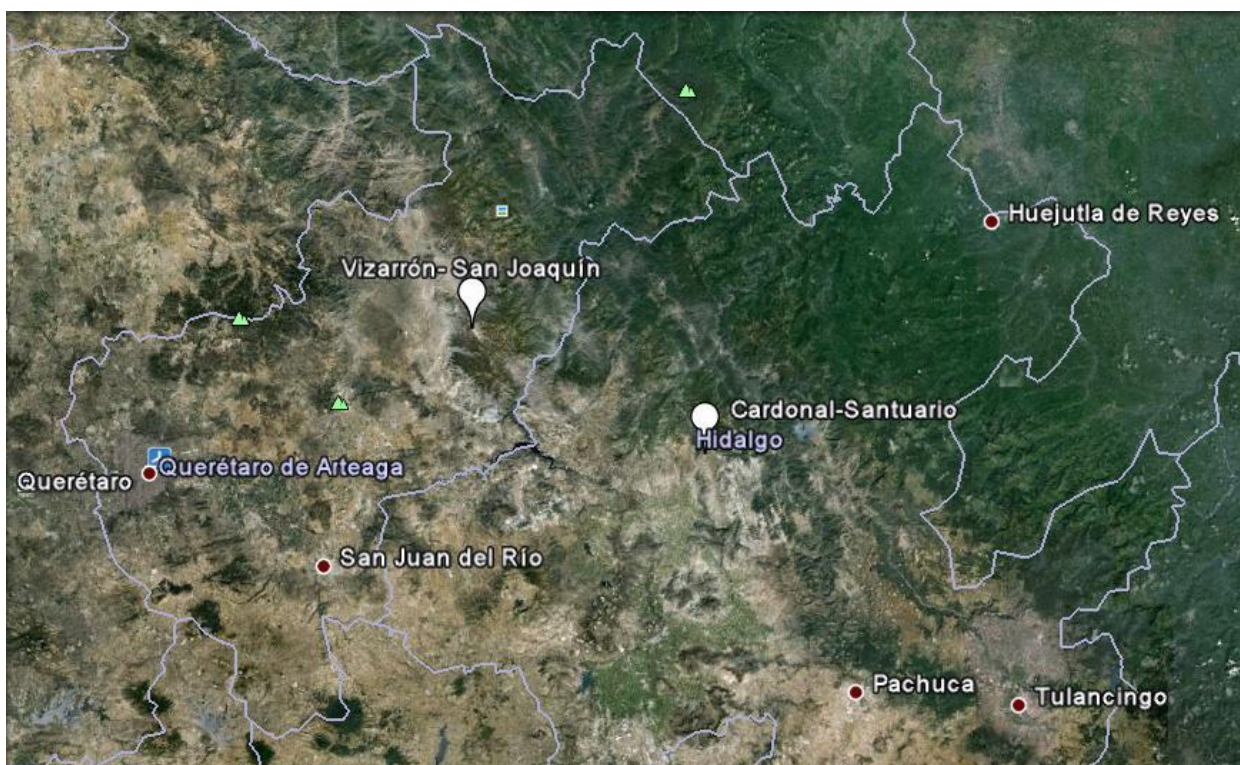
La prueba preliminar del extracto de acetato de etilo sobre *Artemia salina* permite inferir que existe algún grado de citotoxicidad en células. Éste método está basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), lo que permite determinar el grado de funcionalidad de las mitocondrias de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para esta evaluación se utilizaron líneas celulares HeLa (cáncer de útero) y fueron donadas por la Colección Europea de Cultivo de Células Animales (Porton Down,

Salisbury, UK). Las líneas celulares utilizadas para el bioensayo se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's (Sigma-Aldrich) con algunas modificaciones, se agregó solución al 10 % de suero sanguíneo de bovino fetal (Sigma-Aldrich), 2.5 µg/mL de amphotericina B, 30 µg/mL de streptomycin y 30 IU/mL de penicilina. El método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich), fue utilizado para detectar viabilidad de las células (Habtemariam, 1995). Inmediatamente, las células fueron cultivadas (5×10^3 cel/pozo) en 100 µl del medio anterior en 96 pozos. Se dejaron incubar durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂ para estabilizar las células, después se agregaron los extractos a distintas concentraciones (55.6, 166.7 y 500.0 µg/mL). Las muestras fueron puestas en contacto con las células por 24 horas, la viabilidad celular fue evaluada adicionando 10 µl de solución MTT (5mg/mL) durante las 4 horas siguientes de la incubación. La coloración azul de las muestras fue medida con un Thermo Labsystems-Multiskan EX ELISA a 570 nm. Para calcular CI₅₀ (concentración requerida para matar al 50% de las células), se realizó una correlación y regresión con el programa Microsoft Excel. La diferencia significativa (con un 95 % de confiabilidad) fue obtenida utilizando el software GraphPad Prism 5.01. El control positivo fue podophyllotoxina.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Recolecta del material vegetal

El material vegetal (hojas y semillas) se recolectó aleatoriamente en dos localidades, una de ellas en el estado de Hidalgo y la otra en el Estado de Querétaro, como se muestra en la Figura 18.



📍: Sitios de recolecta del material vegetal

Figura 18. Ubicación de las zonas de recolecta del material vegetal, Cardonal, Hgo. y Cadereyta, Qro., Méx.

4.2. Estudio preliminar de compuestos fenólicos y terpenoides

En las placas de cromatografía en capa fina se observó la presencia de fenoles y terpenos. En la Figura 19a se observan dos manchas de color anaranjado, las cuales son características de fenoles; y del lado izquierdo, en la Figura 19b se

observan manchas de color morado, lo cual permite inferir que se trata de algún tipo de terpenoide, debido a que las manchas de los extractos y el estándar son muy parecidas.

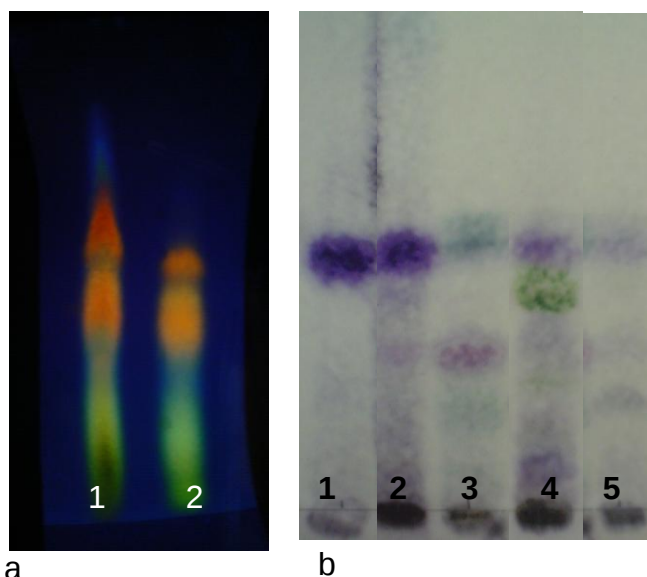


Figura 19. a) Placa cromatográfica en capa fina revelada con NP y PEG, observada bajo lámpara UV (1: recolecta Hgo; 2: recolecta Qro.). b) Placa cromatográfica en capa fina revelado con vainillina y ácido sulfúrico (1: β -sitosterol estándar; 2: Hoja Hgo; 3: semilla Hgo; 4: Hoja Qro; 5: semilla Qro)

Los rendimientos de los extractos obtenidos fueron los siguientes (Cuadro 3)

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos de hojas y semillas obtenidos de *Calia secundiflora* (g/100 g de muestra seca).

Extracto	Región de recolecta	Órgano de la planta	Rendimiento (g/100 g de materia seca)
Acetato de etilo	Hidalgo	Semilla	11.9
		Hoja	6.8
	Querétaro	Semilla	12.8
		Hoja	7.5
Metanólico	Hidalgo	Hoja	10.23
	Querétaro	Hoja	7.6

4.3. Estudio fitoquímico de *C. secundiflora*

4.3.1. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

4.3.1.1. Cuantificación de fenoles y flavonoides

El cambio de color en la muestra es directamente proporcional al contenido de compuestos fenólicos. La Figura 20 muestra el cambio de coloración de los extractos, lo que indica la cantidad de compuestos fenólicos contenidos en las hojas de las dos localidades de recolecta.

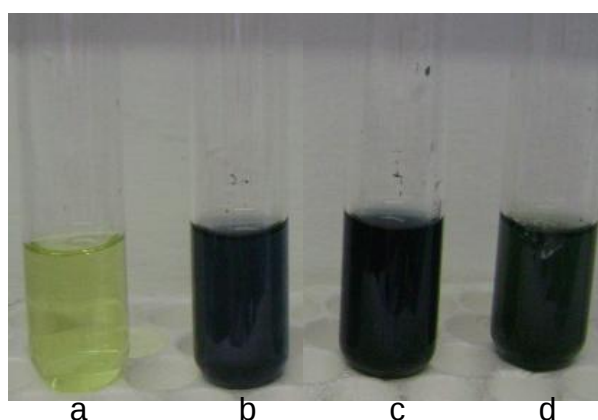


Figura 20. Cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de hojas de *C. secundiflora* a) blanco; b) hoja de Qro.; c) estándar quercetina; d) hoja de Hgo.

El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de la recolecta de Hidalgo fue mayor a la de Querétaro. En las hojas de Hidalgo y de Querétaro cuantificaron mayor contenido de compuestos fenólicos ($8.31 \pm 0.38 \text{ mg g}^{-1}$ y $5.61 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$ de materia seca, respectivamente) que de flavonoides ($3.08 \pm 0.32 \text{ mg g}^{-1}$ y $2.76 \pm 0.14 \text{ mg g}^{-1}$ de m. s., respectivamente), esto se encuentra dentro de lo esperado, siendo que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas del contenido de flavonoides en las muestras de las dos zonas. Sin embargo si hubo una diferencia

estadística significativa del contenido de fenoles totales entre las dos zonas, lo cual pudiera deberse a las diferentes condiciones edáficas de las localidades de recolecta (Zavala *et al.*, 2006). No existen estudios similares realizados en las especies de este género para poder realizar una comparación del contenido de estos metabolitos. Sin embargo, se pudiera inferir que una pequeña proporción del contenido de compuestos fenólicos corresponde a flavonoides y el resto puede tratarse de otros ácidos fenólicos como sucede en algunas especies vegetales, como lo describe Cui *et al.* (2006).

Al respecto, el contenido y perfil de fenoles varía de acuerdo a las condiciones climáticas y geográficas. Caldwell *et al.* (2005), observó un incremento de la concentración de isoflavonas en semillas de soya al aumentar la temperatura, la concentración de CO₂ y las condiciones de sequía, lo cual puede explicar la variación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en las dos regiones de interés en el presente estudio. Kirakosyan *et al.* (2004) observaron un incremento en la síntesis de epicatequina y encontraron niveles elevados de compuestos fenólicos en hojas de *Crataegus laevigata* y *C. monogyna* cuando estuvieron en condiciones de estrés por déficit de agua.

4.3.1.2. Separación de flavonoides

La separación de flavonoides se llevó a cabo a partir de 5 g de extracto metanólico, posteriormente se realizó una separación por partición primero diclorometano: agua y después con butanol. El rendimiento obtenido del extracto butanólico fue de 10 g por cada 100 g de extracto metanólico. Se aplicaron 0.2 g

de extracto butanólico en cada placa cromatográfica preparativa y se utilizó como eluyente el BAW. En un extremo de las placas se reveló con NP y PEG para identificar 2 manchas color anaranjado (flavonoides) que, posteriormente, fueron desprendidas de la placa y de la sílica. El fraccionamiento del extracto butanólico por cromatografía en capa fina preparativa permitió obtener 0.08 g y 0.11 g por 100 g⁻¹ del extracto metanólico de las fracciones **1** (Rf = 0.26) y **2** (Rf = 0.40), respectivamente. Las fracciones 1 y 2 son de naturaleza flavonoides, por la coloración naranja fluorescente al visualizarlos al UV (longitud de onda 415 nm), y a luz normal se ven de color amarillo, característico de éstos metabolitos (Figura 21) (Wagner y Bladt, 1996).



Figura 21. Placa cromatográfica preparativa ya revelada. Se observan dos manchas color amarillo a simple vista.

4.3.1.3. Identificación de flavonoides por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM)

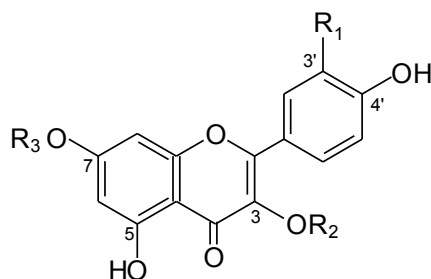
El análisis general por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas permitió identificar principalmente a siete glicósidos de los flavonoles: quercetina, kaemferol e isoramnetina, otros no fueron posible identificarlos. En el Cuadro 4 se muestran las características cromatográficas y espectrométricas de los compuestos detectados en el extracto metanólico y en la Figura 22 se presentan las estructuras de los glicósidos de los flavonoides identificados. Los pesos moleculares de los glicósidos coincidieron con los existentes en la librería de espectros del equipo y los descritos en la literatura (Kite *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Tiempo de retención (t_R), peso molecular relativo (M_r), azúcares localizados en la posición C-3 y C7 de las agliconas de los flavonoides identificados en las hojas de *Calia secundiflora* de Hidalgo.

No.	t_R (min)	M_r	Aglicona ^a	C-3 ^b	C-7
1	8.53	918	I	Rha(1→2)[Rha-(1→6)]-Glu-	Rha-
2	12.71	901	Q	Rha(1→2)[Rha-(1→6)]-Glu-	Rha-
3	14.75	885	K	Rha(1→2)[Rha-(1→6)]-Glu-	Rha-
4	17.80	755	Q	Rha(1→2)[Rha-(1→6)]-Glu-	--
5	18.26	755	Q	Rha(1→6)- Glu-	Rha-
6	20.3	595	K	Rutinósido (Rha(1→6)- Glu-)	--
7	21.86	609	Q	Rha(1→6)- Glu-	--

^aAglicona: I, isoramnetina; K, Kaemferol; Q, quercetina. Rha= Ramnosa; Glu=glucosa

^b Primer azúcar unido al O-C3 de la aglicona y corresponde al último de cada fila



Quercetina	3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavonol	$R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$
Isoramnetina	3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxi-flavonol	$R_1 = OCH_3; R_2 = R_3 = H$
Kaemferol	3,4',5,7-tetrahidroxi-flavonol	$R_1 = \quad R_2 = R_3 = H$

Figura 22. Estructura de las agliconas de los glicósidos identificados en *C. secundiflora*

Además, se realizó un análisis de espectrometría de masas-espectrometría de masas de las fracciones (**1** y **2**) obtenidas de las placas cromatográficas preparativa, en donde se detectó la presencia de flavonoides.

En el análisis de espectrometría de masas-espectrometría de masas (EM-EM) de la fracción **1** se puede observar un flavonoide, correspondiente a quercetina 3-O-ramnosil (1-2)[ramnosil(1-6)-galactosido-7-O-ramnosido], el cual coincide en peso molecular (903.27) con el detectado por Kite (2009), en la especie de *Cladrastis*. En la Figura 23 se muestran los cromatogramas de los tres extractos vegetales y permite inferir que uno de los flavonoides está presente en las dos especies vegetales.

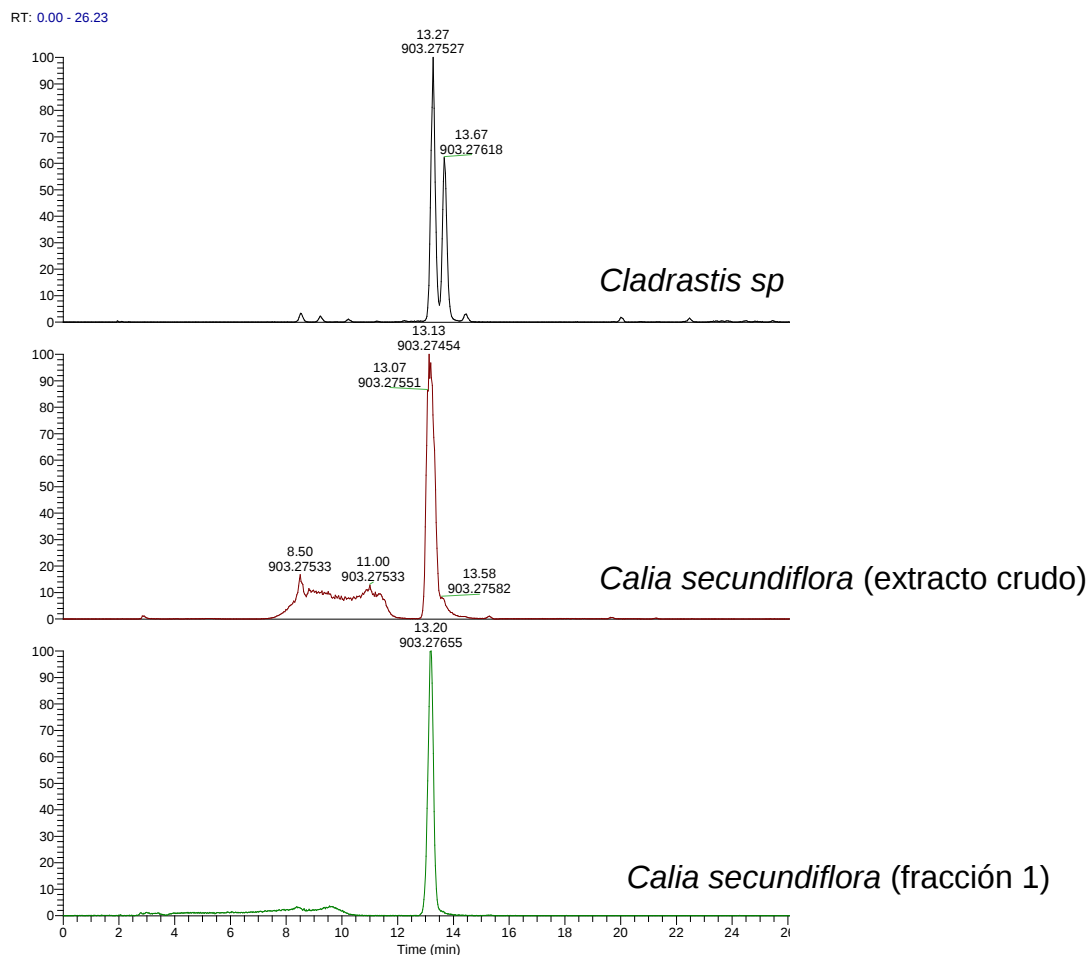


Figura 23. Cromatograma de la fracción 1 comparada con el extracto crudo de *Calia secundiflora* y la especie de *Cladrastis*.

De igual manera, se realizó un análisis de EM-EM comparativo entre la fracción 2, extracto crudo de *Calia secundiflora* y extracto de *Cladrastis*, y se detectó la presencia de dos flavonoides acilados que, probablemente, se trate de compuestos novedosos en la especie. En la Figura 24 se muestran los cromatogramas de cada uno de los extractos analizados por EM-EM.

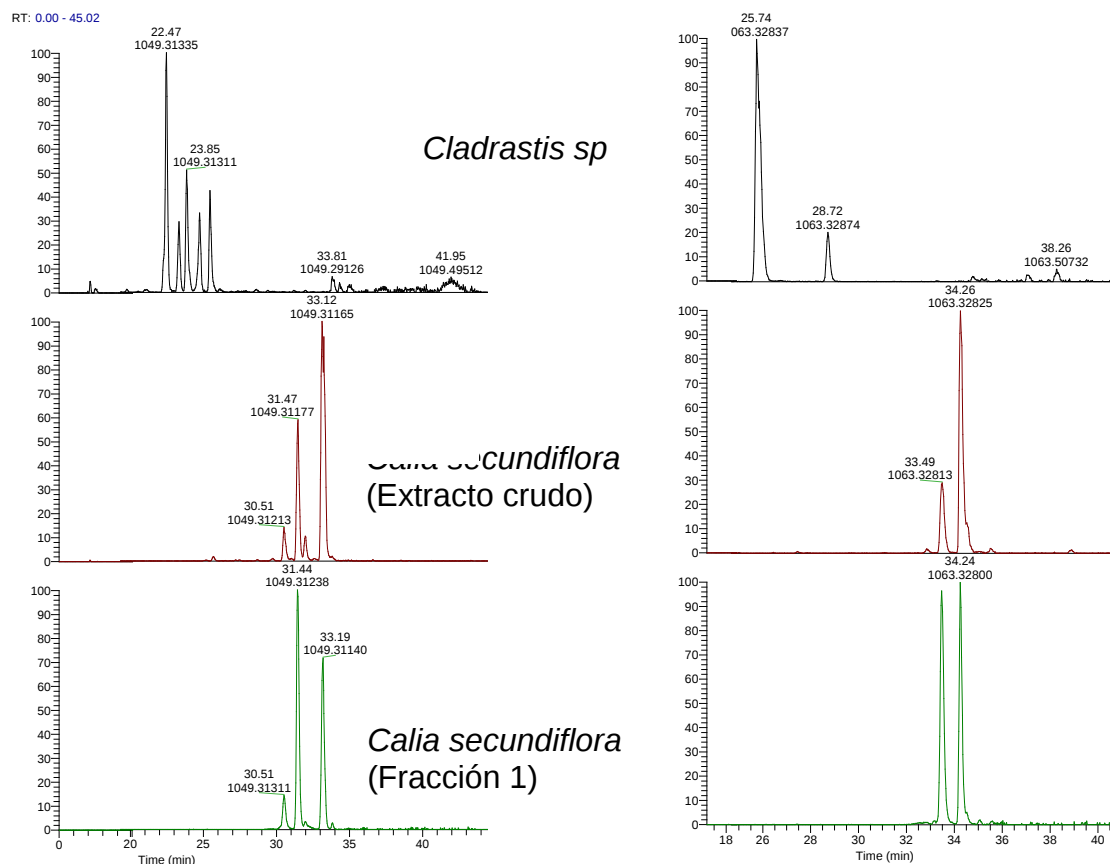


Figura 24. Cromatogramas EM-EM comparativos de la fracción 2, extracto crudo de *C. secundiflora* y *Cladrastis* de dos flavonoides acilados aun no identificados antes en las especies.

La presencia de di, tri y tetraglicósidos de estos flavonoides no se han descrito en la especie *C. secundiflora*. Sin embargo, se ha señalado la presencia de otros flavonoides. Shirataki *et al.* (1997), describe tres isoflavonoides aislados de la raíz de *C. secundiflora*. Por otro lado, Tanaka *et al.* (1998), detectó ocho nuevos isoflavonoides en la raíz de *S. secundiflora*, *S. arizonica* y *S. gypsophila*.

Glicósidos de flavonoides similares a los detectados en este trabajo en *C. secundiflora* se han descrito recientemente en otras especies de leguminosas, éstos han servido como marcadores taxonómicos. Al respecto, Kite *et al.* (2007; 2009), describen la presencia de glicósidos de flavonoides en *Styphnolobium* y en

Cladrastis kentukea (Leguminosae). Los flavonoles **3**, **4**, **6** y **7** mencionados en el Cuadro 4 ya han sido reportados anteriormente por Kite *et al.* (2007) en la especie *Styphnolobium japonicum*.

4.3.1.4. Actividad antioxidante del extracto metanólico y butanólico

En su forma de radical libre, el DPPH[•] absorbe a 516 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH[•] proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. La Figura 25 muestra el cambio de coloración de la solución con DPPH del púrpura (radical libre) al amarillo (antioxidante)

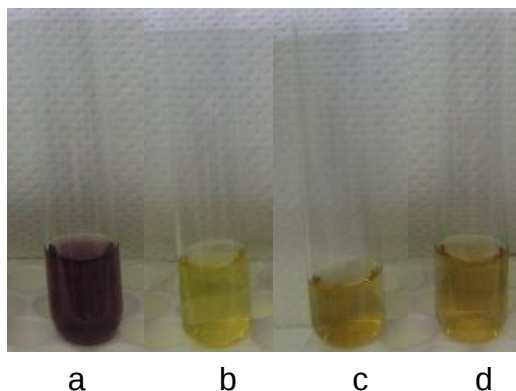


Figura 25. Cambio de coloración del radical DPPH del púrpura al amarillo. a) DPPH; b) quercetina; c) hoja de Hidalgo; d) hoja de Querétaro.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas de la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) entre los extractos metanólico, butanólico y las fracciones **1** y **2** para reducir el 50 % del 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) como se indica en el Cuadro 5. El extracto butanólico, seguido del metanólico (88.543 ± 0.151 y $109.443 \pm 0.482 \mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente) fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante en comparación con las fracciones 1 y 2. Esta respuesta se

debió probablemente a un efecto sinérgico de los componentes de cada mezcla (metanólico y butanólico).

Cuadro 5. Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de DPPH con los extractos y fracciones de *Calia secundiflora*.

Extracto	CI ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Extracto metanólico	109.443 $\pm$ 0.482c ^ψ
Extracto butanólico	88.543 $\pm$ 0.151d
Fracción 1	568.630 $\pm$ 1.152a
Fracción 2	168.903 $\pm$ 1.277b

La CI₅₀ es la cantidad necesaria del extracto para inhibir el 50 % del DPPH después de 30 min.

ψ: Datos con la misma letra en la columna, son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Después de cada valor se presenta el error estándar (con tres repeticiones).

La Figura 26 muestra la cinética de reacción en donde la cantidad de DPPH remanente disminuyó de acuerdo a la actividad antiradical (actividad antioxidante) de los extractos y de las fracciones evaluadas. Sánchez-Moreno *et al.* (2002), clasifican la conducta antioxidante de diferentes sustancias de acuerdo a la cinética de la reacción como: <5 min rápida; entre 5 y 30 min intermedia y > 30 min como lenta; para los extractos metanólico y butanólico de hojas de *C. secundiflora*, presentaron una cinética más rápida en relación a las fracciones **1** y **2**.

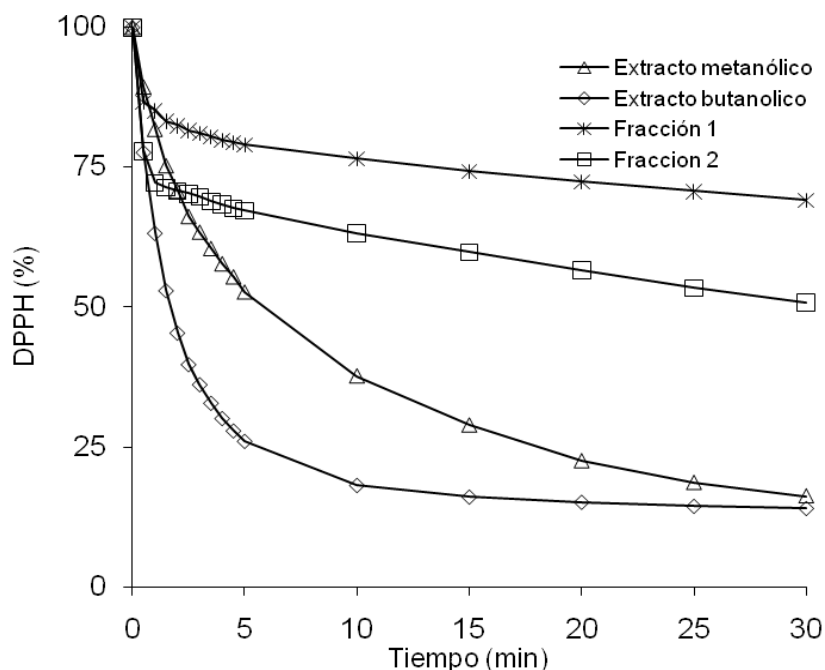


Figura 26 Actividad antioxidante de los extractos y fracciones en relación a la variación de la concentración de DPPH remanente en función del tiempo.

La actividad antioxidante que presentaron los extractos metanólico y butanólico de *C. secundiflora* se debe en parte, a la presencia de los siete glicósidos de quercetina, isoramnetina y kaemferol.

Se encuentra ampliamente documentado en la literatura, que la presencia de estos metabolitos se asocia a la actividad antioxidante que presentan una gran variedad de especies y frutos (Chang *et al.*, 2002; Harborne y Williams, 2000; Robards *et al.*, 1999). Al respecto, la actividad antioxidante que presentan los flavonoles y las flavonas se asocia con características estructurales. Aquellas estructuras que presentan grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B y OH en C-3 e insaturación del anillo C, permite estructuras mesoméricas estables con la capacidad de la captura eficiente de radicales libres, requisito para la

máxima capacidad antioxidante (Robards *et al.*, 1999; Cotelle *et al.*, 1996; Bors *et al.*, 1990). En esta investigación, la quercetina cumple, en mayor medida, con estas características estructurales, aunque se encuentra descrito que algunos de los derivados glicosídicos presentan menor actividad antioxidante que la aglicona por la unión del azúcar al OH del C-3 (Robards *et al.*, 1999). Esta información explica la actividad antioxidante encontrada en relación a la estructura de los glicósidos detectados en los extractos y en las fracciones del presente estudio.

4.3.2. Estudio del extracto de acetato de etilo y actividad citotóxica

4.3.2.1. Determinación de la Concentración Letal media (CL₅₀) sobre *Artemia salina*

El ensayo con *Artemia salina* es una prueba utilizada para evaluar la actividad tóxica general no específica de extractos de diferentes plantas, y en algunos laboratorios es utilizada como tamizaje preliminar en la búsqueda de agentes anticancerígenos, dado que se ha demostrado que existe una relación directa entre los valores de la Dosis Letal Media (DL50) calculada y las pruebas anticancerígenas realizadas utilizando sistemas de cultivo *in vitro* (Ticona *et al.*, 1998; Lagarto- Parra *et al.*, 2001).

Con el propósito de poder establecer alguna relación entre la presencia de terpenoides y la letalidad sobre *A. salina*, se adoptó el criterio propuesto por Sanabria-Galindo *et al.* (1997) en donde menciona que cuando la concentración letal media esta entre 0.1 a 100 µg/mL se presenta toxicidad elevada, de 100 a

300 µg/mL la toxicidad es media, de 300 a 640 la toxicidad es baja y mas de 640 se presenta toxicidad mínima.

Con base en lo antes mencionado se determinó que los extractos de acetato de etilo de *C. secundiflora* son mínimamente tóxicos ya que la Dosis Letal Media es mayor a 640 µg/mL como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Dosis Letal Media del extracto de acetato de etilo de *C. secundiflora* recolectadas en Cardonal, Hidalgo y Cadereyta, Querétaro, aplicado a crustáceos de *A. salina*

Región de colecta	Dosis Letal Media (µg/mL)	
	Hoja	Semilla
Hidalgo	2357.67 b ^z	>3000 a
Querétaro	>90000 a	676.62 b

^z: De acuerdo a la prueba Tukey ($P \leq 0.05$), resultados con diferente letra, dentro de la misma columna, son estadísticamente diferentes.

Es claro que la letalidad sobre *A. salina* depende de la concentración de las sustancias, de la presencia de otros metabolitos secundarios no analizados en este trabajo y de la interacción entre los mismos. Se puede sugerir que los extractos presentaron otro mecanismo de acción, el cual aun no se define con precisión.

En un estudio realizado por Sanabria-Galindo *et al.* (1997), mencionan que la presencia de compuestos terpenoides como los esteroides no muestran una influencia especial sobre la letalidad en *Artemia salina*. Por otro lado, se observó que el extracto de *Piper hispidum* presentó una concentración letal media de 1.8 µg/mL sobre *A. salina* y ha demostrado tener una buena actividad citotóxica frente a células cancerígenas de mama y leucemia (Plazas *et al.*, 2008), de igual manera

se demostró que en extractos de plantas como *Piper auritum* Kunth, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, *Plantago major* L., *Ruta graveolens* L. y *Senna alata* (L.) Roxb., presentan una buena correlación entre los ensayos realizados *in vivo* (con ratones) e *in vitro* (Lagarto-Parra *et al.*, 2001). Zhao *et al.* (1999), evaluaron la toxicidad de varios tipos de esteroides en contra de artemia (*Artemia salina*), y encontraron como resultado que la mayoría de los compuestos probados no fueron tóxicos a los crustáceos con una concentración lo suficientemente alta. Por lo antes mencionado, al encontrar toxicidad en algunas muestras de *C. secundiflora* se justifica, entonces, realizar la evaluación específica de citotoxicidad con líneas celulares HeLa, como parte de un estudio.

4.3.2.2. Evaluación citotóxica del extracto de acetato de etilo

El ensayo del MTT está basado en la inhibición de la reducción de la sal de tetrazolio (amarilla) a azul de formazán (azul), insoluble. Esta reducción se produce como consecuencia de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas (Borenfreund *et al.*, 1988).

Alzamora *et al.* (2007), realizaron un estudio de citotoxicidad con extractos de *Lepidium peruvianum* sobre líneas celulares HeLa y determinaron mayor efecto positivo que el control Doxorrubicina (0,660 mg mL⁻¹ versus 1,64 mg mL⁻¹, respectivamente). En el caso de *C. secundiflora*, se puede observar que casi todas las muestras pierden la actividad citotóxica al ser evaluadas a 55 µg mL⁻¹ y en algunos casos, como en la muestra de la semilla de Hidalgo que en concentración de 500 µg mL⁻¹, se observó que comienzan a inducir proliferación celular. En

algunas muestras es posible observar la diferencia en actividad a $166.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ entre los extractos de semilla y de hoja de ambas regiones (Figura 27). El aspecto de proliferación es algo interesante ya que esta asociado al efecto inmunomodulatorio de los esteroides, ya que se cree que al interactuar con las membranas, modifican su estructura y sobreexponen o guardan receptores necesarios en interacciones inmunológicas. El estudio por cromatografía en capa fina en donde se utilizó como revelador vainillina y ácido sulfúrico, confirmó la presencia de terpenoides (Figura 19b) al comparar las muestras con el estándar β -sitosterol.

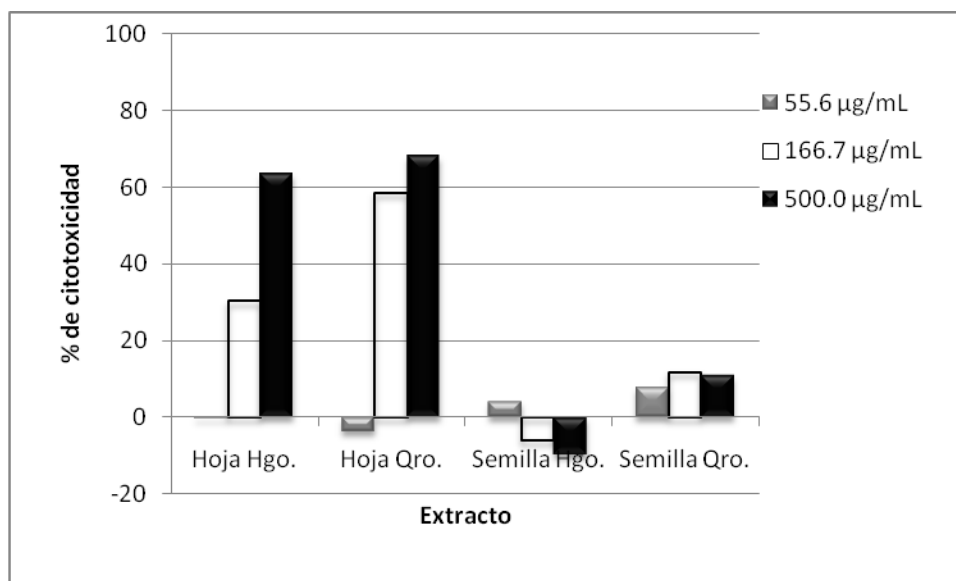


Figura 27. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos de acetato de etilo de *Calia secundiflora* evaluado en líneas celulares cancerígenas HeLa.

Bader *et al.* (1996), mencionan que el poder citotóxico de las saponinas esta influido por la presencia de azúcares en el patrón de O-glicosilación en los átomos de carbono 3 y 28 de la sapogenina.

5. CONCLUSION

El contenido de fenoles y flavonoides ($8.31 \pm 0.38 \text{ mg g}^{-1}$, $3.08 \pm 0.32 \text{ mg g}^{-1}$ de materia seca, respectivamente) fue mayor en la hoja de la zona de Hidalgo en comparación con las de la región de Querétaro ($5.61 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$, $2.76 \pm 0.14 \text{ mg g}^{-1}$ de m. s., respectivamente).

Se identificaron las estructuras de seis glicósidos de flavonoides, no identificados en *Calia secundiflora*.

La actividad antioxidante de los extractos metanólico y butanólico (109.443 ± 0.482 y $88.543 \pm 0.151 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) fue mayor a las fracciones 1 y 2 (568.630 ± 1.152 y $168.903 \pm 1.277 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente)

Las muestras de Queretaro presentan mayor actividad citotóxica en células HeLa que las muestras de Hidalgo.

6. LITERATURA CITADA

- Adamson, G. E.; A. Lazarus S.; E. Mitchell A.; L. Prior R.; G. Cau; H. Jacobs P.; G. Kremers B.; F. Hammerstone J.; Rucker R.; K. Ritter; H. Schmitz. 1999. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. J. Agric. Food Chem. 47:4184 - 4188.
- Aguilar, C. A.; Zolla C. 1982. Plantas Tóxicas de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F. 271 p.
- Alzamora, L.; E. Colona; N. Acero de Mesa; A. Galán de Mera; D. Muñoz-Mingarro; F. Linares; M. T. Domínguez; E. Alvarez. 2007. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. Rev. Peru. Biol. Número especial 13(3):219–221.
- Anónimo. 2002. ILDIS. International Legume Database & Information Service. (En línea) <http://www.ildis.org/LegumeWeb/6.00/taxa/4878.shtml>. (Consulta 8/diciembre/2010)
- Anónimo. 2005. PGRC. Plant Gene Resources of Canada. (En línea) <http://pgrc3.agr.ca/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?34967> (Consulta 8/diciembre/2010)
- Arnao, M; A. Cano; M. Acosta. 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. Free Rad. Res. 31:89-96
- Aruoma, O. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutation Res. 523-524:9-20

- Aruoma, O.I., Halliwell B., Williamson G. 1997. In vitro methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substances in plant foods. In Antioxidant methodology, in vivo and in vitro concepts. Ed. AOCS press. Champaign, Illinois. pp 172-204.
- Ávalos, G. A.; E. Pérez-Urria C. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Bader, G.; Plohm B.; Hiller K.; Franz G. 1996. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. Pharmazie. 51(6):414-417
- Basaga, H.S. 1989. Biochemical aspects of free radicals. Biochem. Cell. Biol. 68:989-998.
- Benzie, I. F.F.; J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. Analytical Biochemistry. 239(1): 70-76
- Benzie, I., Y.T. Szeto. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/ antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem. 47:633-636.
- Bocco, A.; M.E. Cuvelier; H. Richard; C. Berset. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. J. Agric. Food Chem. 46:2123-2129.
- Boliver, P.; C. Cruz-Paredes; L. R. Hernández; Z. N. Juárez; E. Sánchez-Arreola; Y. Av-Gay; H. Bach. 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. J. Ethnopharmacol.

- Borenfreund, E; Babich H.; Martin-Alguacil N. 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. in Vitro.* 2(1):1-6.
- Bors, W.; W. Heller; C. Michel; S. Manfred. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186: 343-355.
- Brand-Williams, W.; M.E. Cuvelier; C. Berset. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28:5-30.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 56(11):317–333.
- Bruneton J.1991. *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. Acribia. España, Zaragoza. Pp.355-358.
- Caldwell, C. R.; S. Britz; R. Mirecki. 2005. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4):1125-1129.
- Cao, G.; E. Sofic; R. L. Prior. 1996. Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 749-760.
- Chang, Z-H., Yu, B-Y. & Yang, X-W. 2002. 27-nor-triterpenoid glycosides from *Mitragyna inermis*. *Phytochemistry* 61: 379-382.
- Chipault, J.R. 1962. Antioxidants for food use. In Lunderberg WO. *Autoxidation and antioxidants*. Wiley. New York. pp. 477-542.
- Clarkson, P. M.; H. S. Thompson. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* 72(2):637–646.

- Cotelle, N.; J. Jery; J. Wallet; E. M. Gaydou. 1996. Antioxidant properties of hidroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 35-43.
- Cui N, K Nakamura, S Tian, H Kayahara, Y Tian. 2006. Polyphenolic content and physiological activities of chinese hawthorn extracts. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 70: 2948-2956.
- Cuyckens, F.; M. Claeys. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39 (1):1-15.
- De Luca, V.; B. St. Pierre. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Sci.* 5:349-364.
- Dewick, P.M. 2009. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3a edición. Editorial WILEY. Great Britain. 187-188.
- Doillon, C.J.; E. Gagnon; R. Paradis; M. Koutsilieris. 2004. Three-dimensional culture system as a model for studying cancer cell invasion capacity and anticancer drug sensitivity. *Anticancer Res.* 24(4):2169-2177.
- Dudareva, N; S. Andersson; I. Orlova; N. Gatto; M. Reichelt; D. Rhodes; W. Boland; J. Gershenzon. 2005. The non-mevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 933–938.
- Eisenbrand, G.; B. Pool-Zobel; V. Baker; M. Balls; B.J. Blaauboer; A. Boobis. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 40(2):193-236.
- Escarpa, A.; C. González M. 2001. An Overview of Analytical Chemistry of phenolic compounds in food. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 57–139.
- Fentem, J.H. 1994. The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions. *Human Experimental Toxicology*.13 (2):445-449.

- Fogliano, V.; V. Verde; G. Randazzo; A. Ritieni. 1999. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. *J. Agric. Food Chem.* 47 (3):1035–1040.
- Fukumoto, L. R.; G. Mazza. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48 (8):3597–3604.
- García, M. R.; M. Soto H.; F. Zavala Ch.; G. Kite. 2007. Alcaloides Quinolizidínicos en *C. secundiflora* (Fabaceae). *Agrociencia.* 41(2): 161-167.
- Giron, M.E.; I. Aguilar; L. Romero; E. Sanchez; J. C. Perez; A. Rodriguez. 2005. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 47(3):147- 152.
- Gokalp, I; K. Nese; K. Mine; C. Husnu K.; D. Fatih. 2002. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 50 (14):3943-3946.
- Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vivo. *Food Antioxidants.* Elsevier. London. 1-18.
- Griffín, S. 1979. Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure. *Boletín* 30. 262 p.
- Guil-Guerrero, J.L.; R. Ramos-Bueno; I. Rodríguez-García; C. López-Sánchez. 2011. Cytotoxicity screening of several tomato extracts. *J. Med. Food.* 14(1-2):40-45.
- Habtemariam, S.1995. Cytotoxicity of diterpenes from *Premna schimperi* and *Premna oligotricha*. *Planta Med.* 61(4): 368-369.

- Hagerman, A.; K. Riedl; A. Jones G.; Sovik K.; Ritchard N.; Hartzfeld P. and T. Riechel. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46:1887-1892.
- Halliwell, B.; J. M. C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford.
- Harborne J. B.; C. A. Williams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55 (6):481-504.
- Harborne, J. B. 1989. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 1. Plant Phenolics. Academic Press, London 522 p.
- Harborne, J.B. 1972. *Phytochemical ecology*. Academic Press. London 104-123.
- Hatfield, G. M.; J. Valdes L. J.; J. Keller K.; L. Murrill W.; V. Jones H. 1977. An investigation of *Sophora secundiflora* seeds (Mescalbeans). *Lloydia*. 40(4): 374-382.
- Hemmerlin, A.; J. F. Hoeffler; O. Meyer; D. Tritsch; I. A. Kagan; C. Grosdemange-Billiard; M. Rohmer; T.J. Bach. 2003. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.* 278: 26666–26676.
- Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342, 1007-1011.
- Hopkins, W.; Hüner, N. 2004. *Introduction to plant physiology*. John Wiley ed., Inc, MA, USA. 560 p.
- Huang, D.; B. Ou; R. L. Prior. 2005. Reviews. The chemistry behind antioxidant capacity assays *J. Agric. Food Chem.* 53:1841-1856.

- Jiménez, N.; M. González; C. Fernández; J. López. 2007. Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina. *Biomecánica*. 15 (1):63-71.
- Kähkönen, M.; A. I. Copia; M. Heinonen. 2001. Berry fenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49:4076–4082.
- Keller, W. J. 1975. Alkaloids from *Sophora secundiflora*. *Phytochemistry*. 14:2305-2306.
- Kirakosyan, A.; E. Seymour; P. B. Kaufman; S. Warber; S. Bolling; S. Chul Ch. 2004. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J. Agric. Food Chem.* 51:3973-3976.
- Kite, G. C.; Ch. Stoneham; N. Veitch. 2007. Flavonol tetraglycosides and other constituents from leaves of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and related taxa. *Phytochemistry* 68: 1407–1416.
- Kite, G.; N. C. Veitch; M. E. Boalch; G. P. Lewis; C. J. Leon; M. S. J. Simmonds. 2009. Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of fructus Sophorae and flos Sophorae. *Phytochemistry* 70: 785-794.
- Kite, G.C.; T. Pennington R. 2003. Quinolizidine alkaloid status of *Styphnolobium* and *Cladrastis* (Leguminosae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31(12): 1409–1416
- Knez, W. L.; J. Coombes S.; D. Jenkins G. 2006. Ultra-endurance exercise and oxidative damage: implications for cardiovascular health. *Sports Med.* 36(5):429-441.

- Lagarto-Parra, A.; R. Silva-Yhebra; I. Guerra-Sardiñas and L. Iglesias Buela. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 8 (5): 395-400.
- Lagunes T., A.; Arena L., C.; Rodríguez H., C. 1990. Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. Proyecto PROAF-CONACYT. Dirección general de sanidad vegetal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. 199 p.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. and Lock, M. 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.Reino Unido. 577 p
- Liby, K.T.; M. Yore; M. Sporn. 2007. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*. 7:357–369.
- Liou, K.T.; Y. C. Shen; C.F. Chen. 2003. The antiinflammatory effect of honokiol on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production. *Eur J. Pharmacol*. 475:19-27.
- Liu, L.; Y. Laura; T. Liang; X. Ye Hong; X. Zeng. 2009. Determination of polyphenolic content and antioxidant of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng *Food Chemistry*. 112:35-41.
- Lodish, H.; A. Berk; L. Zipursky; P. Matsudaira; D. Baltimore; J. Darnell.2002. *Biología celular y Molecular*. 4ª Ed. Editorial Freeman and Company. New York. Pp 595-597.
- López, L. M. T. 2002. Flavonoides. *Fitoterapia*. 21 (4): 108-114

- Loyola-Vargas, V. M.; P. Sánchez-Iturbe; B. Canto-Canché; L. C. Gutiérrez-Pacheco; R. M. Galaz-Ávalos; O. Moreno-Valenzuela. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. Rev. Soc. Quím. Méx. 48: 67-94)
- Macías, V. V.; E. Álvarez Caballero Juan Manuel, Suárez Gómez Hernando. Terpenos con actividad biológica anti-VIH. 2010 Duazary; 7(2): 257-273
- Martínez-Flórez, S.; J. González-Gallego; J. M. Culebras; M.^a J. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 17(6): 271-278.
- Martínez-Valverde I., Periago M.J., Ros G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch. Latinoamer. Nutr. 50, 5-18.
- Muñoz, J. A. M.; F. Ramos E. 2007. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. Revista Horizonte Médico. 7 (1):23- 31.
- Murakoshi, I.; H. Kubo; M. Ikram; M. Israr; M. Shafi, N.; S. Ohmiya and H. Otomasu. 1986. (+)-11-oxocytisine, a lupin alkaloid from leaves of *Sophora secundiflora*. Phytochemistry 25: 2000-2002.
- Murray, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell. 116: 221-234.
- Namiki, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 29:273-300.
- Norton, F. 2000. Dye exclusion viability assays using a hemacytometer. Tech Note: Nalge Nunc International Corp. 3(25):67-68
- Ovensná, Z.; A. Vachalková; K. Horváthová; D. Táthová. 2004. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. Neoplasma. 51(5):327–333.

- Pérez-Laínez, D.; R. Garcia-Mateos; R. San Miguel Chávez; M. Soto-Hernández; E. Rodríguez-Pérez; G. Kite. 2008. Bactericidal and fungicidal activities of *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. Z. Naturforsch. 63:653-657
- Phillips, D.R.; J. Rasbery; B. Bartel; S. P. Masuda. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. Curr Opin Plant Biol. 9(3):305–314.
- Plazas, G. E. A.; L. E. Cuca S.; W. A. Delgado A. 2008. Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) y derivados acetilados. Rev.Colomb.Quim. 37(2):135:144.
- Proestos, C.; N. Chorianopoulos; G. J. E. Nychas and M. Komaitis. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. J. Agric. Food Chem. 53:1190-1195.
- Re, R.; N. Pellegrini; A. Proteggente; A. Pannala; M. Yang; C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay Free Radic. Biol. and Med. 26(9-10):1231-1237.
- Reinecke, S.A.;B. Helling. 2002. Lysosomal response of earthworm (*Eisenia foetida*), coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. Environmental Toxicology Chemistry. 21:1026-1031.
- Repetto, M. 2002. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición. p.303-305.
- Rhodes, M.J.C. 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. Plant Mol. Biol. 24: 1-20.

- Ricchelle, M.; I. Tavazzi; E. Offord. 2001. Comparison of the anti-oxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa and Tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* 49:3438–3442.
- Robards K, D Prenzler, G Tucker, P Swatsitang, W Glover. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66: 401-436.
- Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51:2866-2887.
- Roedig-Penman, A.; M. H. Gordon. 1997. Antioxidant properties of catequins and green tea extracts in model food emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 45:4267-4270.
- Rohmer, M.; M. Knani; P. Simonin; B. Sutter; H. Sahm. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *J. Biochem.* 295: 517–524.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México, D. F. 432 p.
- Sanabria-Galindo, A., S. I. López y R. Gualdrón. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas Colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-farmacéuticas.* 26: 15-19.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8: 121-137.
- Sánchez-Moreno, C.; J. A. Larrauri; F. Saura-Calixto. 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76:270-276.

- Setzer, W.N.; M. Setzer. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem*.3(6):540–556.
- Shah, B.A.; G. Qazi; S. Taneja. 2009. Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. *Nat Prod Rep*. 26(1):72–89.
- Shang, X.Y.; J. Li; M. Liu; Y.S. Li; Y. Liu; F. Wang; X. Huang; L. Jin. 2011. Cytotoxic steroids from *Monascus purpureus*-fermented rice. *Steroids*. (En proceso).
- Shirataki, Y.; Y. Sanae T.; Y. Sugita; I. Yokoe; M. Komatsu; M. Ohyama; T. Tanaka; M. Iinuma. 1997. Isoflavanones in roots of *Sophora secundiflora*. *Phytochemistry*, 44(4):715-718.
- Shulthes R E, A Hofmann. 1982. *Plantas de los Dioses: Origen y Uso de los Alucinógenos*. México: Fondo de Cultura Económica. 192 pp.
- Siddhuraju, P.; K. Becker. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem*. 51:2144–2155.
- Singh, S.; T. A. Baugher; E. C. Townsend; M. C. D'Souza. 1991. Anthocyanin distribution in 'Delicious' apples and the relationship between anthocyanin concentration and chromaticity values. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci*. 116: 497-499.
- Sivropoulou, A.; C. Nikolaou; E. Papanikolaou; S. Kokkini; T. Lanaras; M. Arsenakis. 1997. Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. *J. Agric. Food Chem*. 45 (8): 3197–320.

- Sivropoulou, A.; E. Papanikolaou; C. Nikolaou; S. Kokkini; T. Lanaras; M. Arsenakis. 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 44 (5):1202–1205.
- Soler-Rivas C, J C Espín, H J Wichers .2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* 11: 330-338.
- Sousa, M.; Rudd V.E. 1993. Revisión del genero *Styphnolobium* (Leguminosae: Papilionoideae: Sophoreae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 270–283.
- Sparg, S. G.; M. E. Light and; J. Van Staden. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacology* 94(2-3):219-243.
- Stobiecki, M. 2001. Application of separation techniques hyphenated to mass spectrometer for metabolic profiling. *Curr. Org. Chem.* 5, 335–349.
- Swain T.; Goldstein J.L. 1964. *Methods in polyphenol chemistry*. Pergamon Press, Oxford. 131-146.
- Tanaka, T.; M. Ohyama; M. Inuma; Y. Shirataki; M Komatsu; Ch. L. Burandt. 1998. Isoflavonoids from *Sophora secundiflora*, *S. arizonica* and *S. gypsophila*. *Phytochemistry*. 48 (7):1187-1193.
- Tian, X. R.; H. F. Tang; Y.S. Li; H. W. Lin; X. L. Chen; N. Ma; M. N. Yao; P. H. Zhang. 2011. New Cytotoxic Oxygenated Sterols from the Marine Bryozoan *Cryptosula pallasiana*. *Marine Drugs*. 9: 162-183.

- Ticona, V. R.; M. Nieve T.; P. Irahola S.; A. Gimenez T. 1998. Pruebas biológicas destinadas a evaluar citotóxicos como indicadores de potenciales antitumorales. *BIOFARBO*. 6:11-16
- Velioglu, Y.S., G. Mazza; L. Gao; B.D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46:4113-4117.
- Verpoorte, A. R.; W. Alfermann 2000. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Editorial Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp 1-29
- Vines, A. R. 1960. Trees, Shrubs and Woody Vines of the Southwest. University of Texas Press. Austin, Texas. 1104 p.
- Vinson, J.; B. Hontz. 1995. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J. Agric. Food Chem.* 43(2):401-403.
- Wagner H, S Bladt. 1996. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas Springer Verlag Berlin p. 32.
- Waizel, B. J. 2006. Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria. Insitituto Politécnico Nacional. 587 p.
- Waterman, P. G.; S. Mole. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Methods in Ecology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*. 126:485-493.
- Wojciechowski, M.F. 2003. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective In: B.B. Klitgaard and A.

- Bruneau (editors). Advances in Legume Systematics, part 10, Higher Level Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 5–35
- Yen, G. C.; Duh, P.D. and Tsai, C. L. 1993. Relationship between antioxidant activity and maturity in peanuts hulls. J. Agric. Food Chem. 41:67-70.
- Yen, G. Ch.; H.Y. Chen. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. 43: 27-32.
- Zárate, H. J.; R. García M.; F. Zavala Ch.; R. Pérez L.; M. Soto H. 2006. Fitotoxicidad de los extractos de *Calia Secundiflora* (ORT.) YAKOVLEV. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 12(2): 197-202.
- Zavala C. F.; R. García M.; M. Soto H.; G. Kite. 2006. Phytochemical differences between *Calia secundiflora* (Ort.) growing at two sites in Mexico. Zeitschrift für Naturforschung 61:155-159.
- Zhao, WM; Qin GW; Lou LG. 1999. Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. J Asian Nat Prod Res. 1(4):307-311.
- Zheng, W.; S. Y. Wang. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem. 49: 5165-5170.
- Zuang, V. 2001. The neutral red release assay: a review. Alternatives to Laboratory Animals. 29:575-599.