



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

***Larrea tridentata* de dos zonas áridas de
México: Análisis fitoquímico y evaluación
antioxidante**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

DAFNE SOCORRO MUÑOZ CEBALLOS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la UNAM por ser mi casa de estudios y permitirme obtener mediante ella el poder del conocimiento.

A la FES-Iztacala por ser el lugar en donde el amor por el estudio de la vida comenzó y culminó con tanto orgullo.

Al comité evaluador por su apoyo, paciencia, por aceptar evaluar mi trabajo y por compartirme su sabiduría:

Dr. Guillermo Avila Acevedo

Biol. Marisol Avila Romero

Dra. Ana María García Bores

M. C. Edith López Villafranco

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado

A los profesores:

Biol. Luis Barbo Hernández Portilla del laboratorio de Biogeoquímica de la UBIPRO.

Biol. María del Socorro Sánchez Correa. Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular de la FES-I, por su apoyo para la realización de este trabajo.

A Graciela, Aurora y a la M en C Adriana Montserrat Espinosa González por su compañía y apoyo en el laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO

Agradecimientos Especiales:

Dr. Guillermo Avila Acevedo, por poner en mi camino la planta por la cual obtendré mi título de Bióloga. Por enseñarme a ver la química y la ciencia siempre con una sonrisa y con pasión.

Dra. Ana María García Bores por su admirable paciencia, su incondicional apoyo tanto en lo personal como en lo académico, por impulsarme a descubrir de qué soy capaz y por tener confianza en mí. Gracias por ser mi ejemplo a seguir.

M en C Pilar Amellali Badillo Suárez

Biol. Emelia Campoy Otero

M en C Gloria Garduño Solórzano

Dr. Rafael Lira Saade

Dr. Elias Piedra Ibarra

M en C Sergio Stanford Camargo

Por compartir su sabiduría conmigo durante la carrera, por brindarme su apoyo, cariño y comprensión en todo momento. Gracias por las risas, consejos, viajes, regaños y por hacerme sentir especial. Soy y fui muy afortunada al tenerlos como guías en mi formación como Bióloga, para ustedes todo mi respeto, cariño y admiración por siempre.

Gracias.

Dedicatorias

A mi madre,

Por hacerme ver que el camino de la Biología es para mí, por descubrirme aptitudes que ni siquiera yo conocía. Por desvelarte conmigo aun cuando ni los insectos ni las plantas sean tu pasión, porque aun cuando no entendías mis términos científicos, lo que si sabías era que amaba mi carrera y que para ti soy la mejor Bióloga del mundo, eso es lo que me tiene ahora entregándote mi tesis y mi título como agradecimiento por tu eterno amor y apoyo incondicional. Te amo.

A mi tía,

Por ser la que me espera cada tarde para saber cómo este sueño y mi vida va tomando camino. Por ser la que me cuida e impulsa a no darme por vencida. Por amarme como una hija y entregarme todo lo que eres y tienes. Gracias por tu apoyo incondicional, tu sabiduría, tu experiencia, tu amor y por compartir conmigo la pasión de mi carrera. Te amo.

A mi hermana,

Por recordarme todos los días la responsabilidad que tengo para contigo y así, esforzarme, dar todo lo mejor de mí, para en un futuro saber guiarte por el mejor camino. Gracias por ser mi alegría y por recordarme lo divertida que es la vida. Por confiar en mí y apoyarme a diario. Te amo.

A mi familia,

Por hacerme sentir su amor, apoyo y confianza desde Tijuana y Mexicali. Gracias por darme las fuerzas para dar lo mejor de mí y por ser mi ejemplo a seguir. Los amo con todo mi corazón.

A mis abuelitos (Q.E.P.D),

Por guiarme desde el cielo y bendecirme a cada paso que doy. Esto es por y para ustedes. Los amo.

A Héctor Hernández,

Por enseñarme que no importa cuánto la vida se empeñe en no dejarte cumplir tus sueños y metas, el que persevera alcanza y mucho más, si tienes a tu lado alguien que te ama, confía en ti y te apoya sin importar nada más. Gracias por COMPARTIR tu sabiduría. Gracias por motivarme y darme todo lo

mejor de ti, por acompañarme y estar a mi lado en las mejores y peores. Gracias por haber llegado, por dejarme tener en mi vida el arma más poderosa del ser humano, el amor. Te amo.

A Esther, Karla y Diana,

Aun cuando son tres mundos completamente distintos, recibo de ustedes un mismo valor, su amistad. Gracias por su infinito apoyo y cariño, por estar a mi lado en todo momento aun cuando nuestras vidas van cambiando. Deseo con todo mi corazón tenerlas a mi lado en este y muchos logros más. Las amo.

Y todos los que me acompañaron en este día y durante este recorrido, los quiero muchísimo. Gracias.

Que dicha poder compartir con ustedes tan esperado logro. Todo su amor, comprensión, apoyo y paciencia se ve reflejado en este escrito. Soy una mujer tan bendecida por estar rodeada de tantas personas que creen en mí y que me demuestran su amor y cariño día a día. No tengo otra cosa más que decir que.....GRACIAS.

¡Lo logré!

“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños”

Eleanor Roosevelt

Índice

	Página
Agradecimientos.....	I
Dedicatorias.....	III
Índice general	-1-
Índice de figuras.....	-3-
Índice de cuadros.....	-4-
Índice del apéndice.....	-5-
Abreviaturas.....	-6-
1.0 Resumen.....	1
2.0 Introducción.....	3
2.1 Especies reactivas del oxígeno (ERO) y radicales libres (RL).....	3
2.2 Efectos biológicos de las ERO.....	3
2.3 Mecanismos y defensas antioxidantes.....	3
2.4 Efectos de la radiación UV-B sobre la morfología de las plantas.....	5
2.5 Mecanismos de defensa ante los efectos de la luz UV-B en plantas.....	5
2.6 Acción de la luz UV-B sobre procesos fitoquímicos y metabólicos en plantas.....	6
2.6.1 Acción de la luz UV-B sobre procesos metabólicos en humanos y animales.....	6
3.0 <i>Larrea tridentata</i>	8
3.1 Descripción botánica.....	9
3.2 Antecedentes de <i>L. tridentata</i>	11
4.0 Justificación.....	16
4.1 Hipótesis.....	16
4.2 Pregunta científica.....	16
5.0 Objetivos.....	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos particulares.....	17
6.0 Metodología.....	18
6.1 Colecta.....	18
6.2 Extracción.....	20
6.3 Pruebas cualitativas-colorimétricas.....	21

6.3.1 Reacción de Molisch para glucósidos.....	21
6.3.2 Reacción con cloruro férrico (FeCl ₃) para fenoles.....	22
6.3.3 Reacción de Dragendorff y Mayer para alcaloides.....	23
6.4 Método cromatográfico.....	25
6.5 Estudio espectroscópico.....	25
6.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	25
6.7 Actividad antioxidante.....	26
6.8 Cuantificación total de fenoles-prueba cuantitativa.....	27
7.0 Resultados y discusión.....	29
7.1 Datos de herbario del material vegetal.....	29
7.2 Rendimiento de los extractos.....	29
7.3 Pruebas cualitativas-colorimétricas.....	31
7.4 Cromatografía en capa fina de los extractos de <i>L. tridentata</i>	34
7.5 Absorción en luz UV.....	35
7.6 CG-EM.....	38
7.7 Actividad antioxidante.....	51
7.8 Cuantificación total de fenoles.....	55
8.0 Conclusiones.....	58
9.0 Bibliografía.....	60
10.0 Apéndice.....	66

Índice de Figuras

	Página
Figura 1 <i>Larrea tridentata</i>	9
Figura 2 Descripción botánica.....	10
Figura 3 Lignanos, agliconas y flavonoides presentes en <i>L. tridentata</i>	12
Figura 4 Localización geográfica, El huizache, SLP.....	19
Figura 5 Localización geográfica, Ensenada, B.C.....	20
Figura 6 Formación de furfurales.....	21
Figura 7 Reacción de Molisch.....	22
Figura 8 Reacción de FeCl ₃	23
Figura 9 Reacción de alcaloides en función del pH.....	23
Figura 10 Solubilidad de los alcaloides.....	24
Figura 11 Reducción del radical DPPH•.....	26
Figura 12 Hojas resinosas de <i>L. tridentata</i>	31
Figura 13 Perfil cromatográfico de extractos.....	35
Figura 14 Espectro del extracto de hojas de SLP en diclorometano.....	36
Figura 15 Espectro del extracto de hojas de SLP en hexano.....	37
Figura 16 Estructuras de los compuestos químicos presentes en <i>L. tridentata</i>	42
Figura 17 Cromatograma del extracto de hojas de ENS en hexano.....	43
Figura 18 Cromatograma del extracto de ramas de ENS en hexano.....	45
Figura 19 Cromatograma del extracto de hojas de SLP en hexano.....	47
Figura 20 Cromatograma del extracto de ramas de SLP en hexano.....	49
Figura 21 Estructura química de la quercetina.....	52
Figura 22 Media de los tratamientos en diclorometano y de la quercetina de ambas localidades (ENS y SLP).....	53
Figura 23 Media de los tratamientos en metanol y de la quercetina de ambas localidades (ENS y SLP).....	53
Figura 24 Estructura química del fenol y flavonoide.....	54
Figura 25 Porcentaje de fenoles totales en extractos metanólicos.....	55
Figura 26 Porcentaje de fenoles totales en extractos hexánicos.....	56
Figura 27 Porcentaje de fenoles totales en extractos en diclorometano.....	56

Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 1 Aplicaciones de la resina de <i>L. tridentata</i>	12
Cuadro 2 Constituyentes fitoquímicos de <i>L. tridentata</i>	14
Cuadro 3 Datos de herbario.....	29
Cuadro 4 Rendimiento.....	29
Cuadro 5 Reacciones colorimétricas	33
Cuadro 6 Compuestos químicos compartidos de los extractos de hoja y rama hexánicos de la localidad de ENS.....	38
Cuadro 7 Compuestos químicos compartidos de los extractos de hoja y rama hexánicos de la localidad de SLP.....	39
Cuadro 8 Compuestos químicos compartidos entre los extractos de hoja y rama hexánicos de ambas localidades.....	39
Cuadro 9 Porcentaje de ácido oxálico en los extractos hexánicos de hoja y rama de ambas localidades.....	40
Cuadro 10 Datos del cromatograma del extracto de hojas de ENS en hexano.....	44
Cuadro 11 Datos del cromatograma del extracto de ramas de ENS en hexano.....	46
Cuadro 12 Datos del cromatograma del extracto de hojas de SLP en hexano.....	48
Cuadro 13 Datos del cromatograma del extracto de ramas de SLP en hexano.....	50
Cuadro 14 CA ₅₀ de todos los extractos de <i>L. tridentata</i> y del control.....	52

Índice del Apéndice

	Página
Figura 28 Espectro en luz UV del extracto de hojas en metanol de la localidad de SLP.....	66
Figura 29 Espectro en luz UV del extracto de ramas en metanol de la localidad de SLP	67
Figura 30 Espectro en luz UV del extracto de hojas en metanol de la localidad de ENS	68
Figura 31 Espectro en luz UV del extracto de ramas en metanol de la localidad de SLP	69
Figura 32 Espectro en luz UV del extracto de ramas en diclorometano de la localidad de SLP	70
Figura 33 Espectro en luz UV del extracto de hojas en diclorometano de la localidad de ENS	71
Figura 34 Espectro en luz UV del extracto de ramas en diclorometano de la localidad de ENS	72
Figura 35 Espectro en luz UV del extracto de ramas en hexano de la localidad de SLP	73
Figura 36 Espectro en luz UV del extracto de hojas en hexano de la localidad de ENS	74
Figura 37 Espectro en luz UV del extracto de ramas en hexano de la localidad de ENS	75

Abreviaturas

CA₅₀: capacidad antioxidante media

CCF: cromatografía en capa fina

CAT: catalasa

CG-EM: cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

ENS: Ensenada

ERO: especies reactivas de oxígeno

FeCl₃: cloruro férrico

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

HO[·]: radical hidroxilo

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

H₂SO₄: ácido sulfúrico

L-OOH: lipoperóxidos

MS: metabolitos secundarios

NDGA: ácido nordihidrohuarético

O₂: oxígeno molecular

O₂^{·-}: superóxido

RPN: revelador de productos naturales

RL: radical libre

RUV: radiación ultravioleta

-SH: sulfhidrilo

SLP: San Luis Potosí

SOD: superóxido dismutasa

UV: ultravioleta

UV-A: radiación ultravioleta tipo A

UV-B: radiación ultravioleta tipo B

UV-C: radiación ultravioleta tipo C

1.0 Resumen

Larrea tridentata (Moc. & Sessé ex DC.) Cov., comúnmente conocida como gobernadora, es un arbusto común en los desiertos cálidos del norte de México, pertenece a la familia Zygophyllaceae, la cual incluye más de treinta géneros y unas 250 especies. La gobernadora es reconocida por la gran variedad de propiedades que se le atribuyen. Es por eso que el objetivo de este trabajo es determinar cualitativamente el contenido fitoquímico y evaluar la capacidad antioxidante de la especie *L. tridentata* comparando el contenido de metabolitos secundarios de hojas y ramas de dos localidades áridas de México

Los extractos hexánicos, de diclorometano y metanólicos de hoja y rama de *L. tridentata* se obtuvieron por medio de maceración para lograr extraer los diferentes metabolitos secundarios (MS) presentes en cada una de las muestras con respecto a la polaridad de cada solvente. Posteriormente se realizó una cromatografía en capa fina (CCF), para identificar la presencia de MS en las muestras. Se emplearon distintas técnicas de revelado (luz ultravioleta, revelador de productos naturales y sulfato cérico) para conocer la variedad de compuestos de cada muestra.

Además, se realizaron pruebas cualitativas (reacción de Molisch, cloruro férrico, Dragendorff, Mayer y vainillina) con el fin de identificar la presencia de los diferentes tipos de MS, así como una prueba cuantitativa de fenoles totales (Folin-Ciocalteu). Otra de las técnicas empleadas fue el estudio espectroscópico (UV), con el fin de obtener la determinación cuantitativa y cualitativa de todos los extractos así como para detectar compuestos orgánicos presentes en ellos. La actividad antioxidante de los extractos se evaluó mediante el cálculo de la concentración antioxidante media (CA50) a través de la decoloración del radical difenil-picril-hidracilo.

Los extractos hexánicos de ambas partes de la planta (hoja y rama) de *L. tridentata* de la localidad de Ensenada fueron los que mostraron mayor número de compuestos en la CCF mientras que los extractos metanólicos de hojas de San Luis Potosí fueron los que presentaron menor número de compuestos. Los extractos de *L. tridentata* absorben en la longitud de onda de luz UVB (280 nm) y UVC (235 nm).

Todos los extractos hexánicos son ricos en terpenos. Los extractos de diclorometano tienen compuestos fenólicos y terpenos. Así mismo, los extractos metanólicos fueron los únicos que tienen alcaloides además de compuestos fenólicos. Estos resultados corresponden al estudio de ambas

localidades y de ambas partes de la planta. Los extractos metanólicos de ramas (SLP) mostraron mayor cantidad de fenoles (30.46%).

Todos los extractos mostraron una eficiente actividad antioxidante, siendo el más activo el extracto en diclorometano de ramas de la localidad de San Luis Potosí con una CA50 de 1.78 ± 0.980 ppm.

2.0 Introducción

2.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y Radicales libres (RL)

En los últimos años del siglo XX se generó una verdadera revolución en el campo de las investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo, sobre todo debido a la relación que se cree existe entre éste, el envejecimiento y diversas enfermedades crónicas. Aunque este enigma aún no ha podido ser descifrado debidamente, el uso de las plantas y de los metabolitos secundarios que en ellas se encuentran ha sido una de las opciones para encontrar una manera de prevenir o disminuir los daños que el estrés oxidativo causa (Hernández, 2002).

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en el orbital más externo, lo que produce una gran reactividad en dicha sustancia. De hecho esto da lugar a que estos RL intervengan con gran eficacia y rapidez en un sinúmero de procesos bioquímicos a nivel celular. Su gran reactividad es la causante de su toxicidad (Hernández, 2008). Además de ser los causantes de la reactividad de las especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales incluyen a todos los metabolitos derivados del oxígeno molecular (O_2) que tienen mayor reacción que el O_2 tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y las moléculas no radicales como las del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ERO son generadas como producto del metabolismo aeróbico, pero su nivel de reacción se incrementa en condiciones de estrés, lo cual resulta ser un peligro para la salud (Rahal *et al.*, 2014).

2.2 Efectos biológicos de las ERO

Las ERO están involucradas en el desarrollo del cáncer, tanto por efectos directos sobre el ADN como por la transducción de modulación de señales, la proliferación celular, la senescencia y la muerte celular. El estrés oxidativo acelera el daño en el ADN, el cual se puede medir a partir de la ruptura de la cadena y modificaciones químicas de las bases de ADN o de desoxirribosa del ADN dañado, el cual es por lo general fragmentado, desaminado, dañado y eliminado por oxidación, lo que hace difícil su análisis o estudio para poder localizar los daños (Halliwell y Gutteridge, 2007).

2.3 Mecanismos y defensas antioxidantes

Los efectos biológicos de las ERO son controlados en los seres vivos por una gama de mecanismos fisiológicos de defensa antioxidante, que involucran a un complejo grupo de procesos, todos encaminados a evitar el exceso de oxidación a nivel celular, que es en definitiva, el que causa los trastornos. A la larga lo que los seres vivos necesitan es mantener un equilibrio interno correcto entre el nivel de ERO y el de antioxidantes. Existen diversos sistemas de defensa que participan

directamente, para tratar en todo momento de lograr el equilibrio antes mencionado, dichos sistemas son: enzimas antioxidantes, enzimas que eliminan o reparan las moléculas que han sido oxidadas y sustancias antioxidantes específicas (Hernández, 2008).

Los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar de diversas formas:

a) Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción. Por ejemplo, proteínas que acumulan o transportan metales de transición, como la transferrina, la hemoglobina y la mioglobina que transportan el oxígeno (Quintanar y Calderón, 2009).

b) Enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una ERO. Por ejemplo: La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del (H_2O_2) o lipoperóxidos (L-OOH) y la catalasa (CAT) que reduce el H_2O_2 a H_2O (Quintanar y Calderón, 2009).

c) Cosustratos antioxidantes son empleados por las enzimas para poder reducir parcialmente a los RL y a las ERO. Por ejemplo; el glutatión, es un tripéptido con gran facilidad para ceder electrones debido a su grupo sulfhidrilo (-SH) y su potencial redox (Quintanar y Calderón, 2009).

d) Enzimas que regeneran sustratos o cosustratos antioxidantes. Por ejemplo, las enzimas que regeneran al glutatión peroxidasa, la vitamina E y el NADPH. El glutatión se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de glutatión reductasa (GR). La vitamina E al actuar como antioxidante se oxida a tocoferilquinona, para regenerar su actividad antioxidante se requiere que se reduzca nuevamente a vitamina E, tal reducción la puede llevar a cabo el ascorbato (vitamina C).

e) Antioxidantes endógenos. Los antioxidantes son moléculas con gran afinidad a los radicales y que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas, es decir ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Una vez que los RL reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante. Ejemplos de estos antioxidantes en los organismos son: el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina (Quintanar y Calderón, 2009).

f) Antioxidantes exógenos. Son antioxidantes que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el β -caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el

magnesio, los polifenoles como las catequinas, los licopenos, los flavonoides como la quercetina, y los taninos (Quintanar y Calderón, 2009).

g) Sistemas de reparación. Son sistemas que tratan de recuperar la función de las macromoléculas dañadas, reparar el daño establecido o destruir la macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular. Por ejemplo, los daños producidos por RL en términos generales marcan las proteínas para su degradación. El reconocimiento de los sitios oxidados o halogenados o bien la exposición de regiones hidrofóbicas determinan el proceso de ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteosoma. En el caso de los lipoperóxidos se pueden reducir mediante GPx de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa *_A2_*, que aumenta su actividad durante la agresión oxidativa. Otro ejemplos es cuando el uso extensivo de sistemas de reparación o el intenso daño al ADN puede inducir el proceso de apoptosis, que visto de esta manera sería la muerte programada cuando la reparación es imposible o el daño fue extensivo, protegiendo al órgano y al organismo de daños locales y sistémicos, incluyendo el desarrollo de células cancerosas (Quintanar y Calderón, 2009).

2.4 Efectos de la radiación UV-B (280 – 320 nm) sobre la morfología de las plantas

La luz es uno de los factores más importantes que regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, el aumento de la radiación ultravioleta-B puede tener un impacto negativo en éstas, provocando una disminución de la fotosíntesis y de la producción de biomasa. Para que la radiación UV-B sea captada y produzca alteraciones en la fisiología de la planta debe penetrar en la hoja y ser absorbida por cromóforos o moléculas susceptibles al efecto dañino de esta radiación. Por lo tanto, los cambios morfológicos y anatómicos son inducidos por la radiación UV-B y pueden llegar a ser determinantes en las respuestas de las distintas especies vegetales (Ríos, 2009).

Por otra parte, las plantas aclimatadas a condiciones de alta radiación UV-B, como es el caso de *Larrea tridentata*, se caracterizan por tener tallos y ramas cortas, resultando plantas de morfología más bien compacta y de tamaño pequeño. Se ha sugerido que el mecanismo por el cual la radiación UV-B reduce la longitud del tallo sería la oxidación de fitohormonas inductoras del tamaño de las células. Uno de los parámetros de crecimiento que es notablemente alterado por un aumento de la radiación UV-B es el área foliar (Ríos, 2009).

2.5 Mecanismos de defensa ante los efectos de la luz UV-B en plantas

A lo largo de la evolución, la radiación UV-B ha inducido en las plantas diversos cambios anatómicos que han permitido modificar su absorción y penetración al interior de las células. Por ejemplo, el

aumento de ceras y el cambio en la composición de éstas en la superficie foliar observado en especies expuestas a UV-B, favorece la reflexión de la luz UV-B desde la superficie foliar y contribuye a reducir la penetración de la radiación UV-B en las hojas. El aumento del grosor de las hojas es otro de los cambios anatómicos en plantas expuestas a luz UV-B. Esto se debe al aumento del grosor de la pared celular como consecuencia de la inducción de síntesis de lignina y otros polifenoles (Ríos, 2009).

2.6 Acción de la luz UV-B sobre procesos fitoquímicos y metabólicos en plantas

Componentes de la radiación solar pueden afectar el crecimiento de los cultivos directamente a través de sistemas de fotosíntesis, hasta la regulación de las vías que producen compuestos de defensa (por ejemplo, los flavonoides y compuestos fenólicos relacionados o ceras), disminución del crecimiento vegetativo, y la disminución de los tiempos de desarrollo. En contraste, el componente de la radiación solar UVB también tiene una gama de efectos sobre la invasión de agentes patógenos que incluyen daño al ADN y de proteínas, afectando así respuestas metabólicas y fisiológicas del organismo (Young *et al.*, 2012).

Uno de los mecanismos de adaptación a radiación UV-B más documentado es el aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides, los que se acumulan en las células de la epidermis de diversas especies vegetales, y por ser compuestos que absorben radiación entre los 280-360 nm, reducen el efecto deletéreo de la luz UV-B sobre los distintos componentes celulares (Ríos, 2009).

2.6.1 Acción de la luz UV-B sobre procesos metabólicos en humanos y animales

El ADN es particularmente sensible a radiación UV-B, debido a que los fotones de la luz ultravioleta promueven transiciones $\pi-\pi^*$ en las bases nitrogenadas que constituyen los nucleótidos alterando directamente el establecimiento normal de enlaces químicos. La fototransformación producida en el ADN afecta principalmente a bases de timina adyacentes, las que por efecto de la radiación forman estructuras cíclicas denominadas dímeros de ciclobutano de pirimidinas (CPD) (Ríos, 2009).

Tanto en las plantas como en los animales la información genética que codifica para la gran mayoría de las proteínas está codificada en el ADN nuclear. Sin embargo, los cloroplastos y mitocondrias contienen algo de ADN que codifica unas pocas proteínas. Las especies reactivas pueden dañar el ADN mitocondrial y del cloroplasto; el daño en el ADN mitocondrial se ha sugerido que es importante en varias enfermedades humanas y en el envejecimiento (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Por su parte el daño a las proteínas puede ocurrir por el ataque directo de las ERO o por el daño secundario que impliquen ataque de los productos finales de la peroxidación lipídica.

Las técnicas proteómicas revelan que a menudo solo un pequeño número de proteínas están dañadas cuando las células se someten a estrés oxidativo, aunque los mecanismos de esta selectividad sigan sin estar claros (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Debido a lo anterior, es necesaria la búsqueda de productos naturales que puedan actuar como sustancias que inhiban, retarden o reviertan los diferentes daños producidos a nivel celular por los radicales libres o por la RUV (Afaq *et al.*, 2005). Las plantas que viven en zonas de intensa radiación solar son ideales para la búsqueda de este tipo de sustancias (García-Bores, 2010). Es por eso que se decidió estudiar la especie *L. tridentata*.

3.0 *Larrea tridentata* (Moc. & Sessé ex DC.) Cov.

L. tridentata, también conocida como Chaparral, Matorral, Creosota, Gobernadora o Hediondilla, es una planta arbustiva que pertenece a la familia Zygophyllaceae, que incluye más de treinta géneros y unas 250 especies (Figura 1) (Jones, 1987). Las especies que caracterizan a esta familia son herbáceas o raramente leñosas, a menudo xerófilas y halófilas, sus hojas pueden ser opuestas, alternas, pinnaticompuestas o pinnatiséptas y estipuladas, sus flores son hermafroditas, actinomorfas, pentámeras o tetrámeras: solitarias o dispuestas en cimas y por último sus frutos son capsulares, esquizocárpicos o carnosos, bayas (<http://www.conabio.gob.mx>).

L. tridentata es un arbusto común en los desiertos cálidos de Norte América (Sinnott *et al.*, 1998; Arrieta *et al.*, 2012). Su dominio se ha incrementado en 19 millones de hectáreas de tierras que antes se consideraban pastizales del desierto en respuesta a perturbaciones tales como el pastoreo (Arteaga *et al.*, 2005).

L. tridentata es de origen sudamericano, con una distribución discontinua (Lia *et al.*, 2001). Al área cubierta por gobernadoras, se le denomina chaparral, debido a su tamaño pequeño. Estos chaparrales son abundantes en las zonas desérticas de los estados mexicanos como San Luis Potosí, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sonora, Zacatecas, Baja California Norte y Sur y en el suroeste de los Estados Unidos como Arizona, California, Nevada, Texas y Nuevo México (Rzedowsky y Huerta, 1994). La planta segrega un olor penetrante y tiene un sabor amargo lo cual es desagradable para el ganado y aún más para la fauna silvestre, suele ser tóxico y a veces causa la muerte (Gay y Dwyer, 1998).



Figura 1. *Larrea tridentata* (www.fireflyforest.com)

De acuerdo con Rzedowsky (1992) la gobernadora es la planta mexicana mejor adaptada a condiciones de aridez, ya que puede vivir aun en las condiciones más extremas que se presentan en México, sin ser una planta suculenta, ni presentar espinas y además ser perennifolia.

L. tridentata se utiliza en una variedad de formas aprovechando sus múltiples propiedades. Tradicionalmente las hojas y las ramas son preparadas en forma de té, para su consumo oral. Éste en México es utilizado como tratamiento de piedras en el riñón y de la vesícula biliar (Díaz, 1976), así como para trastornos digestivos, reumatismo, enfermedades venéreas, herpes, bronquitis, varicela y el resfriado común (Sinnott *et al.*, 1998; Arrieta *et al.*, 2012).

3.1 Descripción botánica

L. tridentata es un arbusto perennifolio que mide de 1 a 3 m de altura, y raramente alcanza los 4 m. Los tallos de la planta llevan hojas resinosas, verdes oscuras, con dos folíolos unidos en la base, cada folíolo de 7 a 18 mm de largo y de 4 a 8.5 mm de ancho. Las flores son de hasta 2.5 cm de diámetro y tienen cinco pétalos amarillos y con garras. El fruto es una cápsula redonda, cubierta por una densa concentración de canas (Figura 2) (De la Cerda, 1967).

L. tridentata es perenne, conservando la mayor parte de sus hojas a través de la sequía y las bajas temperaturas dentro de su rango de distribución, sin sufrir daños. Heladas periódicas y extremas pueden contribuir a limitar la distribución actual de la especie, ya que induce la congelación del xilema y la cavitación (Martínez-Villalta y Pockman, 2002).

La gobernadora es intolerante a suelos compactos y con alto contenido de fósforo. El tiempo de vida de la especie está negativamente correlacionado con la perturbación y la compactación del suelo. Este arbusto crece en los sitios más secos de México, en terrenos planos, laderas, lomeríos bajos (originados de materiales geológicos del cretácico superior e inferior) y en planicies aluviales. Es un chaparral que se desarrolla en lugares con temperaturas de 14 a 28°C y presencia de 8 meses de sequía, en climas áridos (BS) y muy áridos (BW) y en precipitaciones de 150 a 500 mm anuales. La planta no prospera en zonas de clima isoterma. Los suelos en los que se desarrolla son de profundidad variable, textura franco arenosa, estructura granular, drenaje interno medio de consistencia friable, de color café grisáceo, compacto arcilloso, calcáreo, blanco-arenoso, aluvial con pH de 6.8 a 7.6. (<http://www.conabio.gob.mx>).

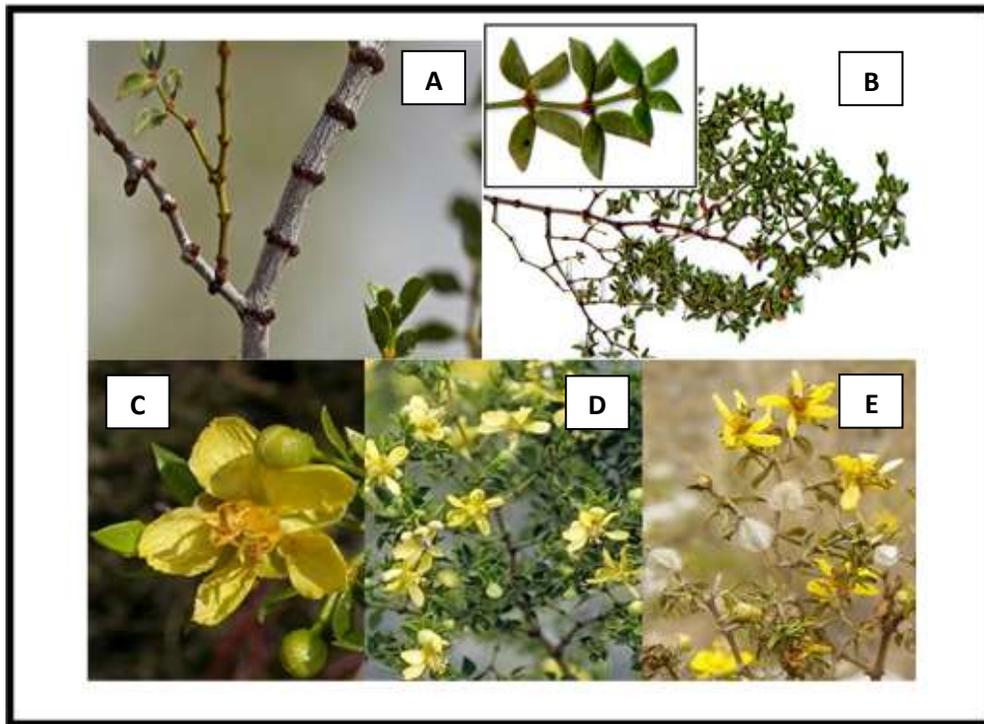


Figura 2. Descripción botánica de *Larrea tridentata*. Las letras en cada panel representan cada una de las partes que conforman a la planta, **A**; tallo, **B**; hojas, **C**; flor y fruto, **D**; vista aérea de la flor, **E**; semilla y flor (www.fireflyforest.com).

L. tridentata es una fuente notable de productos naturales los cuales ocupan el 50% del peso seco. En la resina presente en las hojas se han encontrado los siguientes compuestos: 19 agliconas de flavonoides, varios lignanos, incluyendo notablemente el antioxidante, ácido nordihidrohuaiarético (NDGA) (Konno *et al.*, 1990), así como algunos flavonoides glicosilados, sapogeninas, aceites esenciales y alcaloides halogenados (Figura 3) (Villamar Argueta, 1994).

3.2 Antecedentes de *L. tridentata*

Barrera en 1981, extrajo en dos fracciones la resina, la primera denominada fracción liposoluble que fue extraída con solventes comúnmente utilizados en la extracción de aceites y grasas. Y la fracción polar fue extraída con solventes para sustancias hidrofílicas.

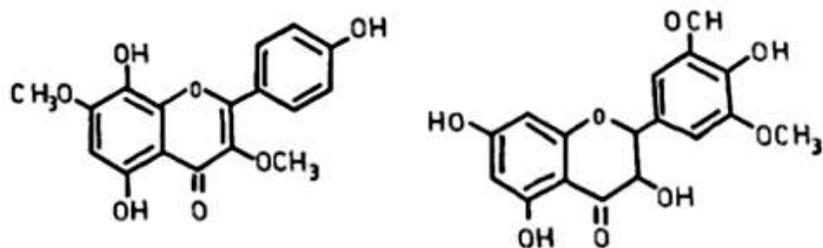
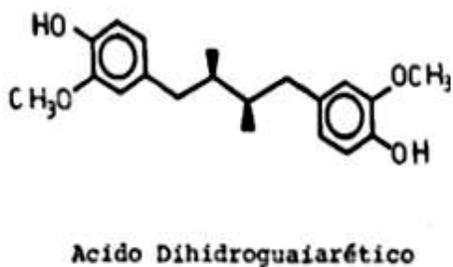
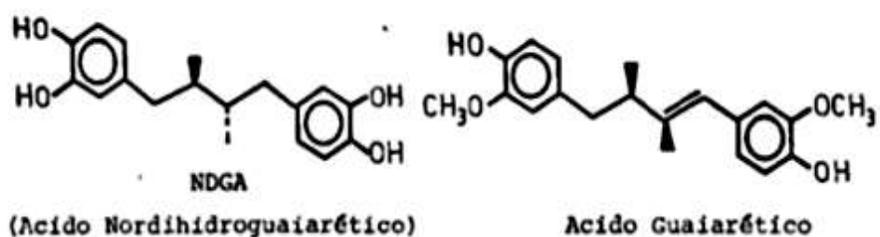
Algunas de las aplicaciones de la resina de *L. tridentata* son mencionados en el Cuadro 1 entre la que destacan su utilización en la agricultura como fungicida siendo probado *in vitro*. Así como también ha mostrado resultados positivos *in vivo* contra la viruela del árbol algodonero (*Puccinia cacabata*). Esto último evitaría el uso de fungicidas con cobre y evitaría la contaminación de la tierra por sales de cobre. Finalmente otra aplicación de la resina de *L. tridentata* siendo en este caso la fracción liposoluble la cual llena los requisitos de calidad antioxidante para hules naturales y sintéticos.

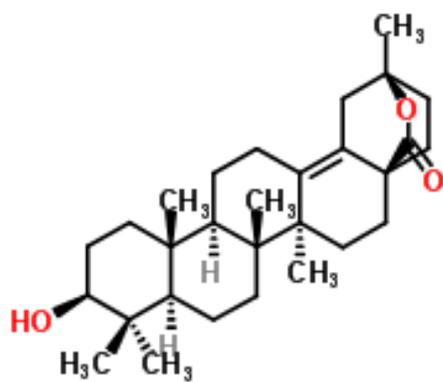
Mabry y Bohnstedt (1981) y Xue *et al.* (1988) reportaron en estudios previos que el 0.1% de peso seco de la planta, se encuentra en forma de aceites esenciales; la fracción volátil tiene 67 compuestos que han sido identificados que constituyen más del 90% de los aceites del arbusto y el restante 10% es una mezcla de más de 300 componentes, principalmente monoterpenoides y sesquiterpenoides aromáticos. Los productos de la vía de ácido mevalónico, shikímico y ácidos grasos son los más predominantes en las hojas (Cuadro 2). De igual manera se han identificado tres esteroides comunes: campesterol, estigmasterol y sitosterol (Mabry y Bohnstedt, 1981). Con respecto a los alcaloides, estos se han aislado de la corteza y las raíces pero no de hojas ni flores (Márquez Lara, 1996).

En estudios anteriores con *L. tridentata* se ha encontrado que entre el 5 y el 10% del peso seco de las hojas corresponde al ácido nordihidrohuarético (NDGA), mientras que el 80% de todos los compuestos fenólicos se encuentra en la resina. En un estudio sobre la distribución de los productos fenólicos secundarios se encontró que las flores, hojas, tallos verdes y tallos leñosos contienen NDGA, siendo mayor la concentración en las hojas con un 38.3 mg/g, mientras que en los tallos verdes y leñosos es de 32.5 mg/g (Hyder *et al.*, 2002).

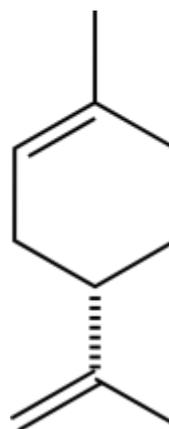
Cuadro 1. Aplicaciones industriales de la resina *Larrea tridentata* (Barrera, 1981)

Fracción Lipofílica	Fracción polar
Antioxidantes	Materiales bioactivos
Adhesivos fenólicos	Aplicaciones médicas
Barnices	
Estabilizadores celulósicos	
Aplicaciones médicas	

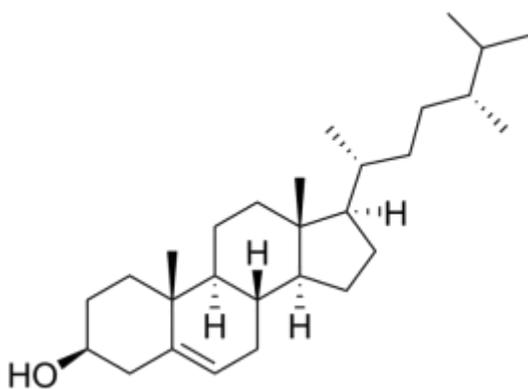




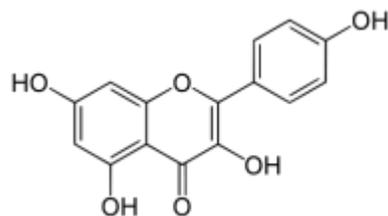
Larreagenina A



Limoneno



Campesterol



Kaempferol

Figura 3. Lignanos, algunas agliconas de flavonoides (Barrera, 1981) saponinas, alcaloides, aromáticos, flavonoides y esteroides presentes en la resina de *L. tridentata* (Agmatine.png)

Cuadro 2. Principales constituyentes fitoquímicos de *Larrea tridentata* (Lira-Saldívar, 2008).

Porcentaje del peso seco	Tipo de compuesto	Compuesto
16-21	Lignanos compuestos	Ácido dihidroguaiarético Hemi-norisoguaiacina Ácido nordihidroguauarético Nordihidroguaiacina
5-7	Flavonoides	Apigenina Kaempferol
10-15	Saponinas Triterpenos	Larreagenina A Ácido Larréico
0.1-0.2	Monoterpenos volátiles Hidrocarburos 35 Aromáticos Esteroides Taninos Carbohidratos	Alfa pineno Delta-3-careno Limoneno Benzaldheído Benzilacetato Benzilbutano Metil naftaleno Beta-sitosterol Colesterol Campesterol Sacarosa
70.1 (de tallos) 16.6	Lípidos Aminoácidos	Alquil esterres (C46-C56) Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspártico

		Glicina
19.8 mg/ 100 gr	Vitaminas	Caroteno Vitamina C
13.7	Minerales	Sodio Potasio Calcio Magnesio Hierro Azufre Fósforo

4.0 Justificación

Debido a que *L. tridentata* es un arbusto que se encuentra constantemente expuesta a diversos tipos de estrés en su zona de distribución y esto no afecta ni el crecimiento ni el desarrollo de la planta, es posible que cuente con propiedades fitoquímicas que le favorecen para adaptarse sin importar la estación del año. Además, esto podría indicar que contiene compuestos con una eficiente actividad antioxidante que le permiten protegerse de las altas radiaciones tipo UV-B de su zona de distribución y por lo tanto estos compuestos podrían tener el mismo efecto a nivel medicinal o farmacéutico.

4.1 Hipótesis

Debido los cambios climáticos tan extremos a los que se enfrenta la especie *L. tridentata* en su zona de distribución, su composición química se modifica y sus propiedades biológicas se alteran.

4.2 Pregunta científica

¿*L. tridentata* modificará su actividad antioxidante así como su composición fitoquímica en general dependiendo de la zona de colecta o de las condiciones climáticas en las que se encuentra cada una de las muestras?

5.0 Objetivos

5.1 Objetivo general

- Analizar y evaluar el contenido fitoquímico y la capacidad antioxidante de hojas y ramas de la especie *Larrea tridentata* de dos localidades áridas de México.

5.2 Objetivos particulares

- Analizar el contenido fitoquímico y comparar los componentes de los extractos de hoja y rama de la especie *L. tridentata* de dos localidades áridas de México.
- Evaluar y comparar la capacidad antioxidante entre los extractos de hoja y rama de *L. tridentata* de dos localidades áridas de México
- Determinar cuantitativamente el porcentaje de fenoles presentes en los extractos de hojas y rama de *L. tridentata* de dos localidades áridas de México

6.0 Metodología

6.1 Colecta

Larrea tridentata se recolectó en dos diferentes zonas, la primera en la localidad El Huizache, que se encuentra en el estado de San Luis Potosí (SLP), municipio de San Luis Potosí. El cual se localiza entre los 21°30' y 24°34' de latitud norte y los 100° 15' y 102°20' de longitud oeste (Salas de León *et al.*, 1999) (Figura 4).

El Huizache en el municipio de Guadalcázar y Matehuala, los meses más secos suelen ser de noviembre a abril (García, 1973). La colecta de *L. tridentata* se realizó en el mes de diciembre del año 2012. La zona de colecta se caracteriza por estar delimitada por un macizo montañoso con rocas sedimentarias en cuya parte alta se encuentra vegetación templada, principalmente de pino-encino, con algunas áreas de pastoreo y cultivos. En la parte baja se presenta vegetación xerófila tal como matorral crasicaule, matorral submontaño y pastizal natural. Se caracteriza por presentar especies de mamíferos endémicos, como las del género de roedores *Peromyscus* de la familia Cricetidae, son conocidos como hámster o ratas campestres. El tipo de clima que presenta es semiárido, templado donde la temperatura media anual es entre 12 y 18°C, la del mes más frío es entre los -3 y 18°C, mientras que las más caliente no llega a los 22°C con lluvias en verano del 5% al 10.2% anual. El tipo de suelo que presenta es somero, limitado en profundidad por una roca dura continua o por una capa continua cementada dentro de una profundidad de 10 cm a partir de la superficie (www.conabio.gob.mx).

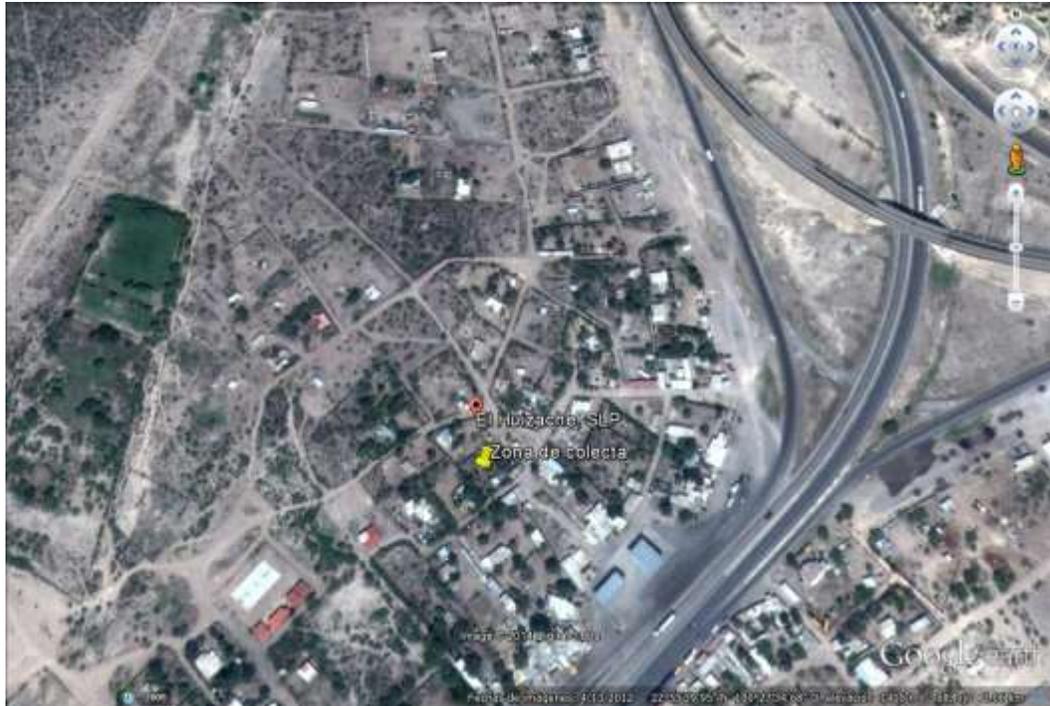


Figura 4. Localización geográfica de El Huizache, San Luis Potosí, México.

La segunda localidad fue el Valle de Guadalupe en Ensenada (ENS), Baja California que se encuentra en la carretera federal No. 3, en la terracería a L.A Cetto (Figura 5). El puerto de Ensenada está localizado en la Costa del Océano Pacífico, aproximadamente a 130 Km al sur de la frontera norte entre México y los Estados Unidos. Fundamentalmente existen dos tipos genéricos de climas: El templado que se presentan en las partes altas de las sierras y el seco que se localizan en el resto del municipio. El bosque de Coníferas, el chaparral y el matorral desértico, comprendiendo una superficie aproximada de 4.8 millones de hectáreas (en el estado) de las cuales 164,000 corresponden al bosque (www.bajacalifornia.gob.mx).



Figura 5. Localización geográfica de Valle de Guadalupe, Ensenada, Baja california.

Una vez colectado el material vegetal se herborizó. Se separó un ejemplar para su depósito e identificación en el herbario IZTA de la FES- Iztacala de la UNAM.

6.2 Extracción

Ya en el laboratorio, las hojas y ramas de ambas plantas se separaron y pesaron. Para el material vegetal colectado en SLP se pesaron 292.9 gr tanto de hojas como de ramas y para el colectado en ENS se pesaron 67.2 gr de hojas y 45 gr de ramas. Se prosiguió con la maceración de ambas plantas colectadas.

Los extractos de los tallos y ramas de *L. tridentata* se maceraron primero en hexano, dejándolo reposar ocho días, posteriormente mediante destilación a presión reducida se concentró el extracto. Se fue cambiando de solvente tomando en cuenta los niveles de polaridad de menor a mayor iniciando con diclorometano y por último metanol. Se determinó el rendimiento por diferencia de peso de todos los extractos.

6.3 Pruebas cualitativas – colorimétricas

6.3.1 Reacción de Molisch para glucósidos

Este ensayo permite detectar la presencia de hidratos de carbono en una muestra; se basa en la acción hidrolizante y deshidratante que ejerce el ácido sulfúrico sobre estos compuestos. Los ácidos concentrados originan una deshidratación de los azúcares para rendir furfurales, que son derivados aldehídicos del furano. Los furfurales se condensan con los fenoles para dar productos coloreados característicos, empleados frecuentemente en el análisis colorimétrico (Figura 6) (Berezov, 1992; Díaz *et al.*, 2006).

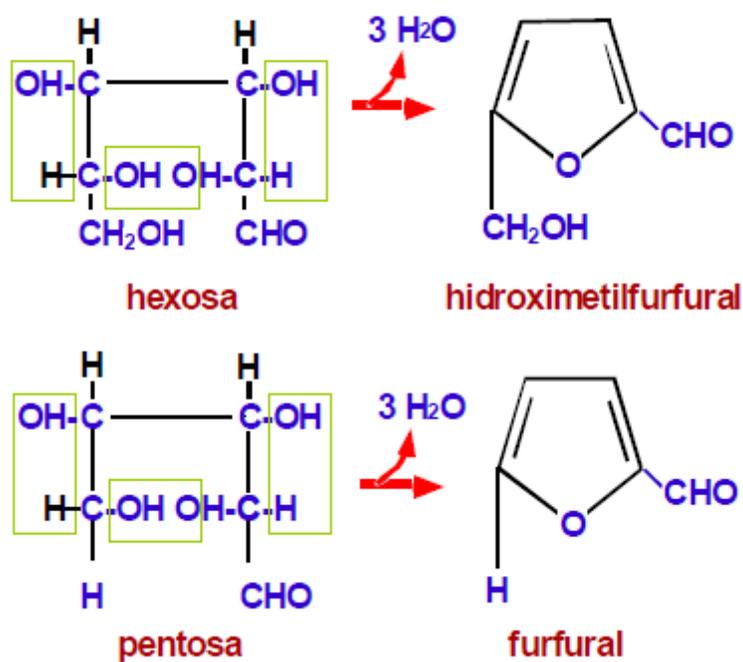


Figura 6. Formación de furfurales (Díaz *et al.*, 2006)

Los monosacáridos como ya se mencionó anteriormente al entrar en contacto con un medio ácido se deshidratan dando origen a los anillos de furfural, mientras que los oligo y polisacáridos también sufren estas reacciones, ya que el medio ácido favorece la hidrólisis previa del enlace glicosídico. Aunque es una prueba específica de monosacáridos, los oligo y polisacáridos también dan positivo, ya que en medio ácido se hidroliza el enlace glicosídico.

Se disponen de diferentes técnicas, dependiendo del reactivo utilizado (α -naftol) (Figura 7) (Berezov, 1992; Díaz *et al.*, 2006).

Procedimiento:

- 1) En un tubo de ensaye a temperatura ambiente se deposita la solución problema (extracto de *L. tridentata* (5 mg en 5 ml)) y reactivo de Molisch (Mezclar α -naftol al 5% y etanol)
- 2) Se añade 2 gotas de H_2SO_4 por las paredes del tubo
- 3) En caso de ser una reacción positiva un anillo de color violeta se separará del H_2SO_4

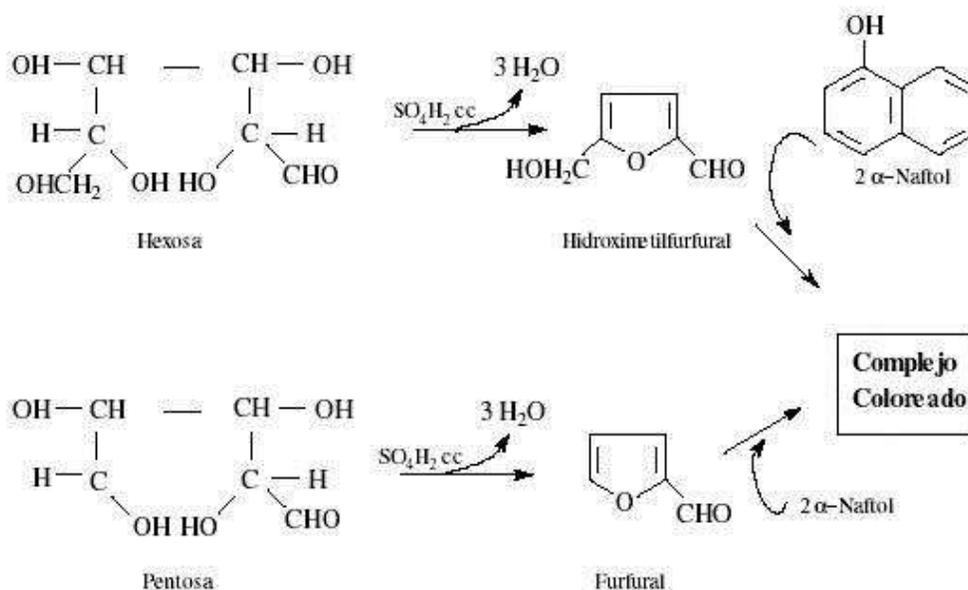


Figura 7. Reacción de Molisch (Díaz *et al.*, 2006)

6.3.2 Reacción con cloruro férrico para fenoles

Los fenoles sencillos se caracterizan por su solubilidad en los álcalis e insolubilidad en bicarbonato sódico, aunque debemos tener presente que ciertos fenoles sustituidos (por ejemplo, el *p*-nitrofenol) son ácidos más fuertes que el fenol. La mayor parte pero no todos de los fenoles dan complejos fuertemente coloreados con las sales férricas. La coloración con el cloruro férrico es un ensayo de aplicación en el reconocimiento de fenoles. Ocasionalmente, el color dado por un fenol con el $FeCl_3$ puede servir de ayuda para la determinación de la estructura. La pirocatequina y otros *o*-hidroxi derivados del benceno dan coloraciones verdes (Figura 8) (Geissman, 1974).

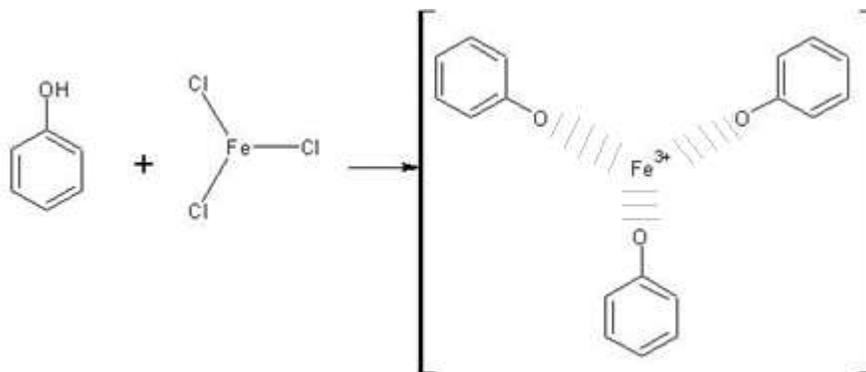


Figura 8. Reacción del FeCl₃ con un fenol (McMurry, 2001)

Procedimiento:

- 1) Diluir los extractos (5 mg en 5 ml) en cada uno de los solventes con los que fueron macerados
- 2) Agregar gotas de solución de coluro férrico diluido (saturado).
- 3) La reacción será positiva si se obtiene una coloración roja, azul, verde o púrpura.

6.3.3 Reacción de Dragendorff y Mayer para alcaloides

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos) de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno formando precipitados (Acosta, 2008).

En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: bicloruro de mercurio y yoduro de potasio (reactivo de Mayer), los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol.

También se usa el tetrayodo bismuto de potasio (reactivo de Dragendorff), donde la presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se la adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides (Figura 9) (Acosta, 2008).

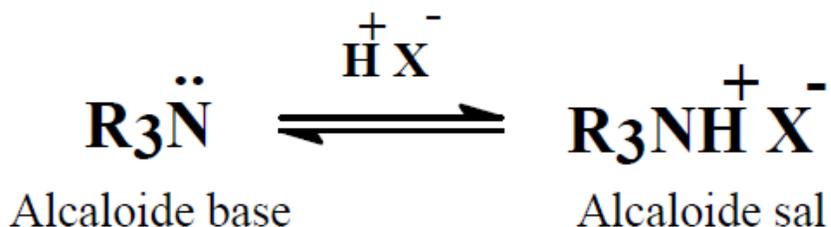


Figura 9. Reacción de los alcaloides en función del pH (Acosta, 2008)

Puesto que los alcaloides son compuestos de carácter básico, su solubilidad en los diferentes solventes varía en función del pH, es decir según se encuentre en estado de base o de sal:

En forma de base, son solubles en solventes orgánicos no polares como benceno, éter etílico, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo, entre otros. En forma de sales, son solubles en solventes polares como agua, soluciones ácidas e hidroalcohólicas (Figura 10) (Acosta, 2008).

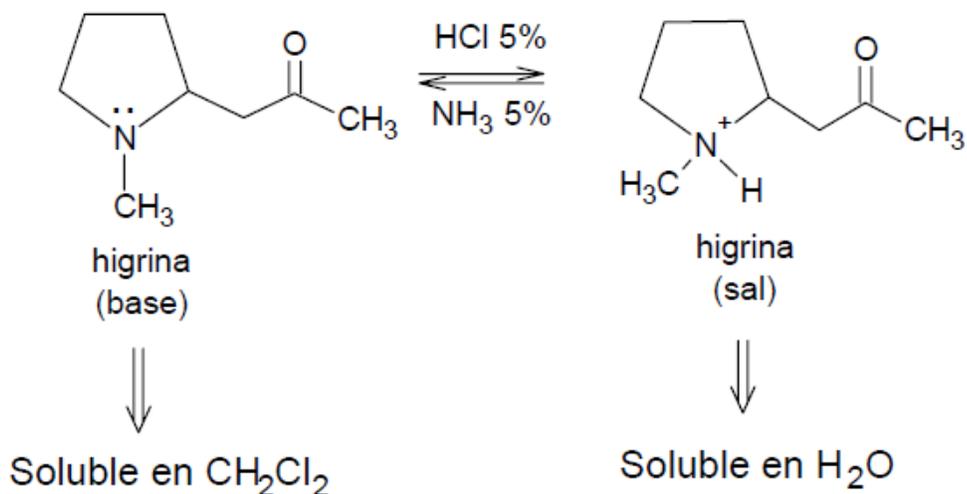


Figura 10. Solubilidad de los alcaloides (Acosta, 2008)

Procedimiento para el reactivo Dragendorff

(Mezclar 8 gr de nitrato de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 + 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de HNO_3 al 30% con una solución de 27 gr de KI en 50 ml de agua):

- 1) Diluir los extractos (5 mg en 5 ml) en cada uno de los solventes con los que fueron macerados
- 2) Agregar gotas del reactivo resbalando por las paredes del tubo
- 3) La reacción será positiva si se observa la formación de un precipitado color naranja-rojizo

Procedimiento para el reactivo Mayer (Disolver 1.3 gr de HgCl_2 en 60 ml de agua, agregar 5 gr de KI y aforar a 100 ml):

Se repiten los pasos 1 y 2 del procedimiento para el reactivo de Dragendorff. La reacción será positiva si se observa un precipitado arenoso de color blanco o color crema.

6.4 Método cromatográfico

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica analítica rápida y sencilla, la cual permite determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras y realizar el seguimiento de una reacción (www.uam.es).

Los extractos se analizaron por CCF mediante cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice (0.2mm de espesor). Como agentes cromogénicos se emplearon: a) Revelado con luz UV a 254 y 366 nm, b) Solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado (García-Bores, 2010), c) revelador de productos naturales (RPN) y d) 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•). La CCF se realizó con el fin de lograr identificar la variación de compuestos presentes en cada uno de los extractos de ambas partes de la planta. El uso de diferentes agentes cromogénicos permitió conocer las características fitoquímicas, así como la abundancia de compuestos específicos dentro de cada una de las muestras.

6.5 Estudio espectroscópico

La espectroscopía ultravioleta utiliza la radiación del espectro electromagnético cuya longitud de onda está comprendida entre los 100 y los 400 nm; su efecto sobre la materia orgánica es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y/o moleculares de la sustancia. Se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa y cualitativa de soluciones de iones metálicos de transición y para detectar compuestos orgánicos conjugados (McMurry, 2001).

Los barridos en la región UV del espectro electromagnético se obtuvieron pesando 5 mg de cada uno de los extractos diluidos en 5 ml de cada uno de los solventes con los que fueron macerados y de esa forma se determinaron los picos máximos de absorción (λ_{max}) (McMurry, 2001). El equipo utilizado para esta técnica fue el "T80+ UV/VIS SPECTROMETER, PG, Instrument, Ltd."

6.6 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases (CG) y su acoplamiento con la espectrometría de masas (EM); constituyen una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Cromatografía de gases

En la CG, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas de la muestra; su única función es la de transportar la sustancia a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía de gas-sólido y la cromatografía de gas-líquido. La cromatografía gas-liquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia como cromatografía de gases (CG). La CG se basa en la distribución de la muestra entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (Gomis, 2008).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (EM), es una técnica de análisis cualitativo, de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por si sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría (Gomis, 2008).

La EM está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos. La presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa, será en función de la estructura química de cada compuesto (Gomis, 2008).

El equipo utilizado para esta técnica fue el cromatógrafo “Agilent Technologies, 6850, Network GC Systems” y “Agilent Technologies, 5975C, VL MSD, con detector de triple eje”.

6.7 Actividad antioxidante

La capacidad de atrapar radicales libres del extracto y los compuestos aislados de *L. tridentata* se determinó midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de la 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•, Sigma D-9132) al 250 µM. El radical libre de la difenilpicrilhidracina tiene un máximo de absorción a los 517nm, cuando es reducido por un compuesto antioxidante la coloración desaparece (Figura 11) (García-Bores, 2010).

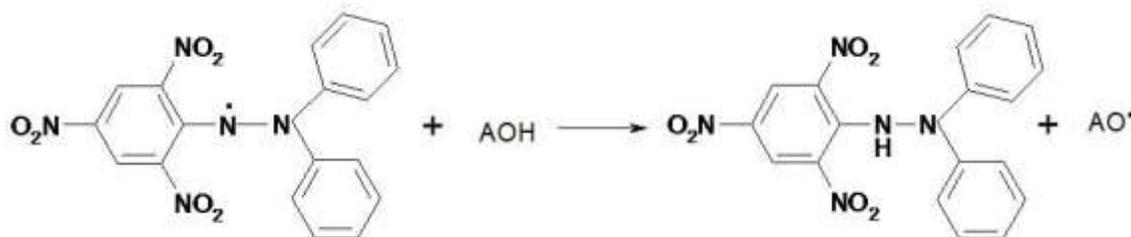


Figura 11. Reducción del radical 2,2-difenil-1 picril-hidracilo

Para determinar la capacidad antioxidante media (CA50) de los extractos metanólicos y de diclorometano de *L. tridentata* de ambas localidades se obtuvo el porcentaje de decoloración del DPPH• de cada una de las concentraciones de los extractos (2 a 50 ppm). El porcentaje de decoloración se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación (Villaño *et al.*, 2007):

$$\% \text{ de decoloración} = 1 - (\text{absorbancia del problema} / \text{absorbancia del blanco}) \times 100$$

La CA50, expresa la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% al radical DPPH• (García-Bores, 2010). Valores bajos de CA50 indican un mayor potencial antioxidante. Como sustancia de referencia se utilizó quercetina (0.5 a 200 ppm). Como blanco se utilizó metanol.

La prueba estadística de ANOVA de dos factores ($P < 0.05$) se realizó para demostrar si existen diferencias significativas con los datos de decoloración media de cada uno de los tratamientos tanto de las partes de la planta (hoja y rama), como de las distintas localidades (ENS y SLP).

6.8 Cuantificación total de fenoles - Prueba cuantitativa

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutierrez *et al.*, 2008). La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente a 760nm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico que es utilizado como estándar de referencia (Serrano, 2007). El espectrómetro utilizado fue el "T80+ UV/VIS spectrometer, PG, Intrument Ltd."

Procedimiento:

- 1) Pesar 5 mg de cada uno de los extractos y de ácido gálico. Diluir cada uno en 75 ml; los extractos en metanol y el ácido gálico en agua destilada.
- 2) Preparar una curva patrón con ácido gálico, a partir de la solución estándar (paso 1).
- 3) Tomar las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de ácido gálico (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 5 mg/ml) para un volumen final de 3ml.
- 4) Para las repeticiones, llenar con 4ml de agua destilada y pasar de la curva previamente preparada 1ml a cada tubo de las repeticiones

- 5) Para el análisis en los extractos, se preparó de igual manera una curva de calibración a partir de la solución estándar (paso 1).
- 6) Repetir el paso 3. Las concentraciones dependieron del tipo de extracto a analizar. Extractos metanólicos: 0.5 mg/ml. Extractos hexánicos y en diclorometano; 0.25, 0.5, 1 y 3 mg/ml.
- 7) Repetir paso 4.
- 8) Una vez hechas las diluciones en cada una de las repeticiones se agrega a todos los tubos 500µl de reactivo de Folin, 1.5 ml de carbonato de sodio
- 9) El volumen final fue de 10 ml por tubo.

7.0 Resultados y discusión

7.1 Datos de herbario del material vegetal

La determinación de la especie fue realizada por la M. en C. Ma. Edith López Villafranco, responsable del Herbario IZTA de la FES-Iztacala. Los datos correspondientes se encuentran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Datos de herbario de *Larrea tridentata*:

Nombre Científico	Familia	Nombre popular	No. de registro
<i>Larrea tridentata</i> (Moc. & Sessé ex DC.) Cov.	Zygophyllaceae	Creosota, Gobernadora y Hediondilla.	2140IZTA

7.2 Rendimiento de los extractos

Al realizar la maceración de cada una de las partes de *L. tridentata* de ambas localidades se obtuvieron los siguientes rendimientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Rendimiento de los extractos de *Larrea tridentata*.

<i>L. tridentata</i>		Rendimiento (%)		
Extracto	Peso seco (gr) Material vegetal	Hexano	Diclorometano	Metanol
SLP, hojas	292.9	1.02	13.31	23.56
SLP, ramas	292.9	0.14	9.56	15.70
ENS, hojas	67.2	0.33	5.95	11.85
ENS, ramas	42.5	0.56	14.12	11.76

Los extractos metanólicos de *L. tridentata* de ambas localidades fueron los que presentaron mayor rendimiento, coincidiendo también con un porcentaje mayor en las hojas de ambas. Mientras que el extracto de ramas de diclorometano fue el único de esta polaridad que presentó el rendimiento más alto. Es a partir del primer resultado que se puede considerar la presencia de compuestos como agliconas de flavonoides, lignanos y el ácido nordihidrohuaiarético (NDGA), ya que en estudios anteriores, éstos han sido encontrados en la resina de las hojas por Konno *et al* en 1990.

La resina es una secreción orgánica que producen muchas plantas, es muy valorada por sus propiedades químicas. Ésta es una mezcla compleja de terpenos, ácidos resínicos, ácidos grasos entre muchos otros productos naturales, producida por un organismo vivo encontrado en la naturaleza que tiene generalmente una actividad farmacológica o biológica para su uso en el descubrimiento de fármacos y drogas (Gutiérrez y Estévez, 2009). La proporción de cada componente es función de la especie arbórea y el origen geográfico. Valores típicos son: 60-75 % de ácidos resínicos, 10-15 % de terpenos y 5-10 % de sustancias variadas y agua (Hernández, 2009).

El alto contenido fitoquímico sobretodo en las hojas resinosas, podría ser uno de los factores a los que se le atribuyen la eficiente distribución de la especie *L. tridentata*. Es en esta parte de la planta, donde pueden ser detectados los metabolitos secundarios. Las hojas resinosas proveen una segunda línea de defensa en varias plantas, ya que pueden ser un obstáculo para la alimentación de insectos (Lira-Saldivar, 2003).

Lo más importante es que al menos el 50% de las especies de angiospermas, contienen metabolitos secundarios extras a los antes mencionados, presentes en la resina como esteroides, flavonoides metilados, etc. en la superficie de las hojas mezclados en las resinas (Dey y Harborne, 1997). Estas sustancias tienen propiedades de protección y estructural como es el caso de los lignanos, a los cuales se les atribuye también la actividad antioxidante ante radicales libres en las plantas (Croteau *et al.*, 2002).

Los tallos de *L. tridentata* tienen hojas resinosas (Figura 12) (De la Cerda, 1967). Una de las modificaciones en aquellas plantas que se encuentran altamente expuestas a radiación ha sido el aumento de ceras y resinas así como el cambio en la composición de éstas en la superficie foliar, ya que esto favorece la reflexión de la luz UV en las hojas y contribuye a reducir la penetración de la radiación (Ríos, 2009).

Esto concuerda con el estudio realizado por Dey y Harborne en 1997 en donde menciona que la resina presente en *L. tridentata* tiene un alto contenido de flavonoides tales como el NDGA y a los que también atribuyen la actividad repelente para insectos y ganado además de antioxidante.



Figura 12. Hojas de *L. tridentata*

7.3 Pruebas cualitativas – colorimétricas

Este método fue empleado para la identificación de productos naturales como: glucósidos, terpenos, fenólicos y alcaloides. Los resultados obtenidos se pueden observar en el Cuadro 4.

Los extractos macerados en hexano de ambas partes de la planta y de ambas localidades dieron positivos con vainillina (fuerte coloración púrpura) y fueron negativos en las demás pruebas, por lo que los extractos hexánicos de ambas localidades son ricos únicamente en terpenos.

Por su parte, los extractos en diclorometano de ambas partes de la planta y de ambas localidades mostraron una reacción positiva para la prueba con cloruro férrico (fenoles) así como con vainillina (terpenos). El extracto de ramas diclorometano de la localidad de SLP fue el único positivo para Molisch (glucósidos), lo que podría tratarse de flavonoides glicósidos.

Por último, los extractos metanólicos de ambas partes de la planta y de ambas localidades mostraron reacciones positivas con cloruro férrico (fenoles). Además de ser los únicos extractos en ser positivos para Dragendorff (alcaloides). Siendo los extractos de la localidad de SLP los que dieron reacciones con mayor coloración (Cuadro 5) y también los de mayor rendimiento.

El tipo de compuestos encontrados con mayor frecuencia en todos los extractos de *L. tridentata* de ambas partes de la planta y de ambas localidades en las pruebas colorimétricas fueron los fenólicos.

Recordando que uno de los fenoles más importantes presentes en la especie es el NDGA. Éste es uno de los antioxidantes mejor conocidos y que dicho por Seigler y colaboradores en 1974 es el compuesto que más predomina en la resina de las células cercanas a las capas epidermales superiores de las hojas y tallos.

La concentración de NDGA es cerca del 50% de la resina que forma parte de un 10 a 15% de peso seco de las hojas (Sakakibara *et al.*, 1976; Lira-Saldivar, 2003). Este resultado permite conocer la polaridad afín del NDGA, ya que fueron los extractos de diclorometano y metanol los que dieron positivo a la reacción con el FeCl₃ para fenoles.

Estudios revelaron que la concentración de NDGA puede reducirse por la contaminación ambiental provocada por concentraciones elevadas de ozono (Gonzales-Coloma *et al.*, 1988; Lira-Saldivar, 2003).

El NDGA y su quinona son de los principales compuestos químicos presentes en la planta, los cuales actúan como repelente de herbívoros (Janzen *et al.*, 1977; Greenfield *et al.*, 1987; Rundel *et al.*, 1994; Lira-Saldivar, 2003). Este fuerte antioxidante se presenta en todas las especies de *Larrea* (Gisvold, 1948; Downum *et al.*, 1988; Lira-Saldivar, 2003).

La presencia de alcaloides en los extractos metanólicos de ambas partes de la planta fue un resultado que no se esperaba, pues los únicos antecedentes de alcaloides los presentó Márquez en 1996, los cuales fueron aislados de la corteza y de las raíces, pero no de hojas ni de flores.

Cuadro 5. Reacciones colorimétrica de los extractos de hojas y ramas de *L. tridentata*

SOLVENTES	PRUEBAS	SLP		ENS	
		Hojas	Ramas	Hojas	Ramas
Hexano	Molisch (Glucósidos)	-	-	-	-
	FeCl ₃ (Fenoles)	-	-	-	-
	Mayer (Alcaloides)	-	-	-	-
	Dragendorff (Alcaloides)	-	-	-	-
	Vainillina (Terpenos)	+	+	+	+
Diclorometano	Molisch (Glucósidos)	-	+	-	-
	FeCl ₃ (Fenoles)	+	+	+	+
	Mayer (Alcaloides)	-	-	-	-
	Dragendorff (Alcaloides)	-	-	-	-
	Vainillina (Terpenos)	+	+	+	+
Metanol	Molisch (Glucósidos)	-	-	-	-
	FeCl ₃ (Fenoles)	+	+	+	+
	Mayer (Alcaloides)	-	-	-	-
	Dragendorff (Alcaloides)	+	+	+	+
	Vainillina (Terpenos)	-	-	-	-

+Reacción positiva; - Reacción negativa.

7.4 Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos (hexánicos, diclorometano y metanol) de hoja y rama de *L. tridentata*

Como se mencionó anteriormente, la CCF es una técnica analítica rápida y sencilla, la cual permite comparar los componentes químicos de diversas muestras (www.uam.es). Al realizar la técnica se logró observar en las placas que los extractos hexánicos y en diclorometano de ambas partes de la planta recolectada en la localidad de Ensenada (Figura 13, imágenes A y B) fueron los que mostraron mayor diversidad de compuestos. Esto debido al número de bandas presentes en el perfil cromatográfico.

En este trabajo, el reconocimiento de metabolitos secundarios se realizó por medio de pruebas preliminares, las cuales son una prueba cualitativa de caracterización consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, por ejemplo la modificación de un grupo funcional, la formación de un aducto o un complejo, lo cual genera como resultado una manifestación sensible como el cambio de coloración, un precipitado o el desprendimiento de un gas, lo cual indica la presencia o ausencia de un metabolito secundario en particular (Mora *et al.*, 2012).

Para el reconocimiento de los metabolitos secundarios se requiere el uso de reveladores o agentes cromogénicos, ya sean universales, que como su nombre lo dice, permitirá la manifestación de cualquier tipo de compuesto presente en la muestra a analizar, como es el caso de el sulfato cérico. El cual al someterlo a calor torna de coloración amarillenta a café oscuro. Por otro lado, existen los reveladores específicos, que permitirán la manifestación de un solo grupo de MS, o para revelar la presencia en general de éstos en una muestra. Tal es el caso del revelador de productos naturales (RPN), el cual produce una reacción fluorescente bajo la luz UV. Otro ejemplo de agente cromogénico, es el radical DPPH• que permite mostrar aquellos compuestos que lo reducen, es decir que tiene actividad antioxidante, tornando las marcas de color violeta a amarillo. La elección de los reveladores se basa en el tipo de estudio e interés de cada investigador, en este caso los tres tipos de reveladores de MS antes mencionados, fueron los que se utilizaron durante este trabajo.

Las placas obtenidas en el perfil cromatográfico mostraron que *L. tridentata* comparte la presencia de compuestos químicos, en diferentes proporciones con respecto a la parte de la planta y de la localidad en donde fue recolectada, sin importar el agente revelador utilizado.

Esto indica que el contenido fitoquímico de la especie, no es dependiente de la ubicación, distribución o condición ambiental. Y, que por lo tanto, *L. tridentata* cuenta con metabolitos secundarios que le brindan protección ante el estrés al que ésta se someta en su zona de distribución. Además de ser una fuente notable de compuestos fitoquímicos y con una variedad de propiedades biológicas y medicinales.

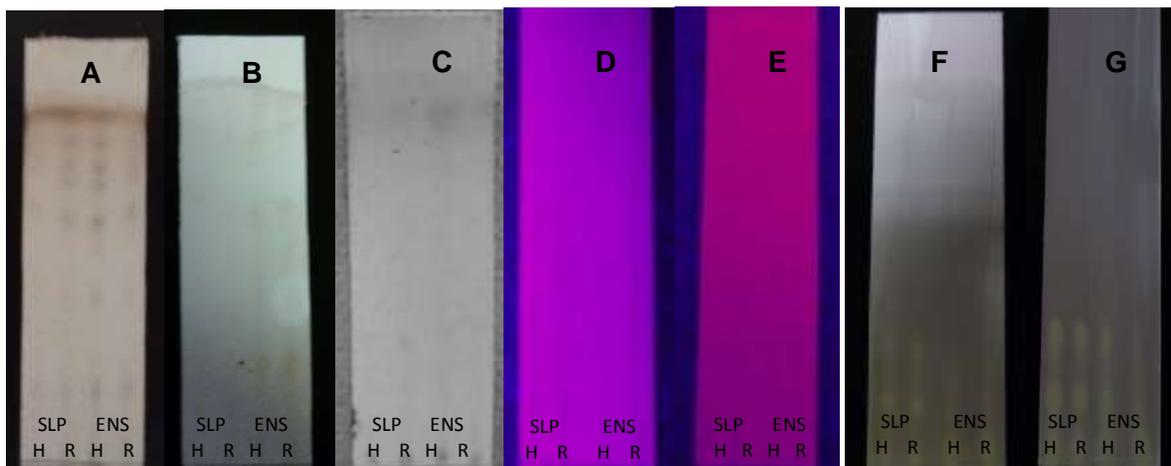


Figura 13. Cromatografía en capa fina (CCF) de ambas partes de *L. tridentata* y de ambas localidades. **A y B)** CCF de extractos hexánicos y en diclorometano de hojas y ramas de ambas localidades, revelada con sulfato cérico, **C)** CCF de extractos metanólicos de hojas y ramas de ambas localidades, revelada con sulfato cérico, **D y E)** CCF de extractos hexánicos y en diclorometano de hojas y ramas de ambas localidades, reveladas con RPN, **F y G)** CCF de extractos hexánicos y en diclorometano de hojas y ramas de ambas localidades reveladas con DPPH•. Simbología ((H) hojas, (R) ramas, (SLP) San Luis Potosí Y (ENS) Ensenada).

7.5 Absorción en luz UV

Todos los extractos de *L. tridentata* mostraron un pico máximo de absorción a los 235 nm, además de compartir un segundo pico de absorción a los 280 nm ((Figura 14), espectro del extracto de hojas de la localidad de SLP en diclorometano), lo cual podría tratarse del lignano NDGA, ya que de acuerdo a Neiss y Allen en 1991 encontraron que este compuesto absorbe a los 281 nm en la región de luz tipo UV-B (Figura 14).

Debido a lo anterior *L. tridentata* no contiene MS capaces de absorber en la región UVA, pero sí en la UVB y UVC. La UVC, es altamente germicida. El mecanismo de UVC para la inactivación selectiva de los microorganismos es causar daño celular mediante la inducción de cambios en la estructura química del ADN (Gupta *et al.*, 2012).

La presencia del NDGA en los extractos de *L. tridentata* comprueba lo dicho por Hyder *et al* en el 2002; el NDGA se encuentra entre el 5 y el 10% de peso seco y con mayor porcentaje en hojas (38.3 mg/g) que en ramas (32.5 mg/g).

Por otro lado, los extractos hexánicos (Figuras 15) de ambas partes de la planta y de ambas localidades (SLP y ENS) no mostraron ningún otro pico de absorción más que el de 235 nm. Esto puede ser debido a la polaridad del extracto así como a la polaridad del lignano NDGA, que recordando los resultados obtenidos en las técnicas colorimétricas con FeCl₃ para fenoles la polaridad del NDGA va de medianamente a altamente polar. Por lo que no se espera encontrarlo en los extractos hexánicos.

Los espectros correspondientes a los demás extractos se encuentran en el apéndice.

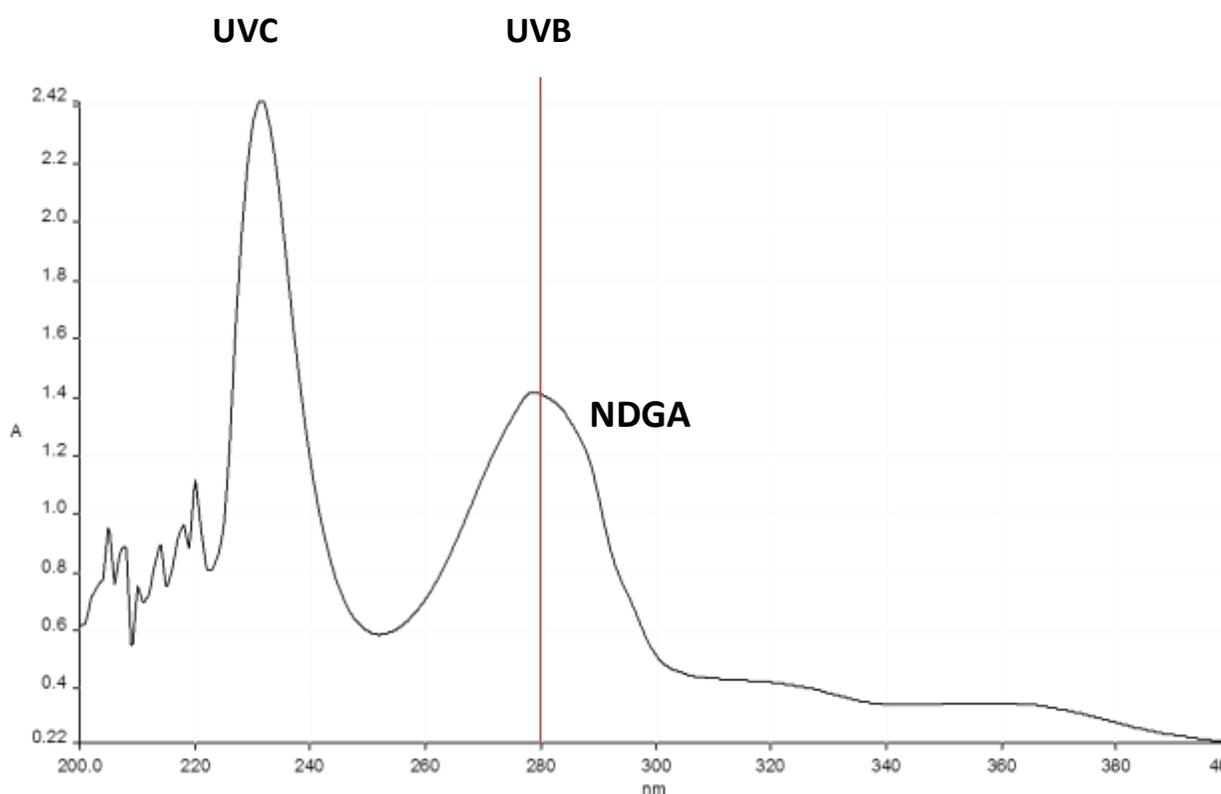


Figura 14. Espectro en luz UV del extracto de hojas en diclorometano de la localidad de SLP

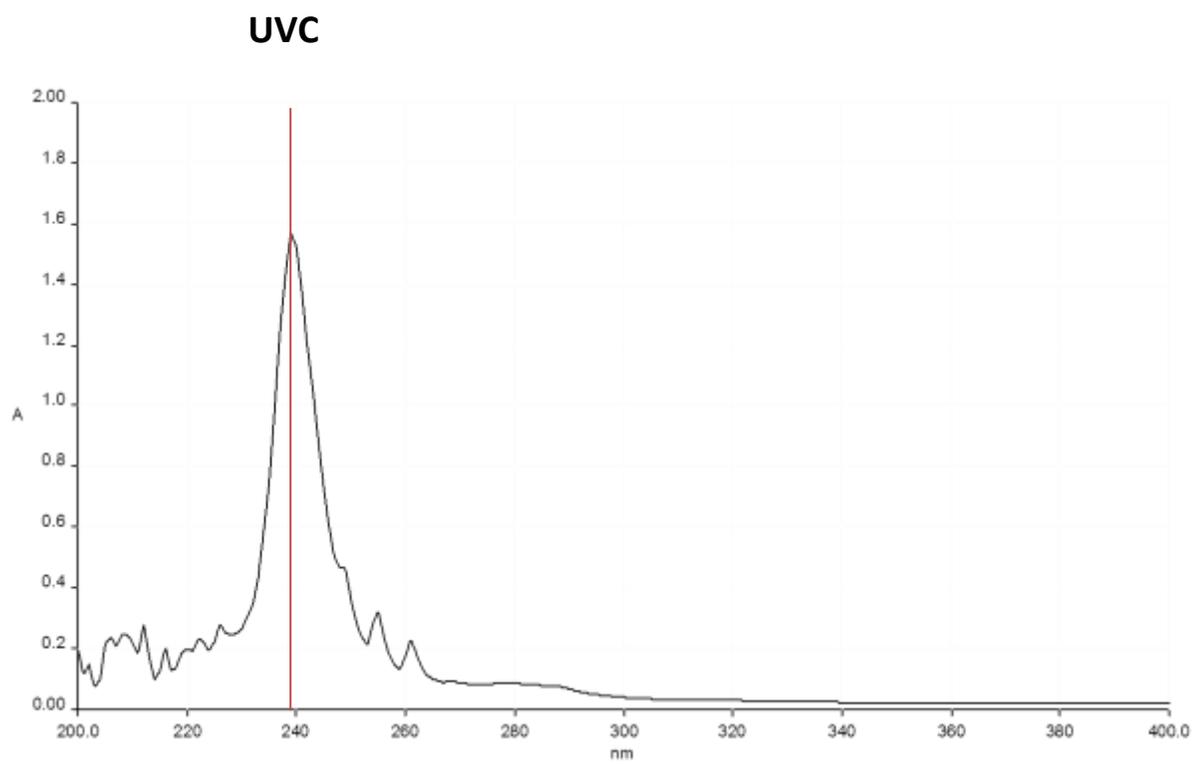


Figura 15. Espectro en luz UV del extracto de hojas en hexano de la localidad de SLP

7.6 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos de hoja y rama de *L. tridentata* de dos zonas áridas de México

La técnica fue realizada únicamente con los extractos hexánicos de hojas y ramas de ambas localidades (ENS y SLP), debido a las características de polaridad de los extractos.

A continuación se muestran los cuadros comparativos de los diferentes compuestos encontrados así como los cromatogramas de los extractos de *L. tridentata* (Cuadros 6, 7 y 8) (Figuras 17, 18, 19 y 20).

Con respecto a los extractos hexánicos de hoja y rama de *L. tridentata* recolectada en la localidad de ENS, se pueden observar tres compuestos químicos diferentes que se comparten entre ambos extractos (hoja y rama) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Compuestos químicos compartidos entre los extractos hexánicos de hoja y rama de *L. tridentata* colectada en ENS.

Tiempo de retención	Compuesto químico	Extractos ENS	Porcentaje (%)
6.026	nonano, 3-metil-5-propil-heptacosano, ácido oxálico, 6-etil-3-octil heptil éster	HOJAS	12.783
6.379		RAMAS	12.210
5.795	decano, 2,2-dimetil-dodecano, 2, 2, 11, 11-tetrametil-tetradecano, 2, 2-dimetil	HOJAS	10.690
6.520		RAMAS	10.098
5.338	octano, 2,6-dimetil-hexano, 2, 2, 5-trimetil-undecano, 3, 6-dimetil	HOJAS	10.460
6.764		RAMAS	9.838

Aun cuando los extractos hexánicos de ambas partes de la planta colectada en ENS compartieron la presencia de complejos, los extractos de hojas presentaron el porcentaje más alto. Este resultado confirma, que la mayoría de los compuestos fitoquímicos responsables de las propiedades biológicas y medicinales que se le atribuyen a *L. tridentata* están presentes en las hojas y en la resina de éstas, tal y como lo menciona Dey y Harborne en 1997.

Con respecto a los extractos hexánicos de ambas partes de la planta colectada en SLP compartieron la presencia de compuestos, siendo los extractos de hojas los que de nuevo mostraron los valores más altos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Compuestos químicos compartidos entre los extractos hexánicos de hoja y rama de *L. tridentata* colectada en SLP.

Tiempo de retención	Compuesto químico	Extractos SLP	Porcentaje (%)
5.153	decano, 2,2-dimetil-dodecano, 2, 2, 11, 11-tetrametil-tetradecano, 2, 2-dimetil	HOJAS	12.735
5.154		RAMAS	12.716
5.378	heptano, 2, 2-dimetil-hexano, 2, 2, 5-trimetil-hexano, 2, 2, 3-trimetil	HOJAS	10.570
5.384		RAMAS	9.792

Existe un compuesto que comparten los extractos hexánicos de hoja y rama de ambas localidades: **decano, 2,2-dimetil-dodecano, 2, 2, 11, 11-tetrametil-tetradecano, 2, 2-dimetil**. Al observar el Cuadro 8, la localidad que mostró mayor porcentaje de este compuesto compartido fueron los recolectados en la localidad de SLP.

Cuadro 8. Compuestos químicos compartidos entre los extractos hexánicos de hoja y rama colectada en ENS con los extractos de hoja y rama de *L. tridentata* colectada en SLP.

Compuesto químico	Extractos SLP	Porcentaje (%)	Extractos ENS	Porcentaje (%)
decano, 2,2-dimetil-dodecano, 2, 2, 11, 11-tetrametil-tetradecano, 2, 2-dimetil	HOJAS	12.735	HOJAS	10.690
	RAMAS	12.716	RAMAS	10.098

Además de compartir compuestos volátiles que en general son hidrocarburos lineales, existe uno en particular que se presenta en todos los extractos aunque con diferente porcentaje, el ácido oxálico (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de ácido oxálico presente en los extractos hexánicos de ambas partes de *L. tridentata* y de ambas localidades Ensenada (ENS) y San Luis Potosí (SLP).

Extractos hexánicos de <i>L. tridentata</i>	Porcentaje de ácido oxálico (%)
ENS hojas	12.738
ENS ramas	12.210
SLP hojas	0.363
SLP ramas	9.793

Los extractos que mostraron mayor porcentaje de ácido oxálico fueron los de hoja (12.738%) y rama (12.210%) de la localidad de ENS, mientras que el extracto de hojas de la localidad de SLP fue el que presentó el valor más bajo (0.363%) de ácido oxálico.

Es importante recalcar que con respecto al peso utilizado de cada parte de la planta de cada localidad: (292.9 gr de hojas y ramas de la localidad de SLP; y 67.2 gr de hojas y 45 gr de ramas de la de ENS). Los extractos de la localidad de ENS fueron los que mostraron mayor cantidad de ácido oxálico con una menor cantidad de material vegetal.

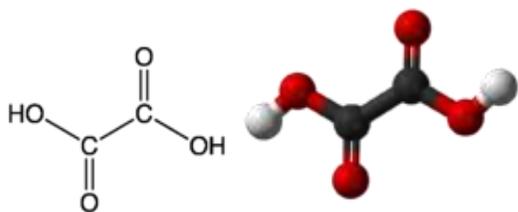
El ácido oxálico (Figura 16) se encuentra en una amplia variedad de plantas como la acedera, el ruibarbo, la remolacha y sobretodo en la espinaca así como en las plantas pertenecientes a la familia *Oxalis* (Kayashima y Katayama, 2002). Estudios han revelado que el ácido oxálico suprime *in vitro* la peroxidación de lípidos de una manera dependiente de la concentración.

Además, el ácido oxálico reduce la tasa de oxidación de ácido ascórbico en presencia de H₂O₂ y Cu (2+). Estos resultados sugieren que el ácido oxálico está disponible como un antioxidante natural, (Kayashima y Katayama, 2002).

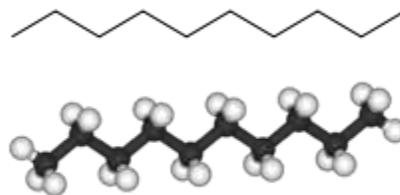
Dey y Harborne en 1997 mencionan que el ácido oxálico tiene un papel importante en la quelación de metales pesados. Esto solo comprueba la eficacia que podría tener el uso farmacéutico y medicinal de *L. tridentata* como neutralizador de RL al actuar como antioxidante o como quelante.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la CG-EM, donde se observó similitud de los porcentajes y de los compuestos presentes en ambas partes de la planta y localidades, se puede decir que *L. tridentata* no es dependiente de la localidad ni de la estación de año para que su contenido fitoquímico se vea afectado y a la vez favorecer a su reproducción y distribución tan particular.

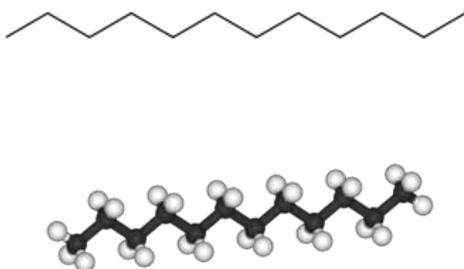
Este resultado complementa lo antes obtenido en la técnica de CCF, donde los extractos no muestran cambios en el perfil cromatográfico a pesar del agente cromogénico utilizado. La presencia de unos u otros compuestos no es variable, todo esto debido al porcentaje en el que se encuentran los compuestos en el peso seco o en la resina de la planta.



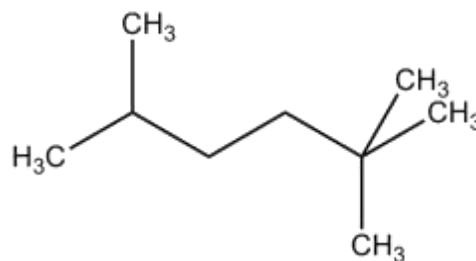
Estructura del ácido oxálico



Estructura del decano



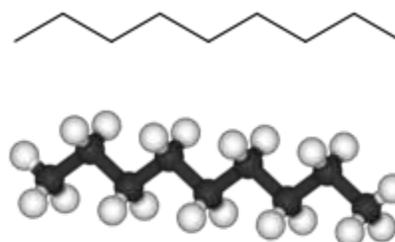
Estructura del dodecano



Estructura del 2,2,5-trimetilhexano



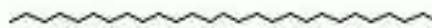
Estructura del 1-hexanol



Estructura del nonano



Estructura del pentadecano



Estructura del heptacosano

Figura 16. Estructuras de los compuestos químicos presentes en *L. tridentata* (medicinaturalcientifica.org)

Abundance

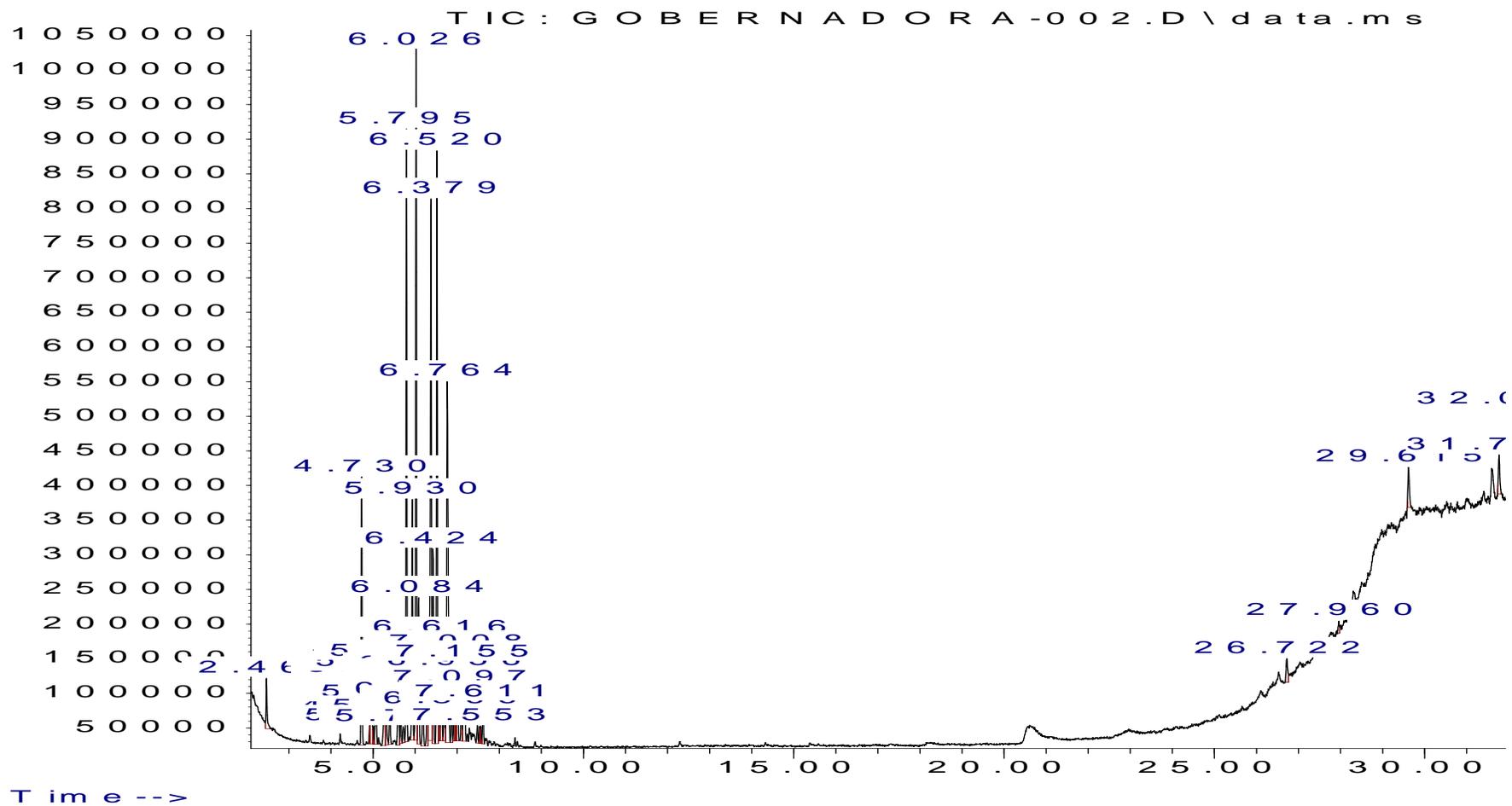


Figura 17. Cromatograma del extracto hexánico de hoja de *L. tridentata*, recolectada en ENS.

Cuadro 10. Datos del cromatograma del extracto hexánico de hojas de *L. tridentata*, recolectada en ENS.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	Factor de identificación (%)
6.379	Heptano, 2,2-dimetil-hexano, 2,2,5-trimetil-hexano, 2,2,3-trimetil	12.968
6.026	Nonano, 3-metil-5-propil-heptacosano. Ácido oxálico, 6-etil-oct-3-il heptil éster.	12.783
5.795	Decano, 2,2-dimetil-dodecano, 2,2,11,11-tetrametil-tetradecano, 2,2-dimetil.	10.690
6.520	Octano, 2,6-dimetil-hexano, 2,2,5-trimetil-undecano, 3,6-dimetil.	10.460

Abundance

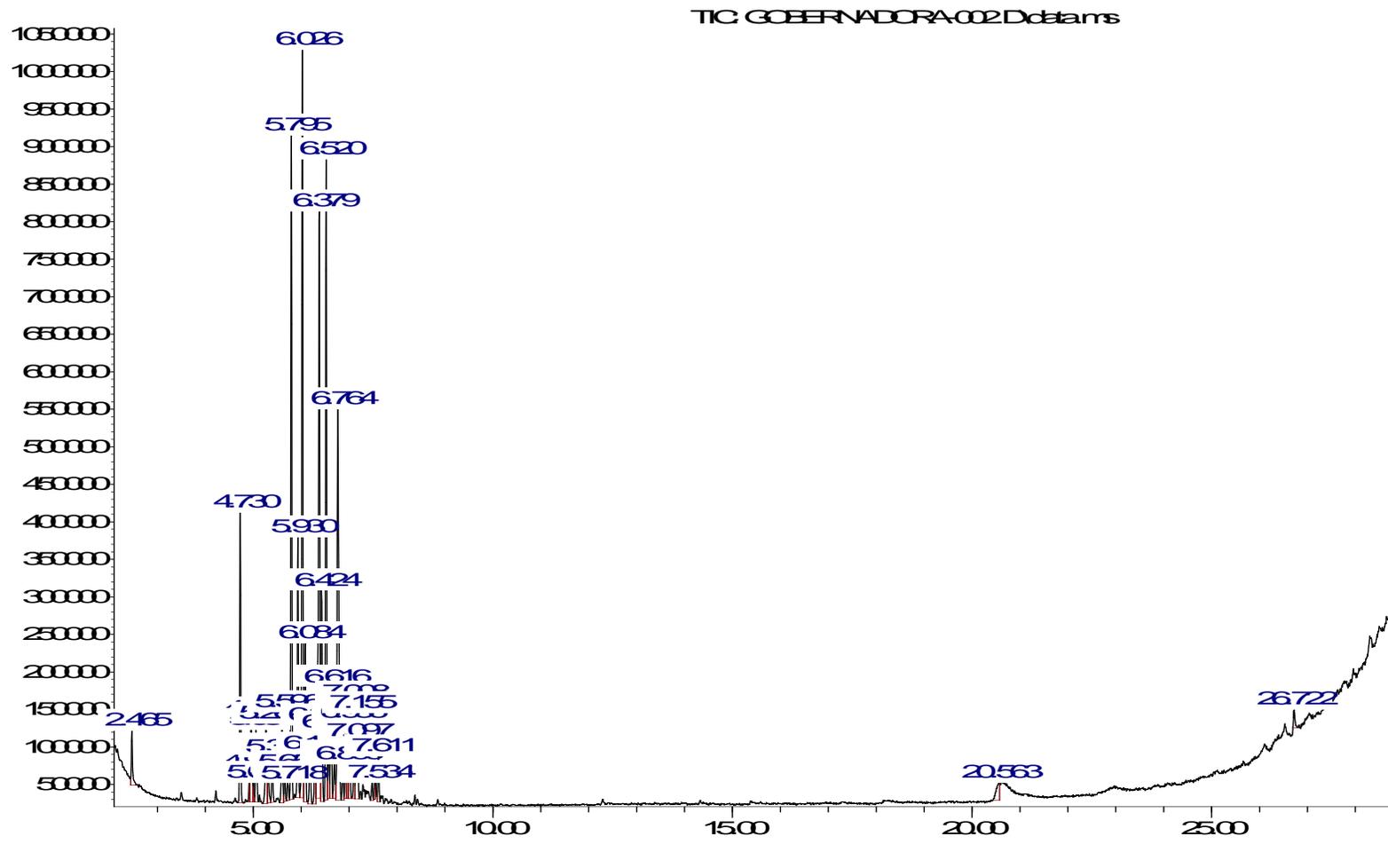


Figura 18. Cromatograma del extracto hexánico de ramas de *L. tridentata*, recolectada en ENS.

Cuadro 11. Datos del cromatograma del extracto hexánico de ramas de *L. tridentata*, recolectada en ENS.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto Identificado	Factor de identificación (%)
6.379	Hexano, 2,2,5-trimetil-heptano, 2,2-dimetil-heptano, 2,2-dimetil.	12.464
6.026	Nonano, 3-metil-5-propil-pentadecano. Ácido oxálico, 6-etil-3-il isobutil éster.	12.210
5.795	Decano, 2,2-dimetil-dodecano, 2,2,11,11-tetrametil-undecano, 2,2-dimetil.	10.098
6.520	Undecano, 3,6-dimetil-octano,2,6-dimetil-heptano, 4-etil-2,2,6,6-tetrametil.	9.838

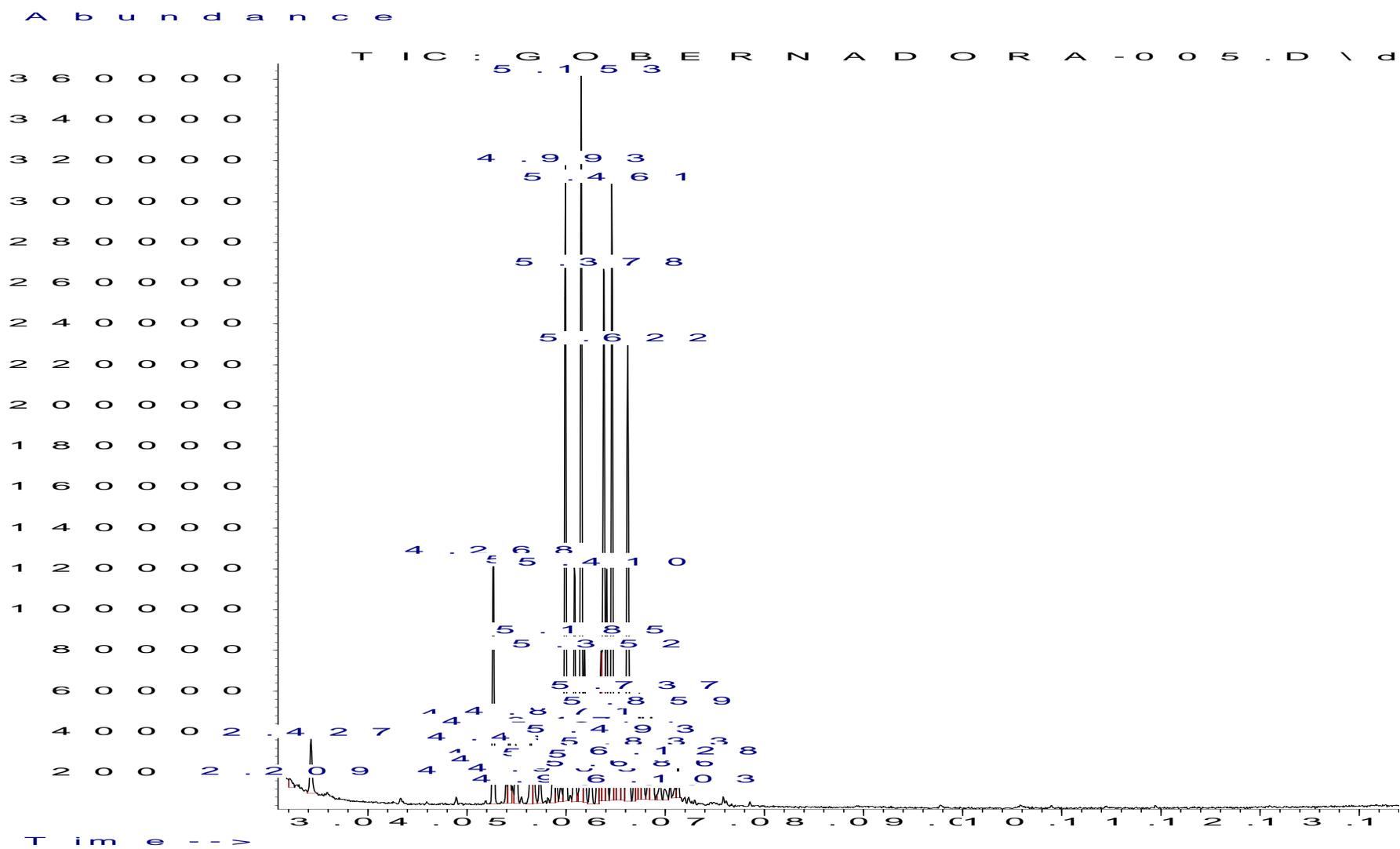


Figura 19. Cromatograma del extracto hexánico de hojas de *L. tridentata*, recolectada en SLP

Cuadro 12. Datos del cromatograma del extracto hexánico de hojas de *L. tridentata*, recolectada en SLP.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto Identificado	Factor de identificación (%)
5.153	Decano,2,3,8-trimetil-octano,2,4,6-trimetil-nonano,3-metil-5-propil	12.735
4.993	Tetradecano,2,2-dimetil-pentano,2,2,3,4-tetrametil-heptano,2,2,4-trimetil-	10.420
5.378	Heptano,5-etil-2,2,3-trimetil-heptano,2,2-dimetil-octano,2,6-dimetil-	10.570
5.461	Hexano,2,2,5-trimetil-decano,2,5,6-trimetil-hexano,2,2,5-trimetil-	10.160
5.622	Decano,3,7-dimetil-butano,2,2-dimetil-butano,2,2-dimetil-	9.685
5.994	1-octano,2-butyl-tetradecano,1-chloro-ácido oxálico, alilundecil éster	0.363
6.103	Ácido oxálico, ciclobutildodecilester hidroxilamina, O-decil-ácido oxálico, ciclobutilnonil éster	0.273

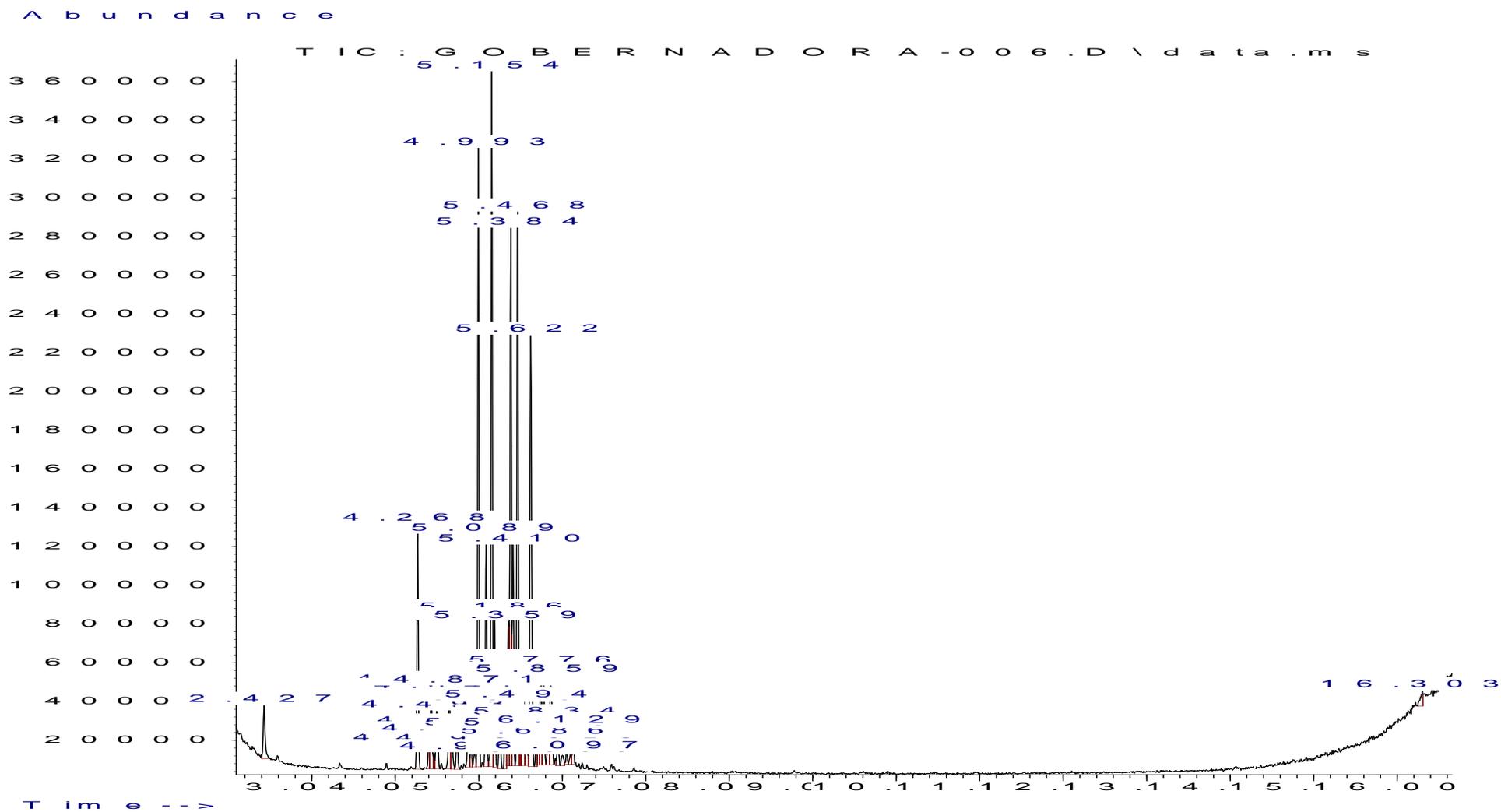


Figura 20. Cromatograma del extracto hexánico de ramas de *L. tridentata*, recolectada en SLP.

Cuadro 13. Datos del cromatograma del extracto hexánico de ramas de *L. tridentata*, recolectada en SLP.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto Identificado	Factor de identificación (%)
5.154	Heptadecano,2,6,10,14-tetrametil undecano,4,6-dimetil-undecano,2,8-dimetil	12.716
4.993	Decano,2,2-dimetil-tetradecano,2,2-dimetil-heptano,2,2,4-trimetil-	10.581
5.468	Decano,2,2-dimetil-octano,2,2,6-trimetil-octano,2,4,6-trimetil-	10.464
5.622	1-hexanol,5-metil-2-(1-metiletil)-decano,3,7-dimetil-ácido oxálico,2-etilhexilnonil éster	9.793
5.384	Heptano,5-etil-2,2,3-trimetil-pentano,3-etil-2,2-dimetil-hexano,2,2,5,5-tetrametil	9.792

7.7 Actividad antioxidante

Los extractos de *L. tridentata* mostraron valores variables de capacidad antioxidante media (CA₅₀), en general su actividad antioxidante fue efectiva. Entre menor sea el valor de la CA₅₀ la actividad antioxidante será más eficiente (Cuadro 14).

Como se puede observar los extractos con valores bajos fueron: extracto metanólico de ramas de SLP (2.05 ± 0.973 ppm), diclorometano de ramas de ENS (1.97 ± 0.996 ppm) y el extracto que mostró diferencia significativa con un valor de CA₅₀ de 1.78 ± 0.980 ppm fue el extracto de ramas de diclorometano de SLP. Es importante recalcar que estos extractos de *L. tridentata* presentaron valores más bajos en comparación con el control quercetina (Figura 21), la cual obtuvo una CA₅₀ de 2.17 ± 0.931 ppm.

La quercetina es un flavonol que se encuentra presente en altas concentraciones tanto en frutas como las manzanas y verduras como la cebolla, además del té verde. Es el flavonoide más abundante y el más habitual en la dieta humana, destacando por su elevada actividad antioxidante. A partir de él se obtienen otros flavonoides, como la rutina o la naringenina (Carper, 1993).

Los extractos de *L. tridentata* con valores intermedios fueron el metanólico de hojas de SLP (4.70 ± 0.994 ppm) y el de hojas en diclorometano de ENS (4.98 ± 0.997 ppm).

Por su parte el extracto metanólico de ramas de *L. tridentata* de la localidad de ENS fue el que obtuvo el valor más alto de CA₅₀ (14.97 ± 0.991 ppm) y por lo tanto la menor actividad antioxidante. Seguido por el de diclorometano de hojas de la localidad de SLP (9.70 ± 0.984 ppm).

Cuadro 14. Capacidad antioxidante media (CA₅₀) de acuerdo con la decoloración del DPPH• de los distintos extractos de *L. tridentata* y del control, quercetina. *Valores que mostraron mayor actividad antioxidante p<0.05.

Sustancia	Capacidad antioxidante media (CA ₅₀ ppm)
Extracto metanólico de hojas, SLP	4.70 ± 0.994
Extracto metanólico de ramas, SLP	2.05 ± 0.973*
Extracto metanólico de hojas, ENS	3.71 ± 0.856
Extracto metanólico de ramas, ENS	14.97 ± 0.991
Extracto en diclorometano de hojas, SLP	9.70 ± 0.984
Extracto en diclorometano de ramas, SLP	1.78 ± 0.980*
Extracto en diclorometano de hojas, ENS	4.98 ± 0.997
Extracto en diclorometano de ramas, ENS	1.97 ± 0.996*
Quercetina	2.17 ± 0.931

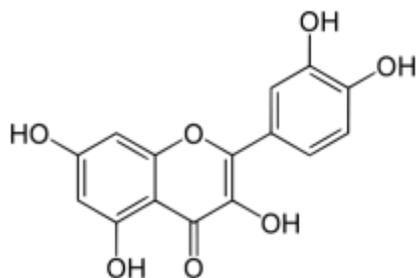


Figura 21. Estructura química de la quercetina

Las gráficas a continuación representan la media de cada uno de los tratamientos. En la figura 22, se presentan los extractos en diclorometano. Se puede observar que entre los extractos de hojas y ramas de la localidad de SLP y el de hojas de la localidad de ENS, existen diferencias significativas entre ellas, mientras que el extracto de ramas de ENS y el control (quercetina), son iguales estadísticamente. Por su parte en la figura 23, se puede observar que todos los extractos tienen diferencias significativas entre ellos y con el control.

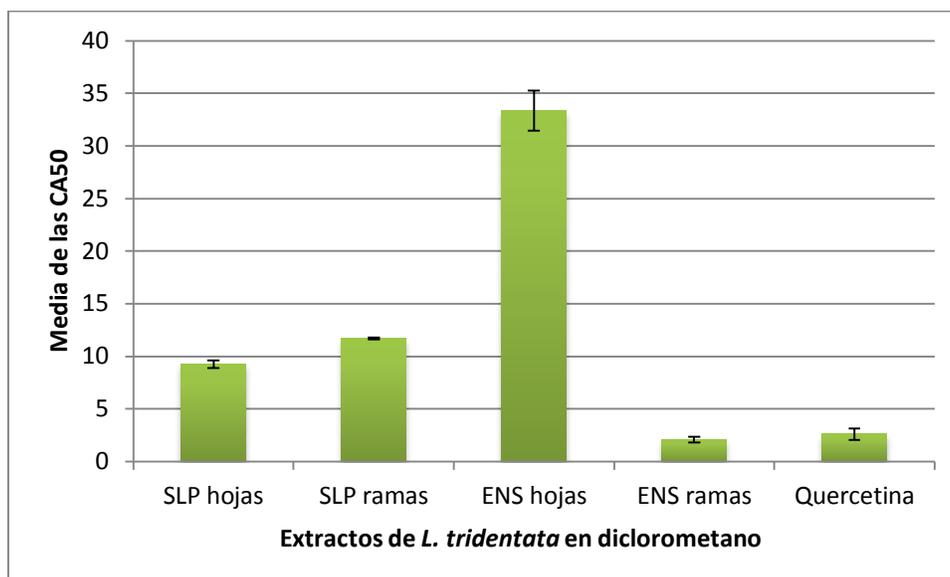


Figura 22. Extractos de *L. tridentata* en diclorometano y del control, quercetina (SLP: San Luis Potosí; ENS: Ensenada).

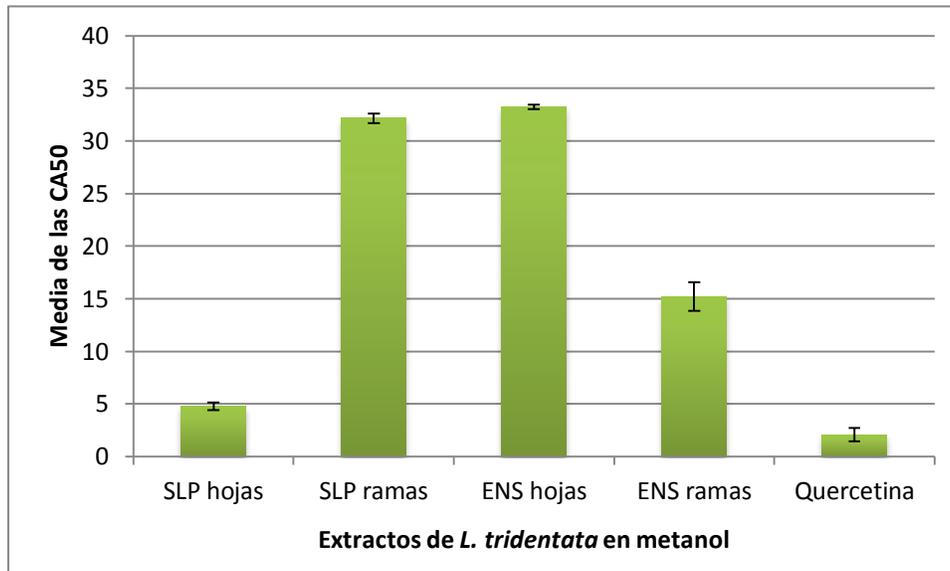


Figura 23. Extractos de *L. tridentata* en metanol y del control, quercetina (SLP: San Luis Potosí; ENS: Ensenada).

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, su concentración en la planta 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 y la defensa ante los factores adversos del ambiente y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Paladino, 2010).

La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Figura, 24) (Kähkönen *et al.*, 2001; Robbins, 2003).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común (C₆-C₃-C₆), formado 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 enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 24). 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. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Martínez *et al.*, 2002).

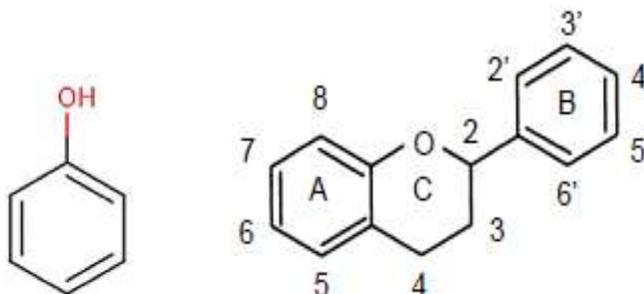


Figura 24. Estructura química de fenol y flavonoide

L. tridentata cuenta con compuestos químicos como el ácido oxálico que como se mencionaba anteriormente tiene un papel importante en la quelación de metales pesados (Dey y Harborne, 1997) y el cual potencializa la actividad antioxidante de la especie. Además de ser éste uno de los compuestos con mayor porcentaje en uno de los extractos de *L. tridentata* en la CG-EM.

L. tridentata tiene propiedades antioxidantes tan eficientes e incluso mejores que la quercetina; Por lo tanto *L. tridentata* podría ser una excelente opción para trabajar en el área farmacéutica y medicinal como neutralizador de radicales libres.

7.8 Cuantificación total de fenólicos

El porcentaje de fenólicos presentes se calculó en cada uno de los extractos de ambas partes de la planta y de ambas localidades los cuales se muestran en las figuras a continuación (Figuras 38, 39 y 40). Con el fin de poder comprobar la cantidad de polifenoles presentes en *L. tridentata* y poder relacionar la presencia de estos con la actividad reductora o antioxidante antes evaluada.

Los resultados obtenidos de los extractos de ambas partes de la planta y de ambas localidades obtenidos con metanol muestran que el extracto de ramas de la localidad de SLP fue el que tiene la concentración más alta (30.46%), mientras que el de menor concentración fue el de hojas de la localidad de SLP (16.3%) (Figura, 25).

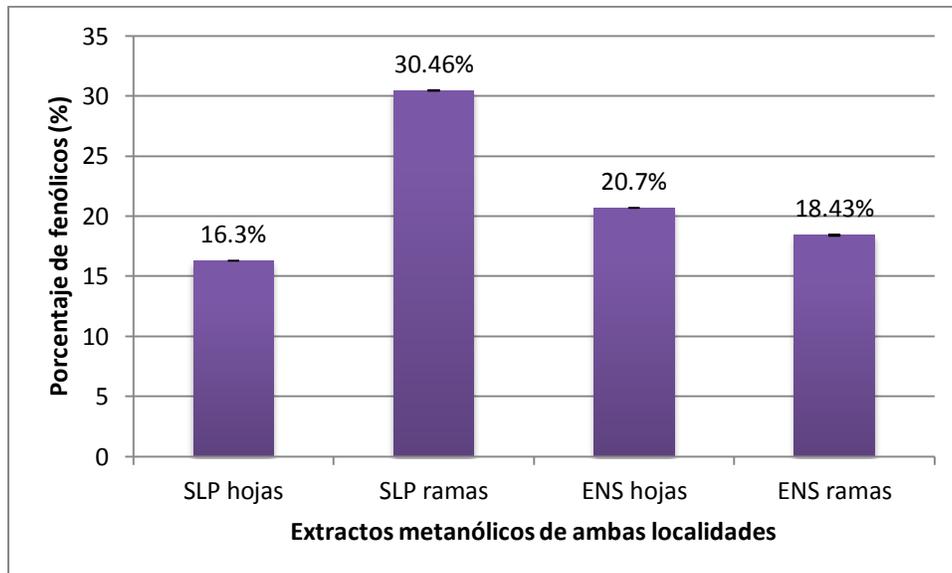


Figura 25. Gráfica de porcentaje de fenoles totales presentes en los extractos de ambas partes de la planta en metanol de ambas localidades (SLP: San Luis Potosí; ENS: Ensenada).

Por su parte para los extractos obtenidos con hexano (Figura, 26), el extracto que mostró mayor concentración fue el de ramas de la localidad de SLP (10.3%), mientras que el de menor concentración fue el extracto de ramas de la localidad de ENS (1.73%).

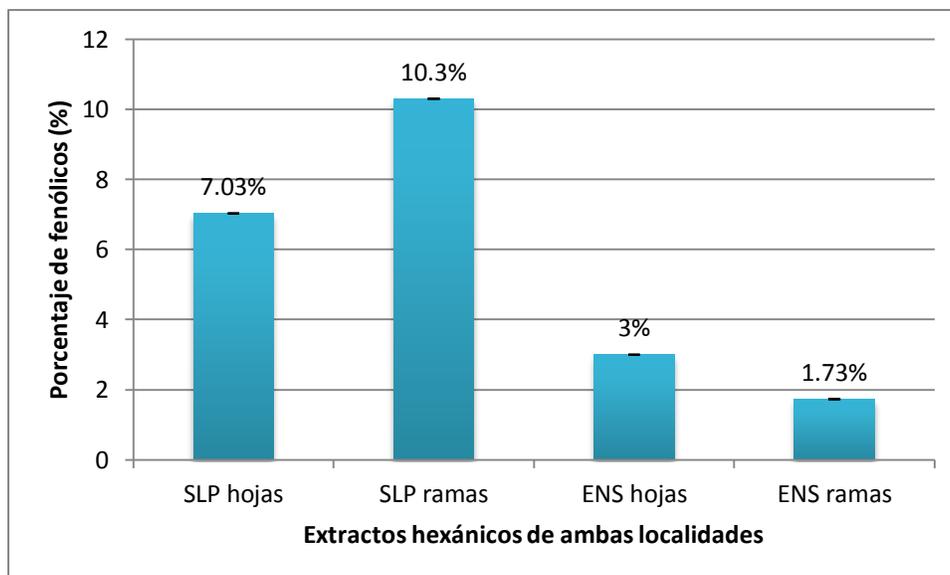


Figura 26. Gráfica de porcentaje de fenoles totales presentes en los extractos de ambas partes de la planta en hexano de ambas localidades (SLP: San Luis Potosí; ENS: Ensenada).

Por último para los extractos obtenidos con diclorometano (Figura 27), el extracto que mostró mayor concentración fue el de ramas de la localidad de ENS (26.86%), mientras que el de menor concentración fue el de hojas de la localidad de ENS (5%).

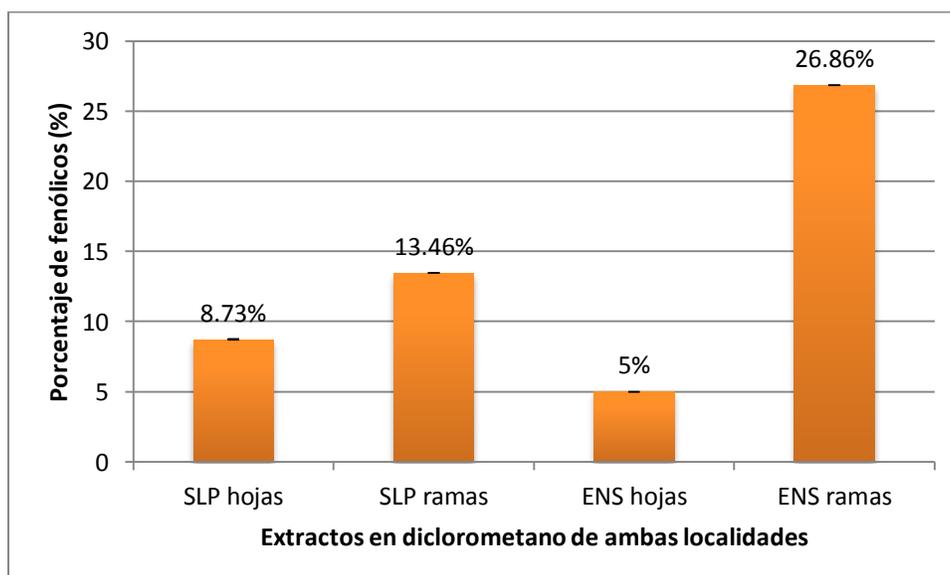


Figura 27. Gráfica de porcentaje de fenoles totales, presentes en los extractos de ambas partes de la planta en diclorometano, de ambas localidades (SLP: San Luis Potosí; ENS: Ensenada).

Como se puede observar los extractos de las dos partes de la planta y de ambas localidades obtenidos con metanol fueron los que presentaron mayor concentración, mientras que los extractos obtenidos con hexano fueron los que mostraron menor concentración de fenólicos.

Estos resultados concuerdan con las pruebas colorimétricas (Cuadro 5). En donde los extractos de ambas partes de la planta y de ambas localidades obtenidos con diclorometano y metanol, dieron positivos a la reacción (+).

Los fenólicos fueron los metabolitos secundarios con mayor aparición en la mayoría de los extractos de *L. tridentata*. Siendo el NDGA el más importante por su alto contenido en hojas y tallos y por el cual se le atribuyen tantas propiedades medicinales y su efectiva actividad antioxidante a la especie. Por lo que era de esperarse que en la prueba de cuantificación de fenólicos, este resultado fuera significativo.

Yildirim y Mavi en el 2000, trabajaron sobre hojas y semillas de *Rumex crispus L.*, conocida comúnmente como acedera, verificando que el poder reductor de los extractos aumenta con la concentración de los mismos, presentando una correlación estadísticamente significativa ($r= 0.99$) entre los compuestos fenólicos totales y el poder reductor. También establecieron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido de fenoles totales y la capacidad de capturar radicales libres como el DPPH•. Así a medida que el contenido de fenoles totales aumenta, el poder reductor aumenta.

El poder reductor de un compuesto depende de la capacidad de transferir electrones del propio compuesto; por lo tanto, puede servir como un indicador significativo de su potencial actividad antioxidante (Paladino, 2010).

Con respecto a la correlación de la cantidad de fenoles y la actividad antioxidante de un compuesto *L. tridentata* no cumple con esta característica. Por otro lado, *L. tridentata* mostró una capacidad reductora eficiente ante el radical DPPH•, lo cual se ve reflejado en su actividad antioxidante justo como lo menciona Paladino en el 2010.

8.0 Conclusiones

Evaluación Fitoquímica

Rendimiento

- Los extractos de hojas y ramas de *L. tridentata* macerados en metanol fueron en general los que mostraron mayor rendimiento. Por lo tanto, la mayoría de los compuestos presentes en *L. tridentata* son de polaridad alta.

Pruebas colorimétricas – Cualitativas

- Todos los extractos hexánicos son ricos en terpenos.
- Los extractos en diclorometano tienen fenólicos y terpenos.
- Los extractos metanólicos fueron los únicos que tienen alcaloides además de fenólicos.

Técnica cromatográfica (CCF)

- Los extractos hexánicos y en diclorometano de ambas partes de la planta de la localidad de Ensenada mostraron mayor número de compuestos en el perfil cromatográfico que los extractos de las dos partes de la planta de la localidad de SLP.
- Los extractos metanólicos de hojas de la localidad de San Luis Potosí mostraron menor número de compuestos en el perfil cromatográfico, con respecto a los demás extractos de esta localidad

Espectrometría con luz UV

- Los extractos de *L. tridentata* mostraron un mismo pico de absorbancia a los 235 nm y otro a los 280 nm con excepción de los extractos hexánicos de hoja y rama de ambas localidades.

Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

- La composición química de los extractos hexánicos de ambas partes de la planta y localidades son similares.
- El ácido oxálico es uno de los componentes principales de los extractos hexánicos de *L. tridentata*.

Actividad antioxidante

- Todos los extractos de *L. tridentata* mostraron una eficiente actividad antioxidante comparado con la quercetina
- Los extractos más activos de *L. tridentata* colectada en SLP fueron los de ramas en diclorometano y metanol. En el caso de la localidad de ENS, fue el de ramas en diclorometano.

Cuantificación total de fenoles

- Los extractos metanólicos de ramas de *L. tridentata* de la localidad de San Luis Potosí mostraron la mayor cantidad de fenoles con un 30.46%
- Los extractos hexánicos de hojas de *L. tridentata* de la localidad de Ensenada mostraron la menor cantidad de fenoles con un 1.73%.

Conclusión General

- La relación de los resultados de la actividad antioxidante y de la cuantificación de fenoles permite deducir que el contenido fitoquímico de *L. tridentata* es similar en ambas localidades y que es sobre todo rico en este tipo de productos naturales.

Bibliografía

- Acosta, A. J. G. 2008. Manual para prácticas de alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. pp. 7-72. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf> Consultada el 23 de mayo del 2013.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H. 2005. Photochemistry or prevention of ultraviolet B signalling and photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 57: 153-173.
- Arrieta, B.D., de Esparza, R.R., Estrada, J.M., 2012. Mexican plants used in the salmonellosis treatment, *Salmonella* - A Diversified Superbug. In: Yashwant (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-diversifiedsuperbug/mexicanplants-used-in-the-salmonellosis-treatment>. Consultada el 03/08/2012
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., Cárdenas, R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 98 (3): 233-237
- Barrera Fuentes, A. 1981. Estudios de la polimerización de la resina fenólica de la *Larrea tridentata* "gobernadora" con formaldehído. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. pp. 1-63.
- Berezov, T.T, Korovkin, B.F. 1992. Chemistry and metabolism of carbohydrates. Mir Publishers. Moscow. Rusia. pp. 215-156.
- Carper. J. 1993. Los alimentos: medicina milagrosa. Grupo Editorial Norma. México. pp. 19-20.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). In: Buchanan, B., Grusemm, W., Jones, R. (Eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD, U.S.A. pp. 115-131.
- De la Cerda, A. J. 1967. Las tierras desérticas mexicanas. Estudio general sobre las especies *Larrea*. Vol. II. Serie Aridocultura, México, pp. 13-45.
- Dey, P.M., Harborne, J.B. 1997. *Plant Biochemistry*. Academic Press. San Diego, CA, U.S.A. pp. 503-515.
- Díaz, J. 1976. Los usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, México, 329.
- Díaz, N. A., Jorrín Novo, J. V., Bárcena Ruíz, J. A. 2006. Manual de prácticas de Reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares. Universidad de Córdoba, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, España. pp. 1-8. Disponible en:

<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/20%20REACCIONES%20COLOREADAS%20DE%20AZ%C3%9ACARES.pdf> Consultada el 2 de marzo del 2014.

- Downum, K. R., Dole, J., Rodríguez, E. 1988. Nordihydroguaiaretic acid: inter-and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote Bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 16: 551-555.
- García-Bores A. M. 2010. Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis de Doctorado, FES Iztacala, UNAM, México. pp. 59-105.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 246.
- Gay, C., Dwyer, D. 1998. New Mexico range plants. In: Allison, C., Hatch, S., Schickedanz, J. (Eds.), Cooperative Extension Service Circular No. 374. New Mexico State University, Las Cruces, NM. pp. 84.
- Geissman, T. A. 1974. Principios de química orgánica. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 752-754.
- Gonzales-Coloma, A., Wisdom, Ch. S., Rundel, P. W. 1988. Ozone impact on the antioxidant nordihydroguaiaretic acid content on the external leaf resin of *Larrea tridentata*. *Biochemical Systematics and Ecology* 16: 59-64.
- Gisvold, O. 1948. A preliminary survey of the occurrence of nordihydroguaiaretic acid in *Larrea divericata*. *Journal of the American Pharmacology Association* 37: 194-196.
- Gomis Yagües, V. 2008. Manual: Introducción a las técnicas instrumentales en el análisis industrial. Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química. España. pp. 1-6. Disponible en: <http://rua.ua.es/> Consultada el 6 de julio del 2013.
- Greenfield, M. D., Shelly, T. E., Downum, K. R. 1987. Variations in host-plant quality implications for territoriality in a desert grasshopper. *Ecology* 68: 828-838.
- Gupta Asheesh, Pinar Avci, Tianhogg Dai, Huang Ying-Ying, Hmblin, M. R. 2012. Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation. *Advances in Wound Care*. 2 (8): 422-435.
- Gutiérrez, M.C., Droguet, M. 2002. Identificación de compuestos volátiles por CG-MS. Revistas y congresos UPC. Universidad Politécnica de Catalunya. Barcelona. 122: 35-41. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf> Consultada el 5 de mayo del 2014

-
- Gutiérrez. A. D. M., Ortiz. G. C. A., Mendoza. C. A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología, 2008-M220-1108-1.
 - Gutiérrez Ravelo, A., Estévez Braun, A. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. Revista de la real academia de ciencias exactas, físicas y naturales. 103 (2): 409-419.
 - Halliwell, B., Gutteridge, M. C. J. 2007. Free radicals in biology and medicine. Oxford University, London. PP. 220-264.
 - Hernández. L. 2002. Curso de posgrado de temas actuales de nutrición y alimentación. Universidad de la Habana, Cuba. Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/estres_oxidativo_y_antioxidantes.pdf Consultada el 7 de agosto del 2014.
 - Hernández. L. 2008. Curso de posgrado de estrés oxidativo y antioxidantes: actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. Universidad de la Habana, Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, Cuba. Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/estres_oxidativo_y_antioxidantes.pdf Consultada el 7 de agosto del 2014.
 - Hernández Muñoz, L. 2009. La profesión de resinero: el ocaso de un oficio centenario. Editorial, Magrama. Madrid, España. pp. 20-30.
 - Hyder, P., Fredrickson, E.L., Rick, E., Estell, R., Tellez, M., Gibbens, R. 2002. Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosote bush (*Larrea tridentata*). Biochemical Systematics and Ecology 30, 905–912.
 - Janzen, D. H., Juster, H. B., Bell, E. A. 1977. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the branched beetle *Callosobruchus maculatus*. Phytochemistry 16: 223-227.
 - Jones, S. 1987. Sistemática Vegetal. McGraw-Hill, México, pp. 405–406.
 - Kähkönen, Marja. Anu, I. Copia., Heikki J. Vuorela., Jussi Pekka, R., Kalevi Pihalaja., Tutti S. Kujala y Marina Heinonen., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 3954-3962.
 - Kayashima, T., Katayama, T. 2002. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects. 1573 (1): 1-3.
-

-
- Konno, C., Lu, Z., Xue, H., Erdelmeier, C., Meksuriyen, D., Che, C., Cordell, G., Soejarto, D., Waller, D., Fong, H. 1990. Furanoid lignans from *Larrea tridentata*. *Journal of Natural Products* 53, 396–406.
 - Lia, V., Confalonieri, C., Comas, I., Hunziker, J. 2001. Molecular phylogeny of *Larrea* and its allies (Zygophyllaceae): reticulate evolution and the probable time of creosote bush arrival in North America. *Molecular and Phylogenetic Evolution* 21, 309–320.
 - Lira Saldívar, R. H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C.)). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21 (2): 214-220.
 - Mabry, T., Bohnstedt, Ch. 1981. *Larrea*: a chemical resource. In: Campos, L.E., Mabry, J.J., Fernández, T.S. (Eds.), *Larrea*, 2da. Edición. México: CONACyT, pp. 217-236.
 - Márquez Lara, F., C. 1996. Medicinal Plants from Mexico: Composition, Uses and Biological Activity. Universidad Nacional Autónoma de México. México, pp. 59–61.
 - Martínez Flores, S., González Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17 (6): 271-275.
 - Martínez-Villalta, J., Pockman, W.T. 2002. The vulnerability to freezing induced xylem cavitation of *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 89, 1916–1924.
 - McMurry, J. 2001. Química Orgánica, 5ª. Edición, Ed. International Thomson Editores. pp. 11-60.
 - Mora Arango, C. L., Galeano Jaramillo, E., Osorio Durango, E. 2012. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. pp. 6-50. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/mfarmacognosia.pdf> Consultada el 2 marzo del 2012.
 - Neiss, E. S., Allen, L. M. 1991. Patente de invención. Registro de la propiedad industrial. España. pp. 17. Disponible en: http://www.espatentes.com/pdf/2191757_t3.pdf Consultado el 26 de agosto del 2014.
 - Paladino, S. C. 2010. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de Maestría del Posgrado Regional Cooperativo en Alimentos. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. Facultad de Ciencias Agrarias- UNCuyo. Mendoza, Argentina. pp. 11-100.
 - Quintanar, M. A., Calderón, J. V. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*. 28 (3):89-101.
-

-
- Rahal, A., Kumar, A., Singh V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Reserch International*. 2014: 1-19.
 - Ríos, L. C. 2009. Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas. 27 (3): 59-76.
 - Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2866-2887.
 - Rundel, P. W., Sharifi, M. R., Gonzales-Coloma, A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata*. In: Arianoustsou, M., Groves, R. H. (Eds.). *Plant- animal interactions in mediterranean-type ecosystems*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 105-114.
 - Rzedowsky, J. 1992. Vegetación potencial, en Atlas Nacional de México, Sección Naturaleza, Tomo II, escala 1:4 000 000, México. Instituto de Geografía, UNAM.
 - Rzedowsky, J., Huerta, M. 1994. Xerófila salud. En: Rzedowski, J. (Ed.), *La Vegetación de México*. Limusa, México, pp. 237–261.
 - Salas de León, S. N., Mendoza García, A., Agüero Reyes, A. J., Villar Morales, C. 1999. Distribución geográfica y ecológica de la flora amenazada de extinción en la zona árida de San Luis Potosí, México. *Polibotánica*. (10): 1-14.
 - Sakakibara, M., Difeo, D. Jr., Nakatani, N., Timmerman, B., Mabry, T. J. 1976. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* y *L. divaricata*. *Phytochemistry* 15:727-731.
 - Serrano, P. R. 2007. Variación espacio temporal de metabolitos con actividad antifúngica de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae), del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Maestría, FES Iztacala, UNAM, México. pp. 28-31.
 - Seigler, D. D., Jakupcak, J., Mabry, T. J. 1974. Wax esters from *Larrea divaricata*. *Phytochemistry* 13:983-986
 - Sinnott, R.A., Clark, D.W., De Boer, K.F. 1998. Patent: Non-toxic therapeutic extract of *Larrea tridentata*. pp 27. Disponible en: www.intechopen.com/download/pdf/26455
 - Villaño, D., Fernandez-Pachón, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH• free radical. *Talanta*. 71: 230-235.
 - Villamar Argueta, A. (Ed.), 1994. Atlas de las Plantas Medicinales Tradicionales de México, vol. II. Instituto Nacional Indigenista, México, pp. 669–670.
-

-
- Xue, H., Lu, Z., Konno, C., Soejarto, D., Cordell, G., Fong, H., Hodgson, W. 1988. (3, 4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and (3-4-hydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27, 233–235.
 - Yildirim, A., Mavi, A. 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argenta* Desf Ex DC), Saga (*Salvia triloba* L.), and black tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 48: 5030-5034.
 - Young, M. H., Sheeja, G., Narváez, F. D., Srivastava, P., Schuerger, A. C., Wright, L. D., Marois, J. J. 2012. Effect of solar radiation in severity of soybean rust. University of Florida. The American Phytopathological Society. pp. 794-802.

Citas de Internet

- http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf Consultada el 04 de septiembre del 2012.
 - <http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/index.jsp> Consultada el 21 de septiembre del 2012.
 - <http://plantasdemexico.blogspot.mx/2010/09/gobernadora-larrea-tridentata.html> Consultada el 18 de febrero del 2013.
 - <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/distribesp.html> Consultada el 20 de febrero del 2013.
 - http://www.cicata.ipn.mx/OfertaEducativa/MTA/RecInfraestructura/Paginas/Equipo_Tecnologia_Hidrogeno/Espec_UVvisNIR.aspx Consultada el 24 de enero del 2014.
 - <http://www.fireflyforest.com/flowers/1384/larrea-tridentata-creosote-bush/> Consultada el 10 de marzo del 2014.
 - https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/test-alisis-funcional-2011/e4_2011/e4_2011 Consultada el 14 de abril del 2014.
 - <http://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf> Consultada el 14 de abril del 2014.
 - <http://www.fundacionunam.org.mx/blog/ciencia/plantas-contrainsectos.html> Consultada el 6 de mayo del 2014.
 - <http://www.uam.es/ss/Satellite/es/home/> Consultada el 10 de julio 2014
 - <http://medicinaturalcientifica.org/EstudioC/oxalico01.htm>
 - <http://medicine.academic.ru/77041/agmatine> Consultada el 20 de noviembre del 2014.
-

Apéndice

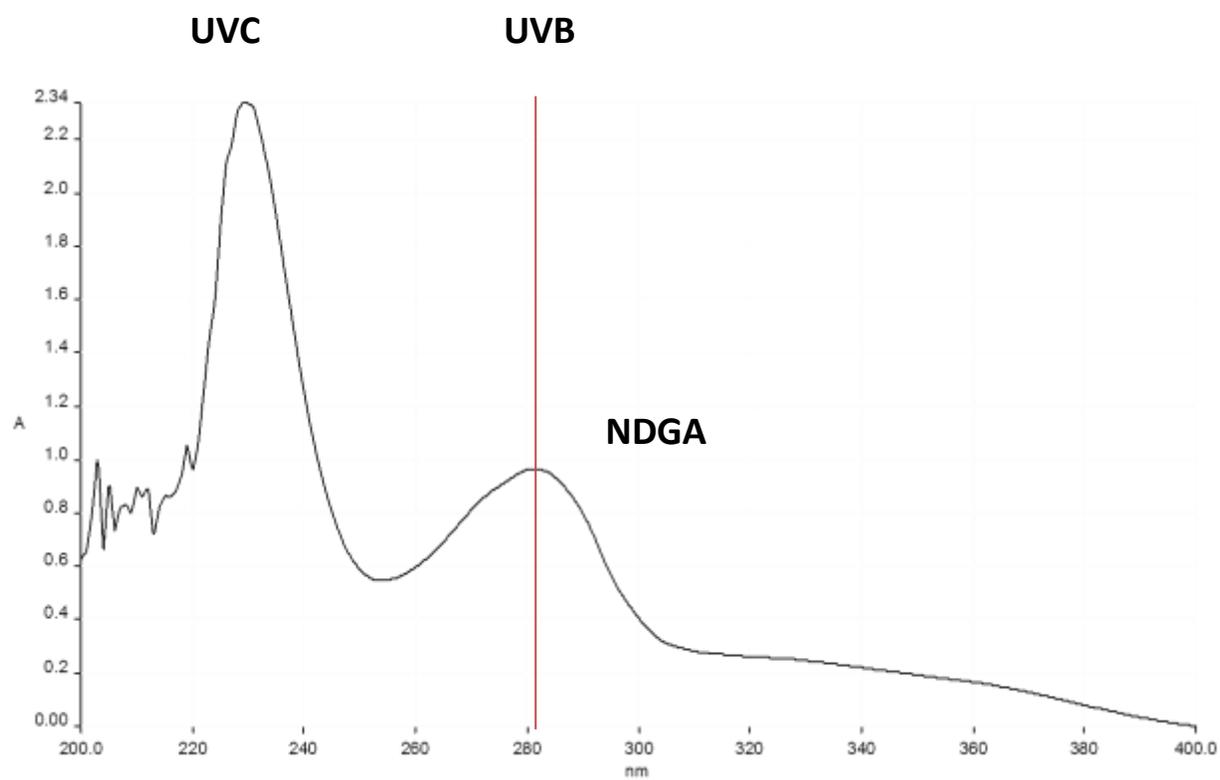
Espectros de Absorbancia en luz UV de los extractos de *L. tridentata*

Figura 28. Espectro en luz UV del extracto de hojas en metanol de la localidad de SLP

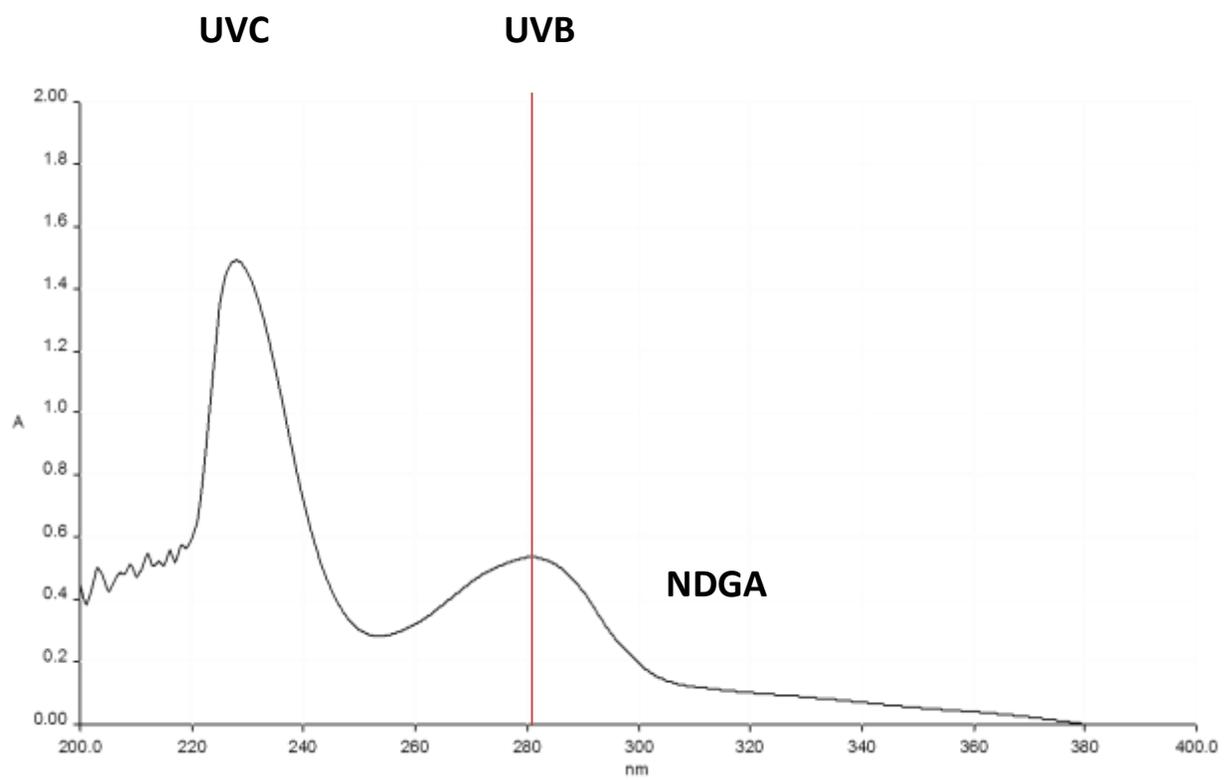


Figura 29. Espectro en luz UV del extracto de ramas en metanol de la localidad de SLP

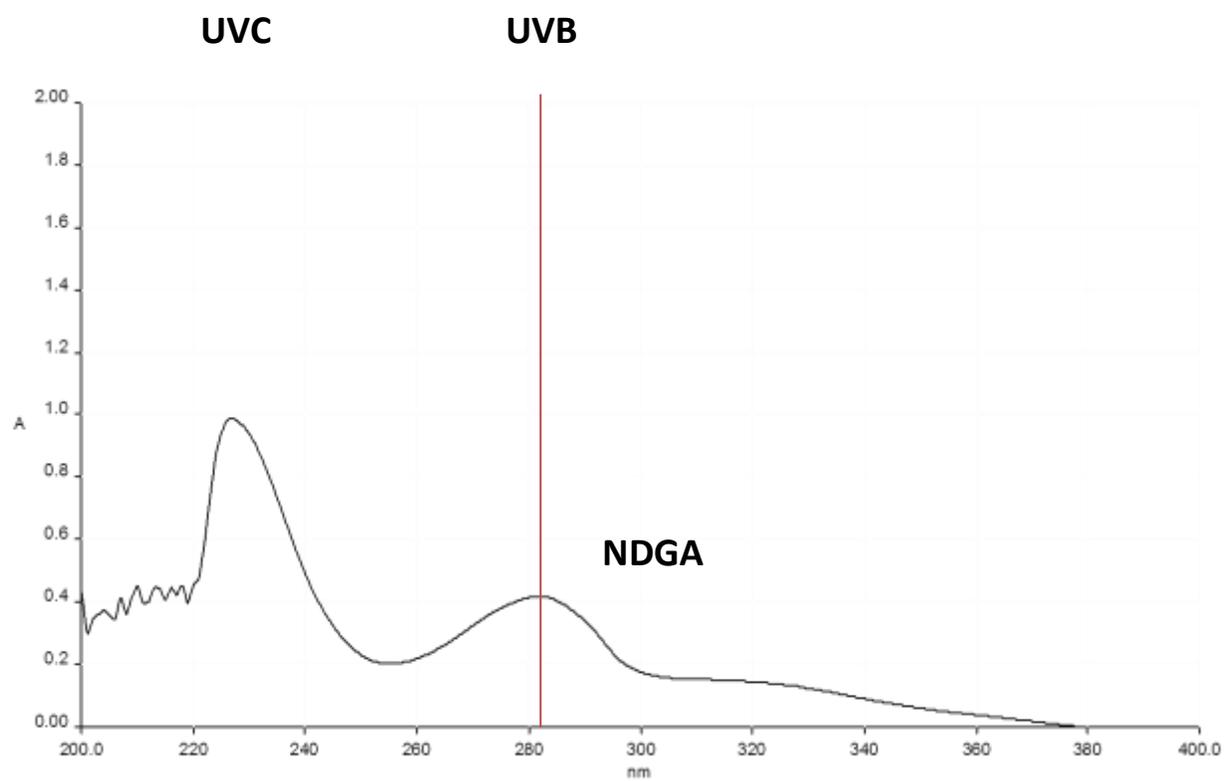


Figura 30. Espectro en luz UV del extracto de hojas en metanol de la localidad de ENS

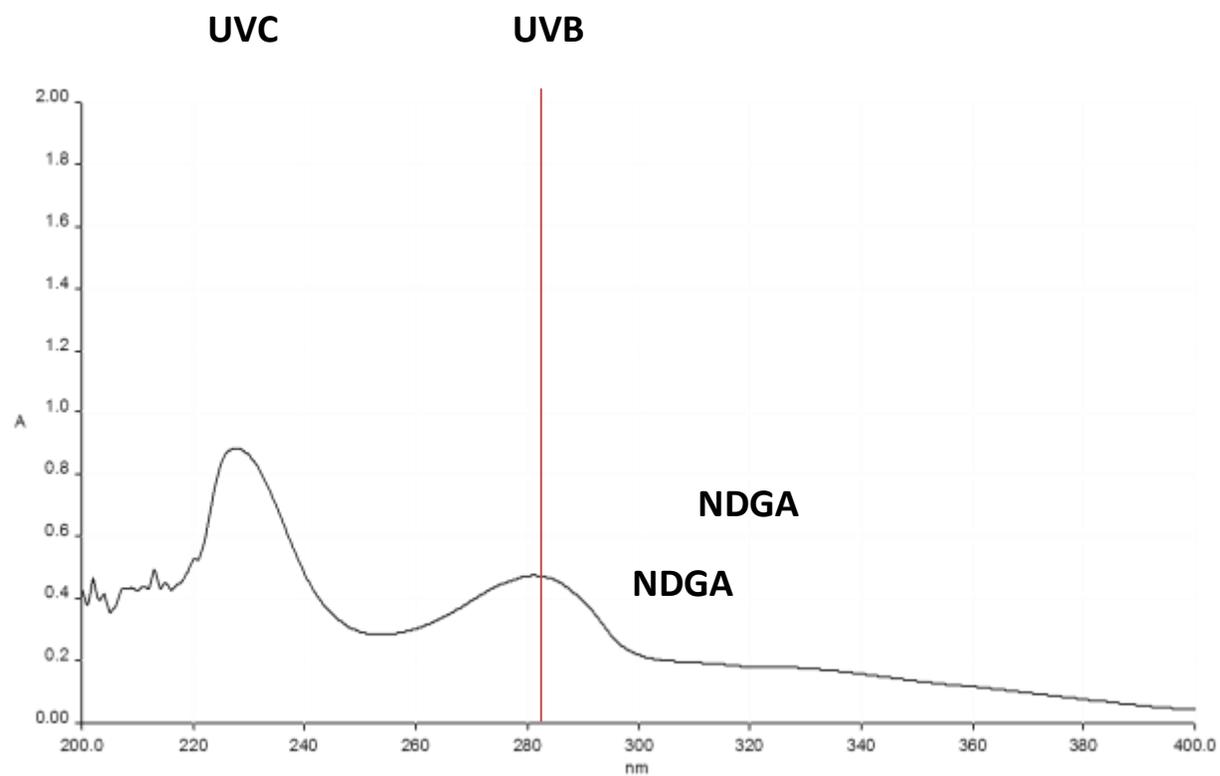


Figura 31. Espectro en luz UV del extracto de ramas en metanol de la localidad de ENS

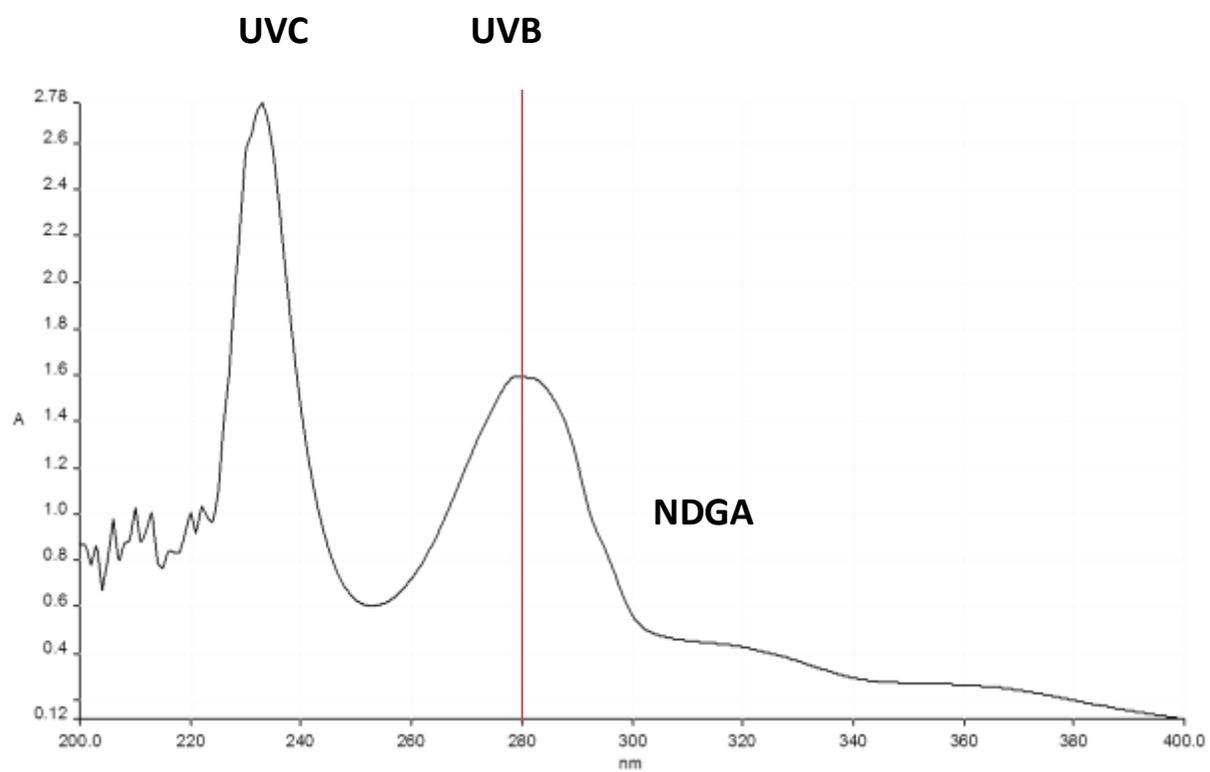


Figura 32. Espectro en luz UV del extracto de ramas en diclorometano de la localidad de SLP

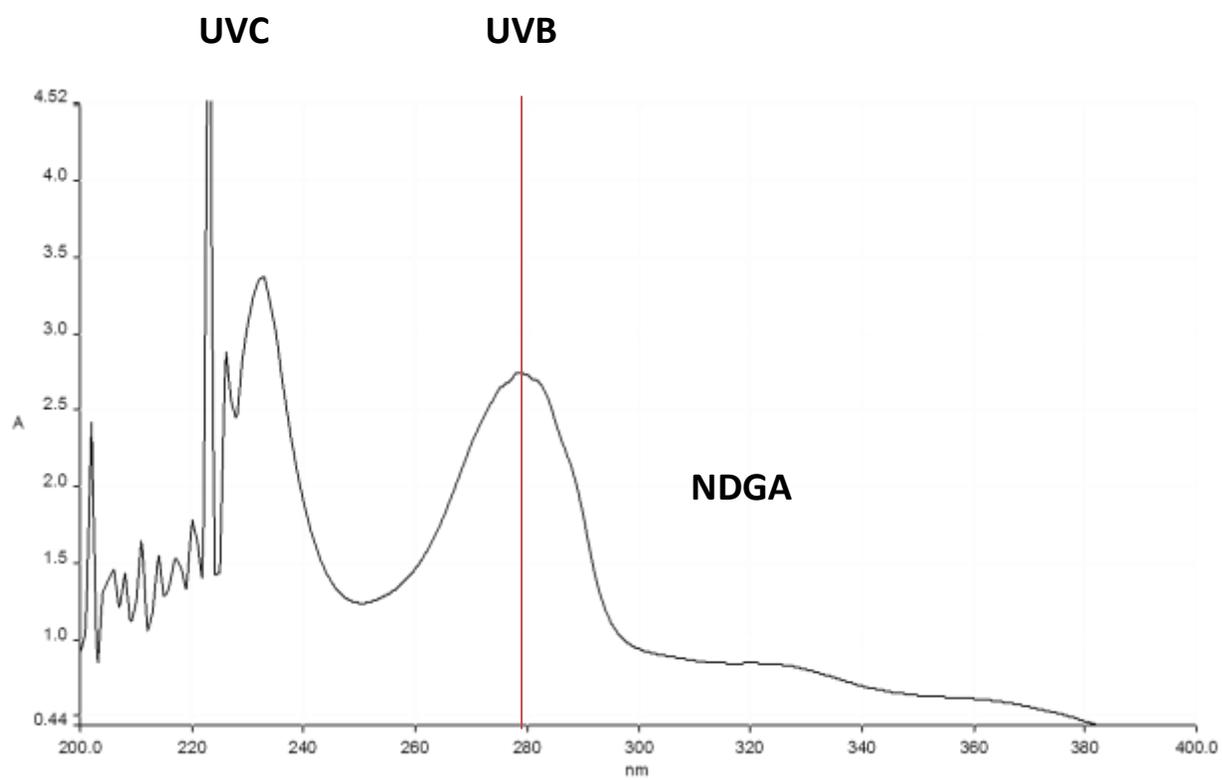


Figura 33. Espectro en luz UV del extracto de hojas en diclorometano de la localidad de ENS

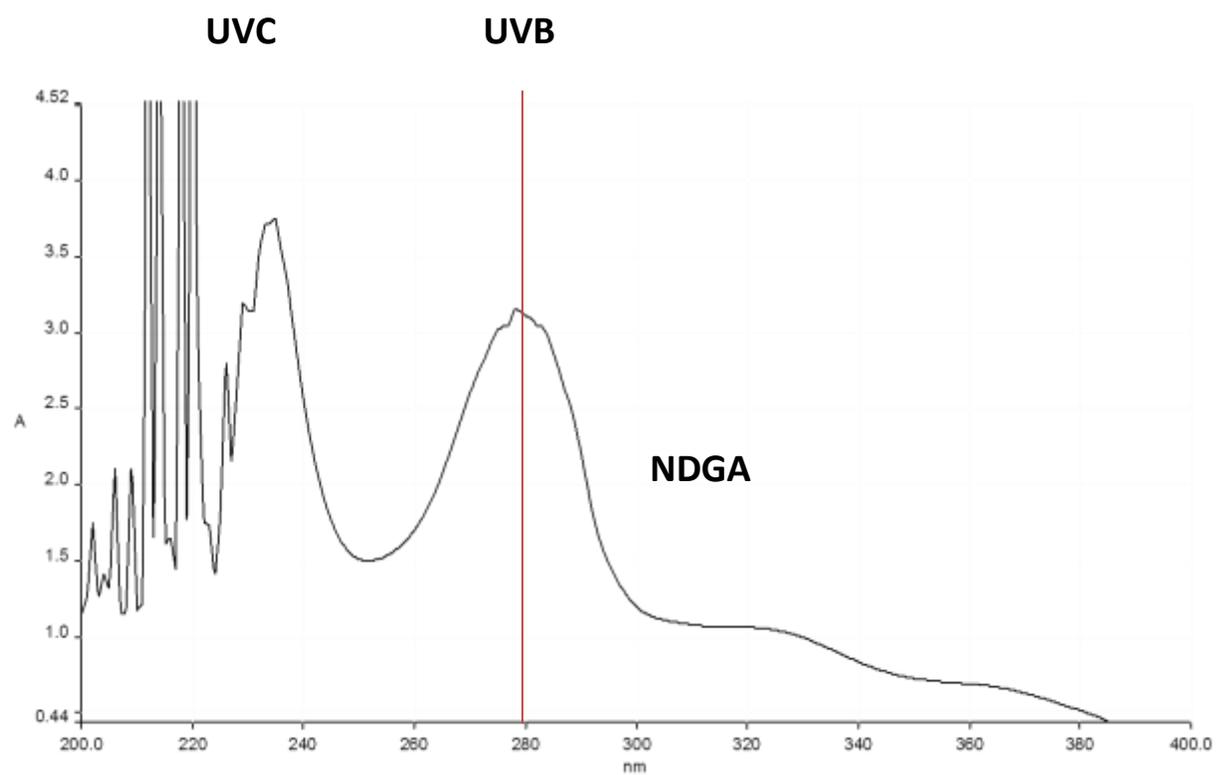


Figura 34. Espectro en luz UV (2 mg / 5 ml) del extracto de ramas en diclorometano de la localidad de ENS

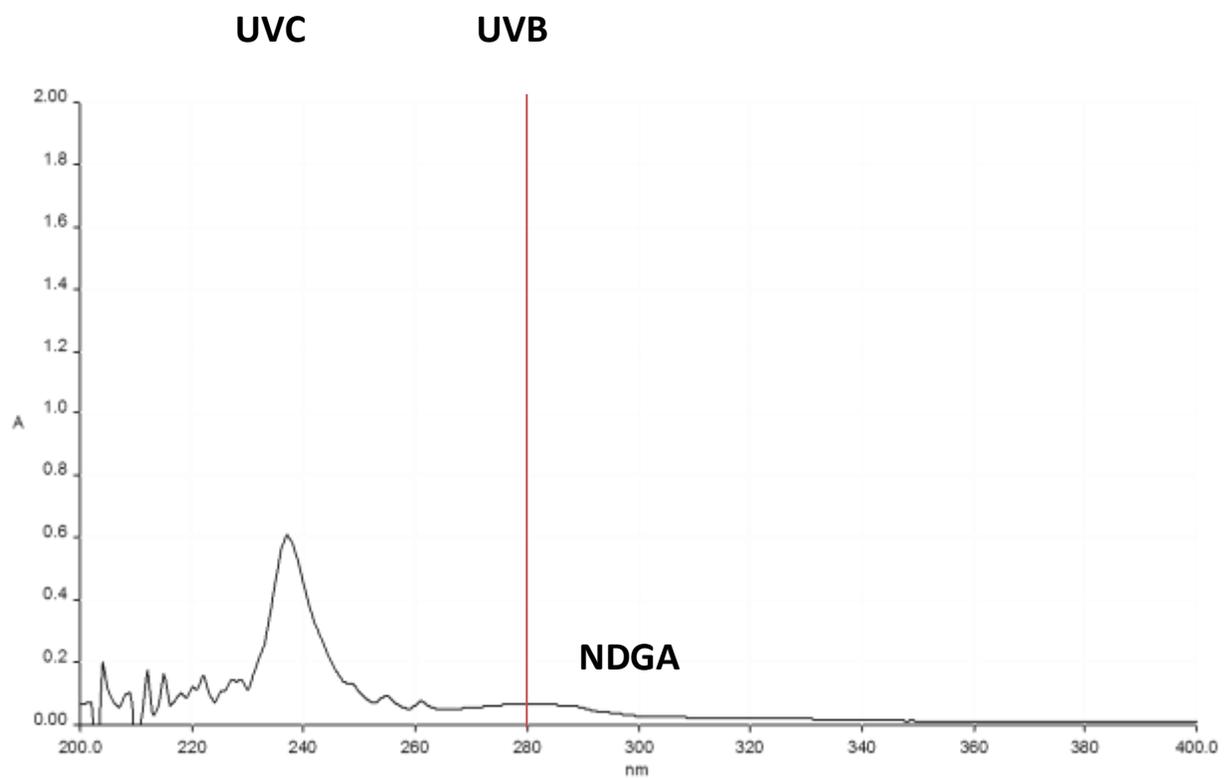


Figura 35. Espectro en luz UV del extracto de ramas en hexano de la localidad de SLP

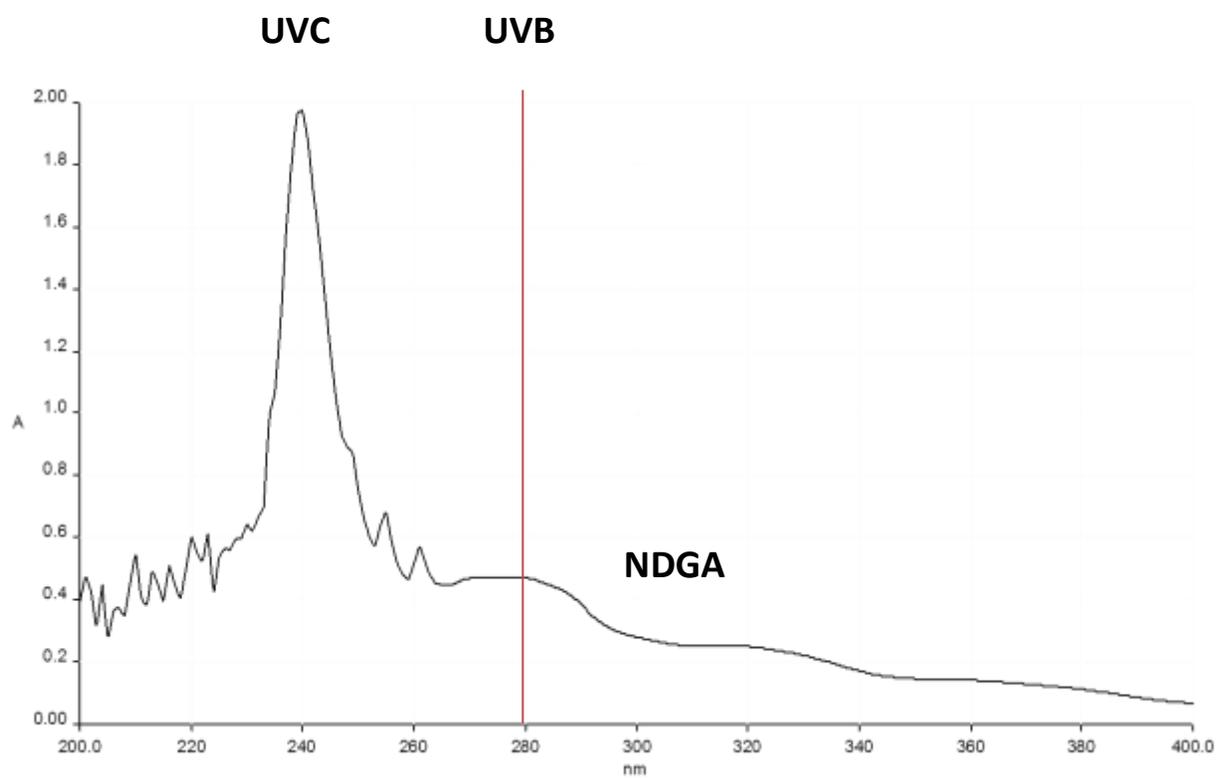


Figura 36. Espectro en luz UV del extracto de hojas en hexano de la localidad de ENS

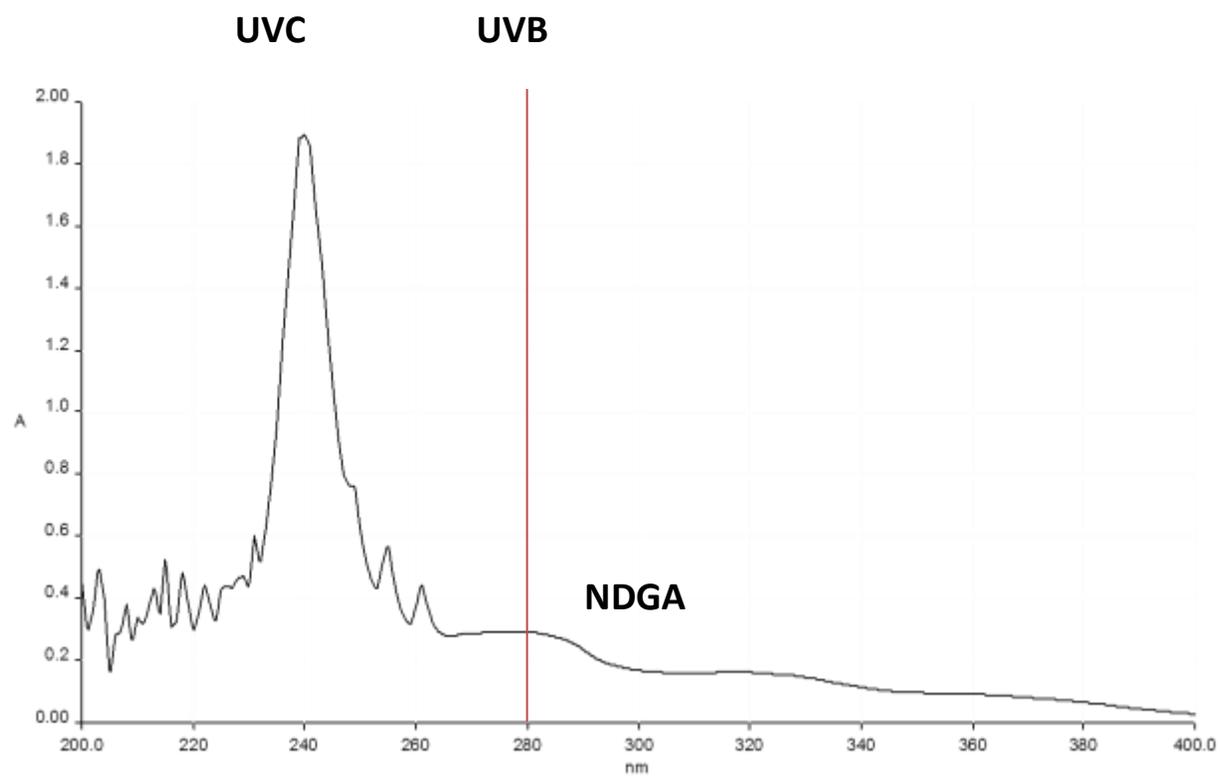


Figura 37. Espectro en luz UV del extracto de ramas en hexano de la localidad de ENS