



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**APROVECHAMIENTO DE LAS HOJAS DE DOS VARIEDADES
DE *RAPHANUS SATIVUS LINNEO*: RÁBANO NEGRO Y
RÁBANO ROJO COMO FUENTE DE UN FLAVONOIDE
(GARCINTINA).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ADRIANA CEDILLO QUIROZ

TUTOR

DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

VOCAL: Profesor: SIMÓN HERNÁNDEZ ORTEGA

SECRETARIO: Profesor: SILVIA CITLALLI GAMA GONZALES

1er. SUPLENTE: Profesor: GUSTAVO ADOLFO ZELADA GUILLEN

2° SUPLENTE: Profesor: NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHAVEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB 2-10, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES. INSTITUTO DE QUÍMICA, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

SUPERVISORA TÉCNICA (Si lo hay):

M. en C. ROSARIO TAVERA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE (S):

ADRIANA CEDILLO QUIROZ

Agradecimientos Institucionales

La presente investigación fue financiada por:

Proyecto SEP-CONACyT Investigación Científica Básica N° CY-253979: “Productos Naturales como agentes antitumorales”

Al Sistema Nacional de Investigadores-CONACyT por otorgarme el estímulo económico como ayudante de investigador nacional nivel III (EXP: AYTE. 15751).

Al Instituto de Química por todo el apoyo académico brindado y el préstamo de sus instalaciones para poder llevar a cabo mi proyecto de tesis. En especial al Dr. Manuel Jiménez Estrada por aceptarme en su área de trabajo y su apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio 2-10. También a mí asesora la M. en C. Rosario Tavera Hernández por compartir sus conocimientos y su ayuda en la realización de mi tesis.

Al Instituto de Biología; en especial a la M. en C. Verónica B. Juárez Jaimes por su apoyo y asesoría para la determinación del material vegetal realizado en el Herbario Nacional (MEXU).

A Julieta Sandoval Guillén por el servicio brindado en la Unidad de Servicios para la Industria de Alimentos.

Al personal técnico del Instituto de química en específico a la Dra. Beatriz Quiroz García del laboratorio de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, a la Q. F. B Ma. Del Rocío Patiño Maya por su capacitación en el Laboratorio de Espectroscopia y polarimetría, a la M. en C. Lucía del Carmen Márquez, la Q. Eréndira García Ríos y la M en C. Lucero Rios Ruiz por su amable atención en el Laboratorio de Cromatografía, a los técnicos la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan y el M. en C. Antonio Nieto Camacho por su apoyo en los ensayos de pruebas biológicas.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Rábano (<i>Raphanus sativus</i> Linneo)	3
3.1.1 Características generales	3
3.1.2 Usos.....	4
3.1.3 Composición química y contenido nutrimental	5
3.1.4 Actividad biológica	6
3.1.5 Producción	7
3.1.6 Manejo post-cosecha.....	8
3.2 Residuos	10
3.3 Residuos sólidos urbanos (RSU)	10
3.4 Residuos alimentarios	11
3.5 Impacto de los residuos orgánicos sobre la población y el medio ambiente.....	12
3.6 Valorización y aprovechamiento de residuos orgánicos	14
3.7 Criterios de selección de residuos con fines de aprovechamiento	14
3.8 Productos naturales	15
3.9 Compuestos fenólicos	16
3.10 Flavonoides	17
3.10.1 Estructura y clasificación.....	18
3.10.2 Extracción	19
3.10.3 Identificación por cromatografía en capa fina (CCF)	20
3.10.4 Separación por cromatografía en columna abierta de gel sílice (CCA) ...	20
3.10.5 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).....	20

3.10.6 Métodos espectrofotométricos y espectroscópicos para su identificación	21
3.11 Kaempferol	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos particulares	24
7. METODOLOGÍA	26
7.1 Esquema general de trabajo	26
7.2 Obtención del material vegetal	27
7.3 Identificación botánica del material vegetal	27
7.4 Preparación del extracto de acetato de etilo	27
7.4.1 Secado y macerado	27
7.4.2 Eliminación de clorofilas	28
7.4.3 Extracción con disolvente orgánico (Acetato de etilo)	28
7.5 Análisis previo al extracto de acetato de etilo	28
7.5.1 Cromatografía en capa fina	28
7.6 Aislamiento y purificación del compuesto A	29
7.6.1 Cromatografía en placa preparativa	29
7.6.2 Cromatografía en columna abierta	29
7.7 Caracterización química del compuesto A	30
7.8 Pruebas biológicas	31
7.8.1 Actividad citotóxica	31
7.8.2 Actividad antioxidante	31

7.8.3 Actividad antiinflamatoria	32
7.8.4 Actividad antidiabética	32
7.9 Estudio del extracto de acetato de etilo mediante CCF y HPLC de las hojas del rábano rojo	32
7.10 Análisis químico proximal	33
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1 Obtención e identificación botánica del material vegetal	34
8.2 Preparación de extracto de acetato de etilo	36
8.3 Análisis previo al extracto de acetato de etilo	36
8.3.1 Cromatografía en capa fina	36
8.4 Aislamiento y purificación del compuesto A	37
8.4.1 Cromatografía en placa preparativa	37
8.4.2 Cromatografía en columna abierta	38
8.5 Caracterización del compuesto A	39
8.5.1 Espectroscopía UV-Vis	40
8.5.2 Espectroscopía infrarroja (Anexos. Espectro 1)	40
8.5.3 Espectrometría de masas	41
8.5.4 Resonancia magnética nuclear	41
8.6 Pruebas biológicas	46
8.6.1 Actividad antioxidante	46
8.6.2 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa	48
8.6.3 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de edema en oreja de ratón inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)	49
8.6.4 Actividad citotóxica	49

8.7 Estudio del extracto de acetato de etilo mediante CCF y HPLC de las hojas del rábano rojo	50
8.8 Análisis químico proximal	53
9. CONCLUSIONES	55
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57
11. Anexos	66

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Rábano (<i>Raphanus sativus</i> Linneo).....	4
Figura 2. Proceso post-cosecha del rábano.....	9
Figura 3. Clasificación de residuos de acuerdo con LGPGIR	10
Figura 4. Esquema general de la descomposición de compuestos orgánicos	13
Figura 5. Estructura base flavonoides C3-C3-C6.....	18
Figura 6. Estructura de flavonoide, isoflavonoide y neoflavonoide.....	18
Figura 7. Sitios frecuentes del glucósido en flavonoides.....	19
Figura 8. Estructura del kaempferol	22
Figura 9. Rábano negro y rábano rojo (raíz con tallo y hojas).....	34
Figura 10. Ejemplar resguardado en el Herbario Nacional de México	35
Figura 11. a) Extracto metanólico b) Disolución acuosa sin clorofilas c) Extracto de acetato de etilo	36
Figura 12. Cromatografía en capa fina del extracto de acetato de etilo de rábano negro.	37
Figura 13. Fracciones seleccionadas en placa preparativa	37
Figura 14. Compuesto A.....	39

Figura 15. Cromatografía en capa fina del compuesto A	39
Figura 16. Espectro de absorción del compuesto A	40
Figura 17. Espectrómetro de masas (ESI) del compuesto A	41
Figura 18. Correlaciones observadas en el espectro HMBC.....	43
Figura 19. Correlaciones observadas en el espectro COSY	43
Figura 20. Estructura establecida para el compuesto A	44
Figura 21. Cromatografía en capa fina. A: compuesto A , RN: rábano negro, RR: rábano rojo.	51
Figura 22. Cromatograma del compuesto A	¡Error! Marcador no definido.
Figura 23. Cromatograma del extracto de acetato de etilo de rábano negro	52
Figura 24. Cromatograma del extracto de acetato de etilo de rábano rojo.....	52

TABLAS

Tabla 1. Contenido nutrimental del rábano rojo.....	6
Tabla 2. Actividad biológica de distintos extractos y partes del rábano.....	7
Tabla 3. Clasificación de compuestos polifenólicos según su estructura.....	17
Tabla 4. Condiciones cromatográficas empleadas en HPLC.....	33
Tabla 5. Fracciones obtenidas en columna abierta.....	38
Tabla 6. Datos obtenidos en los espectros de RMN para el compuesto A	45
Tabla 7. Porcentaje de inhibición del edema del extracto de acetato de etilo y el compuesto A	49
Tabla 8. Efecto de inhibición del crecimiento en distintas líneas celulares del compuesto aislado y el extracto de acetato de etilo.....	50
Tabla 9. A.Q.P de las hojas de las dos variedades de rábano	53

GRÁFICOS

Gráfico 1. Producción de rábano en el año agrícola 2002 en México	8
Gráfico 2. Composición porcentual de RSU producidos en México el año 2013.	11
Gráfico 3. Criterios para el aprovechamiento de residuos	15
Gráfico 4. Porcentaje de reducción del radica DPPH•	46
Gráfico 5. Efecto de inhibición de la peroxidación lipídica del compuesto A y el extracto de acetato de etilo.....	47
Gráfico 6. Efecto de inhibición de la enzima α -glucosidasa del compuesto A y el extracto de acetato de etilo.....	48

ANEXOS

Espectro 1. Espectro de infrarrojo (Pastilla con celdas de KBr) del compuesto A obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de <i>Raphanus sativus L. var. niger</i>	666
Espectro 2. Espectro de RMN- ¹ H (DMSO-d ₆ , 700 MHz) del compuesto A obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de <i>R. sativus L. var. niger</i>	677
Espectro 3. Espectro de RMN- ¹³ C (DMSO-d ₆ , 700 MHz) del compuesto A obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de <i>R. sativus L. var. niger</i>	678
Espectro 4. Experimento HSQC del compuesto A obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de <i>R. sativus L. var. Niger</i>	69
Espectro 5. Experimento HMBC del compuesto A obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de <i>R. sativus L. var. Niger</i>	670
Espectro 6. Experimento COSY del compuesto A obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de <i>R. sativus L. var. Niger</i>	671
Anexo 7. <u>Espectros de UV (dcha.) y EM (izq.) obtenidos del estudio de HPLC.....</u>	<u>672</u>

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
α	Alfa
λ	Longitud de onda
δ	Desplazamiento químico
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos por mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
^1H	Protón
^{13}C	Carbono-13
c/	Con
Ác.	Ácido
AGS	Aguascalientes
A.Q.P	Análisis químico proximal
B.H.T	Butilhidroxitolueno
BC	Baja California
BCS	Baja California Sur
C	Carbono
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CCP	Cromatografía en capa preparativa
CDMX	Ciudad de México
CH_3CN	Acetonitrilo
CHIH	Chihuahua

cm	Centímetros
COL	Colima
COSY	Correlación de núcleos de la misma especie
COX	Ciclooxigenasa
<i>d</i>	Doblete
D	Diámetro
DGO	Durango
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electroespray
etc.	Etcétera
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
FeSO ₄	Sulfato de hierro
g	Gramos
ga	Garcintina
GRO	Guerrero
GTO	Guanajuato
h	altura
H ₂ O	Agua
ha	Hectáreas
HMBC	Correlación heteronuclear a 2 o 3 enlaces de distancia
HOAc	Ácido acético

HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
HSQC	Correlación heteronuclear a 1 enlace de distancia
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
JAL	Jalisco
KBr	Bromuro de potasio
Kg	Kilogramos
LGPGIR	Ley general para la prevención y gestión integral de residuos
mbar	milibar
MeOH	Metanol
MEX	Estado de México
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
MICH	Michoacán
min	Minutos
mL	Mililitros
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetros
MOR	Morelos
M. en C.	Maestro en Ciencias
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio anhidro
nm	Nanómetros

O	Oxígeno
PUE	Puebla
Rf	Factor de retención
RME	Residuos de manejo especial
RMN	Resonancia magnética nuclear
RN	Rábano negro
RP	Residuos peligrosos
RR	Rábano rojo
RSU	Residuos sólidos urbanos
s	Segundos
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SIAP	Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera
SIN	Sinaloa
SiO ₂	Óxido de silicio o gel sílice
SLP	San Luis Potosí
SON	Sonora
TMS	Tetrametilsilano
Ton	Tonelada
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol
U.N.A.M	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
var.	Variedad
VER	Veracruz
YUC	Yucatán

1. RESUMEN

El rábano (*Raphanus sativus* Linneo) es una planta perteneciente a la familia de las crucíferas y existe una gran variedad de ellas las cuales difieren en el tamaño, color y forma. En México las variedades que más se consumen son rábano rojo y rábano negro, cuya raíz se utiliza principalmente como “condimento” y uso en la medicina tradicional.

Las hojas al no ser empleadas como la raíz terminan como residuos orgánicos, contribuyendo a la acumulación de éstos, ocasionando problemas ambientales. En el año 2013 México produjo 22 millones de toneladas de residuos orgánicos, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas para su reciclaje es de gran interés en el mundo.

En el presente proyecto de tesis se realizó el aislamiento de un producto natural a partir de los residuos; hojas, de rábano negro (*R. sativus* L. var *niger*) posteriormente se estudió mediante TLC y HPLC las hojas de rábano rojo (*R. sativus* L. var *sativus*) para proponerlo como fuente alterna del producto natural caracterizado e identificado. Adicionalmente se les realizó un análisis químico proximal (A.Q.P) a las hojas de ambas variedades de rábano.

Se aisló e identificó el compuesto **A**, un flavonoide con fórmula del tipo de la garcintina, mostrando actividad antiinflamatoria al inhibir un 20.72% la inflamación del edema en oreja de ratón inducido por TPA, así como presentar un 87% de inhibición en el crecimiento celular en la línea K562 (leucemia), sin embargo, no presentó actividad antioxidante, ni inhibición a la enzima α -glucosidasa.

Los resultados del A.Q.P demostraron que las hojas de ambas variedades de rábano presentaron una alta concentración de proteína, fibra y minerales.

Lo residuos de ambas variedades de rábano son una fuente del compuesto **A**, cuya aglicona; el kaempferol, es un flavonoide de gran importancia por su actividad biológica y diversas aplicaciones. Además, su composición nutrimental nos permite aprovecharlos para el consumo humano o animal.

2. INTRODUCCIÓN

El rábano (*Raphanus sativus* Linneo) es una hortaliza de raíz comestible de distintos tamaños, formas y colores. En México es común encontrar el rábano rojo en cualquier mercado, supermecado o central de abastos ya que usualmente se utiliza como guarnición en distintos platillos mexicanos o para preparar ensaladas.

Sin embargo, el rábano negro al ser utilizado como remedio para tratar diversas enfermedades (cálculos biliares, hígado graso, anemia, etc.) tiene una menor probabilidad de encontrarse como las demás hortalizas. Este sólo se adquiere en sitios dedicados a la venta de plantas medicinales como el mercado de Sonora o lugares con diversidad de frutas y hortalizas como la central de abastos.

Como toda hortaliza, ambas variedades de rábano pasan por una serie de etapas sucesivas antes de llegar a los puntos de venta, durante estas etapas es común la generación de residuos orgánicos, principalmente hojas y tallos. Otras fuentes generadoras de estos residuos son los puntos de venta y los hogares, ya que al momento de adquirir o consumir los rábanos, la raíz es desprendida de las hojas y tallos terminando en la basura formando parte de los residuos orgánicos cuyo destino final son los tiraderos a cielo abierto y rellenos sanitarios que ocasionan problemas de contaminación y salud.

Es por eso que se deben buscar alternativas para aprovechar los residuos orgánicos ya que es una problemática mundial. Entre las alternativas que existen para aprovechar los residuos orgánicos están: la producción de biocombustibles, la obtención de metabolitos de interés y productos naturales, así como, mejoradores de suelos transformándolos en composta y como suplemento alimenticio para animales.

3. ANTECEDENTES

3.1 Rábano (*Raphanus sativus* Linneo)

3.1.1 Características generales

El rábano (*Raphanus sativus* Linneo) es una planta anual o bianual perteneciente a la familia Brassicaceae o Cruciferae, se cree es originaria de China y con el transcurso del tiempo fue introducida a Asia central donde se obtuvieron formas cultivadas, de allí se expandió a Grecia, Roma y Egipto²⁰.

Esta planta llega a crecer de 60 a 90 cm de altura. Son de tallo muy corto y grueso el cual se encuentra unido a la raíz con hojas radicales, pubescentes y ásperas, divididas en lóbulos desiguales y márgenes profundamente dentadas. Las flores son blancas o ligeramente rosadas, con venillas violáceas, organizadas en racimos terminales y frutos tipo silicua, redondeados, agudos, alargados, gruesos cuyo interior tiene varias semillitas redondas de color rojizo⁴.

La raíz del *Raphanus sativus* L. es una hortaliza de cultivo de gran importancia en todo el mundo ya que se cultiva en climas templados todo el año, existe una gran variedad de acuerdo con el tamaño, color y forma. De acuerdo con la temporada de cultivo y tiempo de maduración podemos encontrar rábanos de forma redonda, globular, alargada o redonda-alargada. Los de forma alargada miden de 10 a 15 cm, mientras que las redondas tienen un diámetro de unos 2 a 5 cm, en tamaño podemos encontrar ejemplares que pesan 70 g o especies que llegan a pesar 1 kg o más. La piel puede ser de color negro, morado, roja, blanco o combinación de rojo y blanco, mientras que la pulpa es blanca o en especies asiáticas adquieren tono rosado⁷⁵.



Figura 1. Rábano (*Raphanus sativus* Linneo).

3.1.2 Usos

Desde la antigüedad, el rábano; nombre que usualmente hace referencia a la raíz, se utilizaba como alimento para los esclavos dedicados a la construcción de las pirámides en Egipto.²⁸ Otro uso que se le daba era en la medicina tradicional para prevenir o tratar cálculos hepáticos, cáncer, trastornos biliares y hepáticos, reumatismo, enfermedades respiratorias, escorbuto, como antiinflamatorio, diurético y para disminuir los niveles de colesterol en la sangre.^{4, 20}

Actualmente su consumo y uso en la medicina tradicional siguen vigentes, siendo la raíz la parte más empleada. Los países asiáticos son los principales consumidores, un ejemplo es Japón quien consume aproximadamente 500,000 toneladas de rábano al año, siendo el ingrediente principal para preparar un platillo tradicional llamado Takuan, alimento que se acostumbra comer al final de las comidas, pues se piensa que ayuda a la digestión.⁷⁵

En México el rábano rojo es un ingrediente que se ocupa como guarnición en platillos tradicionales como el pozole. Esta planta se utiliza popularmente contra la anemia en estados como Puebla, Tlaxcala y Yucatán. Además, se aconseja en el tratamiento de padecimientos del sistema excretor, como problemas de los riñones y el “mal de orín”.⁴

En cambio, el uso de las hojas no es tan común ya que son pocos los lugares en el mundo que las utilizan para su consumo. Algunas de las preparaciones como alimento es en sopas o cremas. Mientras que en la medicina tradicional las hojas se administran en infusión para tratar dolencias hepáticas o en modo de emplastos para golpes y luxaciones.²⁰

3.1.3 Composición química y contenido nutrimental

Como se mencionó, la raíz es la parte que se usa principalmente como ingrediente en la medicina tradicional y la cocina, por lo que los estudios fitoquímicos y nutrimentales reportados se enfocan en esta parte de la planta. Entre los compuestos que constituyen en mayor proporción al rábano se destacan compuestos azufrados como los glucosinolatos, isotiocianatos y compuestos fenólicos, responsables del efecto antioxidante.^{27, 30}

El rábano es un alimento con un bajo aporte calórico y de alto contenido en agua. En la Tabla 1 se muestra el contenido de nutrientes por cada 100 g de parte comestible (raíz). Entre sus principales nutrientes tenemos proteínas y fibra, así como vitaminas hidrosolubles (B1, B2, B3, B5, B6, B9 y C) y minerales (calcio, hierro, magnesio, potasio, fósforo y zinc).^{30, 49}

Cantidad de nutrientes por cada 100 g de parte comestible	
Agua	94-95 g
Carbohidratos	2.7-3.59
Lípidos	0.1-0.54 g
Proteínas	0.6-1g
Fibra	1-1.6 g
Cenizas	0.54 g
Calcio	21-34 mg
Potasio	232 -240 mg
Fósforo	18-31 mg
Sodio	24-59 mg
Hierro	0.29 -1.3mg
Tiamina	0.005- 0.04 mg
Riboflavina	0.02-0.045 mg
Niacina	0.3-0.4 mg
Ácido ascórbico	20-22 mg

Tabla 1. Contenido nutrimental del rábano rojo.

Los pocos estudios realizados a las hojas han demostrado que contienen mayor concentración de compuestos fenólicos, proteínas, fibra y minerales que la parte de la raíz por lo que puede ser considerado como otra fuente de alimento o materia prima para obtener compuestos con actividad antioxidante.²⁸

3.1.4 Actividad biológica

Recientemente, un gran número de estudios han demostrado que el rábano y sus extractos: acuoso, metanólico y de disolventes no polares, poseen actividad biológica, tal como, antioxidante, antimutagénica, efecto proliferativo, antimicrobiana, antiviral, anticancerígena y antidiabética.^{30, 31}

En la Tabla 2 se resume la actividad antimicrobiana, antimutagénica y antiviral para diversos microorganismos y virus, de distintos extractos obtenidos de diferentes partes del rábano.

	Extracto	Microorganismo/virus
Planta completa	Acuoso	<i>Sarcinia lutea</i> ¹ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ¹
Raíz	Etanólico	<i>Streptococcus mutans</i> ¹ <i>Candida albicans</i> ¹
	Acuoso	<i>Streptococcus mutans</i> ¹ <i>Candida albicans</i> ¹ <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 y TA 100 ²
	Jugo	<i>Bacillus subtilis</i> ¹ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹ <i>Salmonella thyphosa</i> ¹
Hojas	Acuoso	Virus Influenza ³

1. Actividad antimicrobiana, 2. Actividad antimutagénica, 3. Actividad antiviral

Tabla 2. Actividad biológica de distintos extractos y partes del rábano.

3.1.5 Producción

Las hortalizas son un cultivo de gran importancia para la alimentación y nutrición de la familia, ya que sus hojas, frutos, raíces, tallos y flores son consumidos para satisfacer las necesidades del cuerpo, por su alto contenido en minerales, vitaminas y proteínas.¹⁸

Las raíces de las distintas variedades del rábano son cultivadas como hortalizas de raíz o bulbo comestible en todo el mundo y es muy común en los huertos familiares. Se siembra preferentemente en otoño, primavera e invierno y se cosechan cuando la raíz alcanza un diámetro de 2 a 5 cm, aproximadamente a los 30 a 45 días de la siembra.³⁹

En México en el año agrícola 2002 se detectó una superficie sembrada en 19 estados, aportando en su conjunto una superficie de 2,922.15 ha con una producción nacional de 25,685.94 Ton, sobresaliendo tres estados como los principales productores: Puebla, Baja California y Jalisco (Gráfica 1). Los rendimientos más altos registrados fueron durante el ciclo agrícola primavera-V verano, pero con una mayor producción en el ciclo agrícola otoño-invierno⁶⁶

Desde 1990 Puebla ha sido el principal productor de rábano rojo, siendo Cholulula y Tecamachalco los dos distritos de mayor producción.

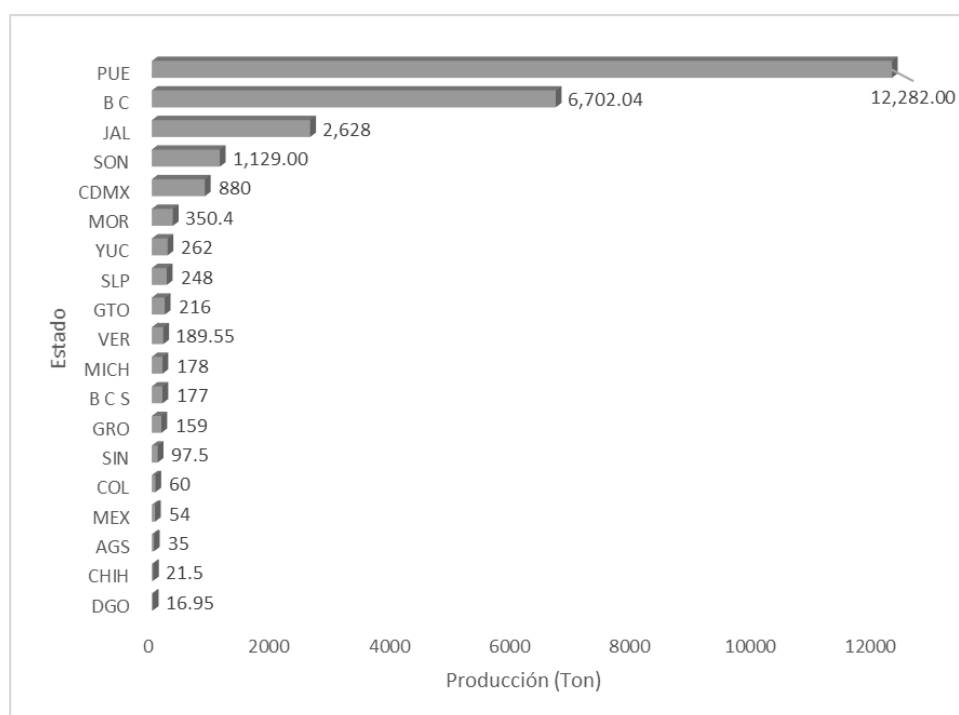


Gráfico 1. Producción de rábano en el año agrícola 2002 en México.

3.1.6 Manejo post-cosecha

Toda fruta u hortaliza antes de llegar a los puntos de venta debe pasar por una sucesión de actividades con el propósito de mantener la calidad y prolongar la vida de anaquel de éstos, este proceso se le conoce como manejo post-cosecha. En la Figura 2 se resume el proceso post-cosecha del rábano, el cual inicia con su recolección que consiste en colectar la planta y una vez cosechada se prosigue con su limpieza con agua potable o combinación de agua con desinfectantes y fungicidas. Una vez limpia la planta se pesa y se somete a un proceso de curado con la finalidad de cicatrizar las superficies dañadas y reducir el proceso de pudrición. De acuerdo con el tipo de rábano y especificaciones de la empresa se realiza o no la separación de hojas, el rábano rojo es común encontrarlo con las hojas ya que su color verde se asocia con la frescura del producto. En cambio, el

rábano negro se vende sin hojas esto debido a que puede ocasionar que la raíz se pudra ocasionando la pérdida total de la planta.

Cuando la raíz u hojas traen partes defectuosas éstas se eliminan cortando la zona dañada, de acuerdo con las exigencias del mercado esta operación no se realiza. Una vez teniendo nuestros rábanos libres de daños físicos o defectos, se procede a remover el exceso de agua superficial mediante un secado para evitar la proliferación de hongos y bacterias durante el almacenamiento. En cuanto se tiene seca la superficie de la raíz se realiza una clasificación de acuerdo con su tamaño para ser empacadas en canastillas o sacos de plástico para transportarlas al punto de venta (mercados, central de abasto, supermercados).

En México es común encontrar al rábano rojo a la venta en supermercados, mercados y central de abastos unido a las hojas en manojos, las cuales una gran cantidad terminan como residuo orgánico, debido a que en el momento de su uso o compra la gente pide se retiren las hojas. En cambio, el rábano negro sólo se adquiere en puestos dedicados a la venta de plantas medicinales o mercados grandes como la central de abasto, los cuales se venden sin hojas.

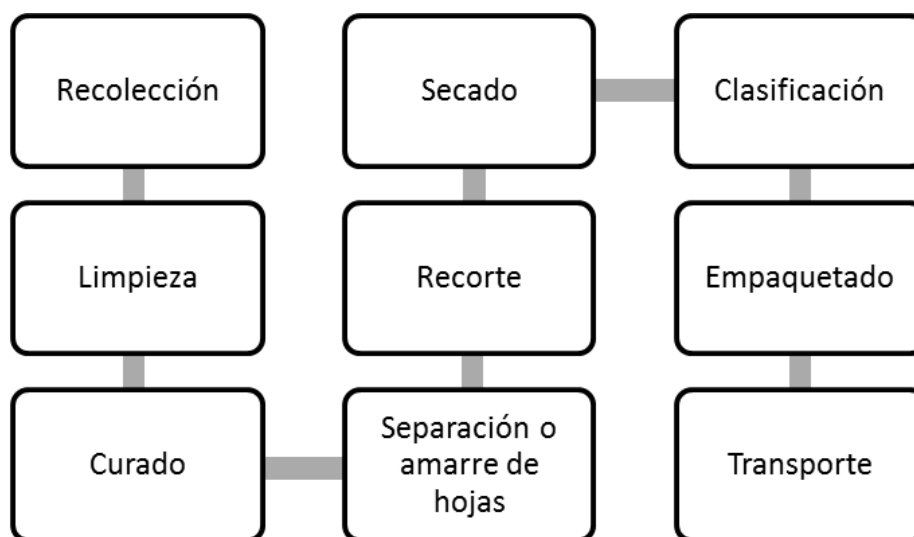


Figura 2. Proceso post-cosecha del rábano.

3.2 Residuos

Los residuos de acuerdo con la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) se definen como aquellos materiales o productos cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentra en estado sólido o semisólido, líquido o gaseoso y que se deposita en recipientes o en contenedores; pueden ser susceptibles de ser valorizados o requieran sujetarse a un tratamiento o disposición final conforme a lo dispuesto en la misma Ley.⁶³

El término “residuos”, se aplica a aquellos que pueden tener o no un valor comercial, sin embargo, algunos de sus constituyentes aún en baja proporción, le pueden conferir algún interés para su uso.⁶¹

Los residuos de acuerdo con sus características y origen se clasifican en tres grupos: residuos sólidos urbanos, residuos de manejo especial y residuos peligrosos.

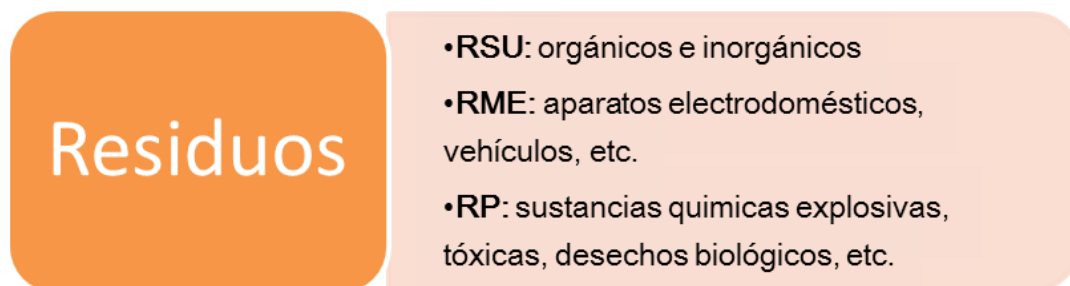


Figura 3. Clasificación de residuos de acuerdo con LGPGIR.

3.3 Residuos sólidos urbanos (RSU)

De acuerdo con el Diario Oficial de la Federación los residuos sólidos urbanos son los que se generan en las casas habitación como resultado de la eliminación de los materiales que se utilizan en las actividades domésticas o los que provienen también de cualquier otra actividad que se desarrolla dentro de los establecimientos o en la vía pública, con características domiciliarias, los resultantes de las vías y lugares públicos siempre que no sean considerados como residuos de otra índole.

Los residuos sólidos urbanos se componen de la siguiente manera: residuos orgánicos, papel, plástico, vidrio, metales y otros.

En México durante la segunda mitad del siglo pasado la gran demanda de materias primas para cubrir las necesidades de los ciudadanos ha traído como consecuencia el incremento de residuos y con ello afectaciones al ecosistema y salud humana. El crecimiento urbano, el desarrollo industrial y el cambio en los patrones de consumo son algunas de las causas que ha provocado la generación de residuos en México. En el año 2013 México generó 42 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos constituyendo un 52.4% los residuos orgánicos.⁴⁰

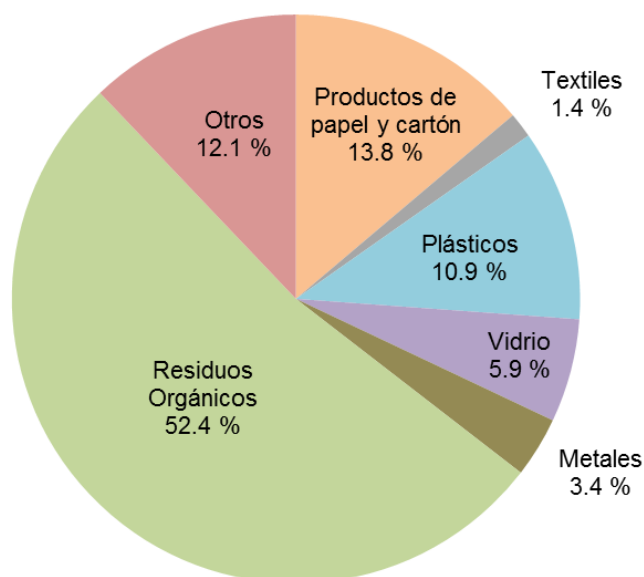


Gráfico 2. Composición porcentual de RSU producidos en México el año 2013.

3.4 Residuos alimentarios

En México la industria de alimentos es de gran importancia económica y social, la cual va incrementando junto al crecimiento de la población, se estima que la población crecerá 1.1% durante el periodo 2011-2020 ocasionando el incremento en la demanda en alimentos procesados, lo que provocará el aumento de residuos alimentarios.⁶³

La industria de alimentos produce grandes cantidades de subproductos y residuos alimentarios, entre éstos se encuentran los que provienen de frutas y hortalizas.⁷⁵

Otra fuente generadora de residuos orgánicos son las centrales de abasto, la central de la ciudad de México genera alrededor de 780 toneladas diarias de desechos.

Las características de los residuos alimentarios son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó, no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina.⁶¹

En pocas palabras algunos desechos alimentarios forman parte de los residuos orgánicos. El SEMARNAT define a los residuos orgánicos como desechos de origen biológico que alguna vez estuvo vivo o fue parte de un ser vivo. Estos residuos se distinguen por ser biodegradables y están conformados por residuos de jardines, alimentos y materiales orgánicos similares como residuos agroindustriales.⁶³

3.5 Impacto de los residuos orgánicos sobre la población y el medio ambiente

En México, los residuos generados del procesamiento de alimentos derivados de la industria azucarera, agricultura, pesca, industria animal y fabricación de bebidas son considerados sectores contaminadores del medio ambiente.³³

El problema al que se enfrentan los residuos orgánicos es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, por la falta de capacidad tecnológica y recursos económicos para su manejo. En México sólo se recicla el 3.92% de los residuos inorgánicos, por lo que el tratamiento de los residuos orgánicos es nulo.

El manejo de los residuos sólidos urbanos, se resume en un ciclo, el cual comienza con su generación y acumulación temporal, continuando con su recolección, transporte y transferencia, culminando en el destino final de los mismos, que puede ser el reciclaje de los subproductos útiles y su reutilización, que en la ciudad de México no llega ni al 15%, por lo que la mayoría terminan en

tiraderos a cielo abierto o rellenos sanitarios; este tipo de prácticas repercute de forma ambiental, social y económica.⁴¹

Como se mencionó antes, los principales residuos generados son los orgánicos ocupando gran espacio en tiraderos, ocasionando que estos últimos deban extenderse.

Durante la descomposición de los residuos orgánicos ocurren los procesos de respiración aeróbica y anaeróbica de donde se obtienen principalmente los siguientes productos: agua, metano y dióxido de carbono, los últimos dos productos forman parte de los gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático en el mundo. Mientras que el agua al mezclarse con la lluvia se filtra a través de las capas de basura llegando al subsuelo ocasionando la contaminación de mantos freáticos y acuíferos.^{14, 41}

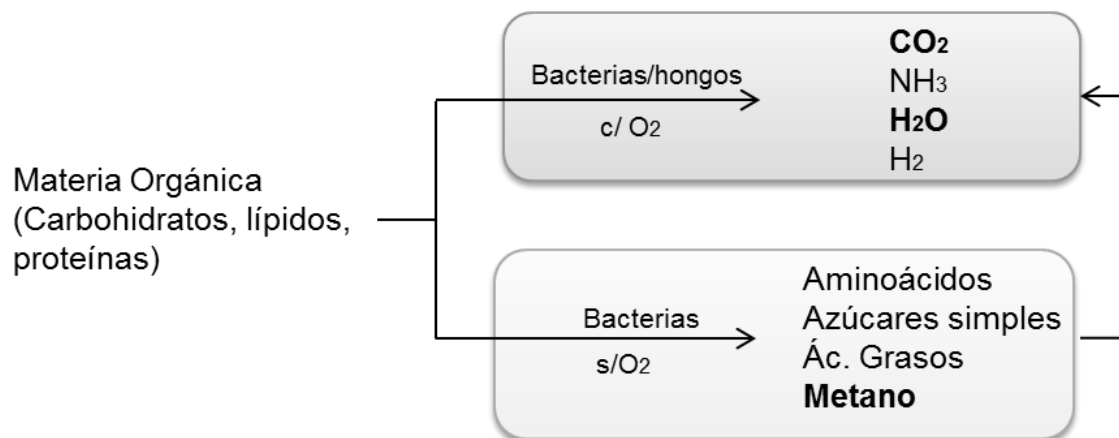


Figura 4. Esquema general de la descomposición de compuestos orgánicos.

Otro problema importante producido por los “tiraderos a cielo abierto” es que los residuos orgánicos disponen a atraer numerosos grupos de especies de insectos, aves y mamíferos que pueden transformarse en vectores de enfermedades peligrosas como salmonelosis, fiebre amarilla, amebiasis, entre otros.

3.6 Valorización y aprovechamiento de residuos orgánicos

Debido a las consecuencias ambientales y salubres que producen los residuos orgánicos, es importante que las autoridades establezcan programas para su aprovechamiento y manejo, actualmente el SEMARNAT ha promovido los hábitos de separación y difusión de información para el manejo de los residuos orgánicos. Pero los más interesados desde hace décadas en el aprovechamiento de estos residuos son varios investigadores a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes; celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina, pueden servir de materia prima para generar diversos productos de interés.^{61, 79}

A continuación, se enlistan diversos usos que pueden ser aprovechados a partir de residuos orgánicos:

- Como sustrato para la producción fermentativa de metabolitos de interés
- Mejoradores o acondicionadores de suelos obtenidos mediante composteo
- Suplemento alimenticio para animales
- Como sustrato para la generación de bioenergéticos
- Obtención de productos naturales

3.7 Criterios de selección de residuos con fines de aprovechamiento

Para que un residuo pueda ser aprovechado es importante cumpla con alguno de los criterios de selección que se enlistan a continuación:

- El principal componente del residuo pueda ser utilizado como sustrato para la producción fermentativa de insumos de procesos industriales, o bien, que el material pueda ser sometido a extracciones para recuperar alguno de sus componentes que tenga un mercado demandante.
- El residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés.
- Que no requiera pre-tratamiento, y en caso de requerirlo, que este sea económico y sencillo.

- Que la disponibilidad del residuo permita planificar el proceso para el cual se va a utilizar.
- Que sea estable, es decir, que no se descomponga fácilmente bajo las condiciones ambientales del sitio donde se genera.⁶¹
-



Gráfico 3. Criterios para el aprovechamiento de residuos.

3.8 Productos naturales

Un producto natural es cualquier sustancia aislada de un organismo vivo, ya sean bacterias, hongos, líquenes, plantas o animales. El término es usado por los químicos desde finales del siglo XVIII hasta la actualidad, ya que desde entonces se emplean procedimientos experimentales para su extracción, aislamiento y caracterización de las sustancias. Su formación se justifica por los procesos metabólicos que se llevan a cabo en la materia viviente, los productos naturales se originan a partir del metabolismo secundario por lo que también se emplea el término de metabolitos secundarios.

La investigación de los productos naturales ha logrado avances sobresalientes en cuanto a los pigmentos y colores naturales, sobre los principios activos de plantas usadas tradicionalmente para fines médicos, veterinarios o agronómicos, saborizantes, edulcorantes, entre otros. Sus hallazgos han coadyuvado al desarrollo de industrias farmacéuticas, agronómicas, de alimentos, cosmética, entre muchas otras. También ha permitido avances en la comprensión integral de los fenómenos biológicos complejos, incluyendo aspectos ambientales, ecológicos y evolutivos.

Los productos naturales son sustancias que permiten el intercambio de información entre los seres vivos, y manifiestan una o varias actividades biológicas, esto quiere decir pueden penetrar en los ambientes celulares de otros organismos generándole una respuesta favorable o desfavorable.¹⁶

Los productos naturales comprenden diferentes compuestos como: alcaloides, triterpenos, compuestos fenólicos, iridoides, entre otros.

3.9 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Estos compuestos son uno de los principales metabolitos secundarios de las plantas cuya función es contribuir en funciones metabólicas para su crecimiento y reproducción, así como protegerlas contra patógenos y depredadores. En alimentos de origen vegetal atribuyen propiedades organolépticas como color, amargor, astringencia y aroma.^{24, 52}

En la actualidad se conocen más de 4,000 compuestos fenólicos en los que se destacan fenoles simples, fenoles ácidos, cumarinas, xantonas, benzofenonas, estilbenos, quinonas, betacianinas, ligninas, lignanos, taninos y flavonoides. Se pueden clasificar estructuralmente de acuerdo con el número de átomos de carbonos.⁶⁹

Átomos de Carbono	Estructura básica	Clase
6	C6	Fenoles simples
7 o 9	C6-C1, C6-C3	Fenoles ácidos Cumarinas
10	C6-C4	Naftoquinonas
13	C6-C1-C6	Xantonas Benzofenona
14	C6-C2-C6	Estilbenos
15	C6-C3-C6	Flavonoides Taninos

Tabla 3. Clasificación de compuestos polifenólicos según su estructura.

3.10 Flavonoides

Los flavonoides son un producto natural que constituyen un amplio grupo de compuestos fenólicos procedentes del metabolismo secundario de los vegetales. Son pigmentos hidrosolubles que se encuentran en el citoplasma, vacuolas y membranas de las células vegetales, tanto en estado libre (aglicona) como glicosilado y constituyen el grupo más amplio de fenoles naturales. Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, frutas, vegetales, granos, ciertos alimentos como té y vino, solo algunos se han detectado en hongos y algas.

Actualmente se considera un compuesto indispensable en una variedad de aplicaciones nutraceuticas, farmacéuticas, médicas y cosméticas. Esto se les atribuye a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatoria, antimutagénica y anticancerígena.⁵¹

Entre las funciones más importantes de los flavonoides en las plantas, se encuentran:

- Protección ante la luz UV (UV-B)
- Defensa contra los herbívoros y plagas
- Atracción de insectos polinizadores y/o presas.
- Atracción de animales dispersores de semillas y frutos
- Contribuir al crecimiento

Además de las funciones propias en las plantas, los flavonoides son cotizados por sus propiedades biológicas que ejercen en otros organismos, actualmente por sus efectos benéficos en la salud.

3.10.1 Estructura y clasificación

Los flavonoides son compuestos fenólicos con una estructura del tipo C₆-C₃-C₆, con los anillos bencénicos unidos entre sí por una cadena de tres carbonos. La estructura puede conformar un heterociclo (fenilbenzopirano) o una cadena abierta, como las chalconas (Figura 5).

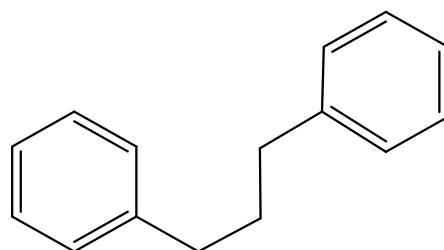


Figura 5. Estructura base flavonoides C₃-C₃-C₆.

Por otra parte, dependiendo de la posición del anillo aromático (B) al residuo de benzopirano (C) los flavonoides se clasifican en 3 grupos: flavonoides (2-fenilbenzopirano), isoflavonoides (3-fenilbenzopirano) y neoflavonoides (4-fenilbenzopirano).

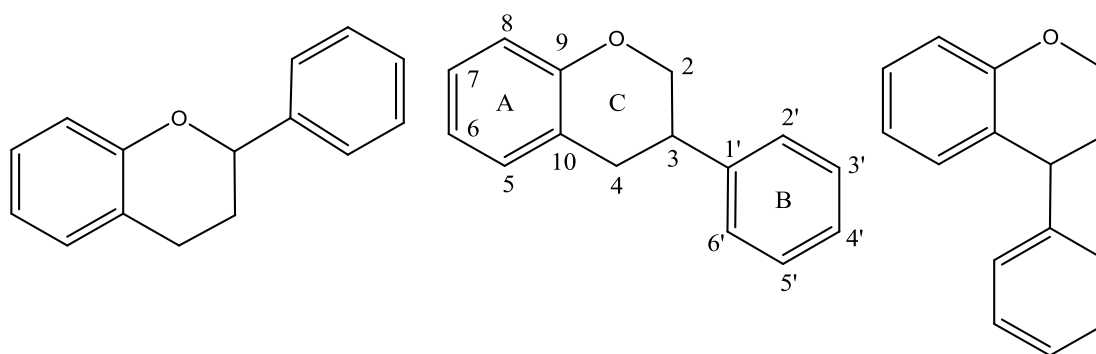


Figura 6. Estructura de flavonoide, Isoflavonoide y neoflavonoide.

A partir del grupo de los flavonoides se derivan distintas estructuras de acuerdo con el grado de oxidación y saturación del anillo C: antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, chalconas, auronas, flavanonas, flavanos y proantocianidinas, biflavonoides, etc.

Los sitios más frecuentes de hidroxilación en los flavonoides ocurren en las posiciones 5, 7, 3' y 4'. Como se mencionó anteriormente, los flavonoides se pueden encontrar en la naturaleza como agliconas o en forma de O-glicósidos o C-glicósidos, unidos por una glucosa, ramnosa o galactosa. Los azúcares forman O-glicósidos en las posiciones 3, 5, 6, 7, 8 y 4' y los C-glicósidos se presentan sobre C6 y C8.

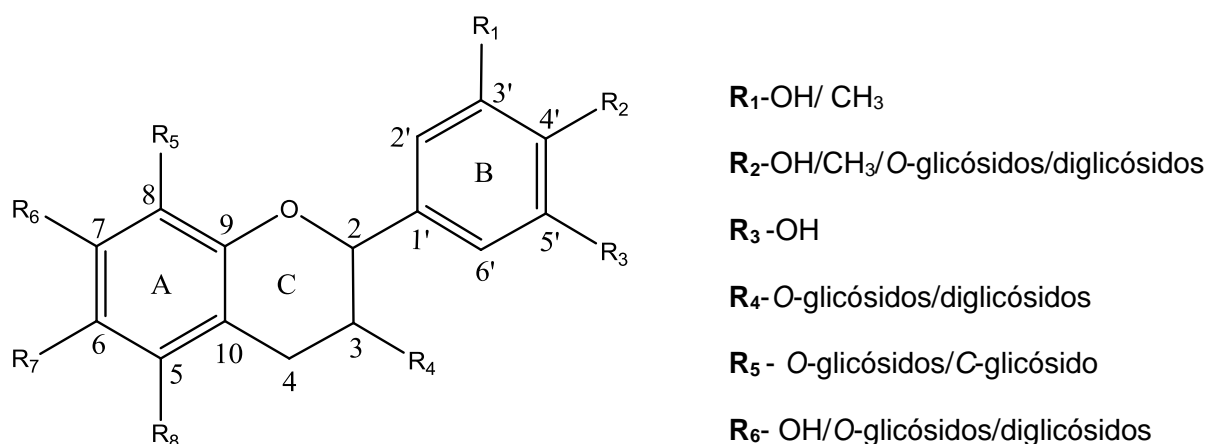


Figura 7. Sitios frecuentes de glicosilación en flavonoides.

3.10.2 Extracción

La extracción de flavonoides generalmente se realiza mediante el macerado del material vegetal en disolventes orgánicos, con previo tratamiento de secado para evitar se degraden enzimáticamente. El disolvente se elige conforme a la polaridad del flavonoide a estudiar, como se había mencionado anteriormente estos compuestos poseen un gran número de grupos hidroxilo libres o azúcares considerándose compuestos polares, por lo que son muy solubles en disolventes orgánicos como acetona, metanol, agua o mezclas, con posterior filtración. El filtrado se concentra y el metanol es eliminado; la capa acuosa es sucesivamente extraída por partición con una serie de disolventes orgánicos (éter, diclorometano

y acetato de etilo). Este proceso deja a los flavonoides poco polares en el extracto etéreo, los de mediana polaridad en el cloroformo y los más polares en el acetato de etilo.^{16, 32}

3.10.3 Identificación por cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada para determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras, etc. Como método de análisis rápido, requiere de muy pequeñas cantidades de muestra; se pueden utilizar como soporte: celulosa, gel de sílice y poliamida. El revelado de la cromatoplaqueta se realiza a luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm donde muchos flavonoides aparecen como puntos coloreados, la aplicación de reactivos por aspersion es una técnica que facilita su detección.^{16, 32}

3.10.4 Separación por cromatografía en columna abierta de gel sílice (CCA)

La cromatografía en columna es la técnica más utilizada para separar o aislar flavonoides a partir de un extracto crudo de planta. Esta técnica básicamente consiste en la aplicación de una mezcla de flavonoides a la columna, la cual con un poderoso adsorbente y la subsecuente elución secuencial de los compuestos individuales con disolventes apropiados. La técnica de columna de gel sílice puede ser usada para la separación de flavonoides relativamente no polares derivados de agliconas como isoflavonas y flavonas metoxiladas; así como flavonoles.^{16, 32}

3.10.5 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

Esta técnica puede ser usada para la separación, determinación cuantitativa e identificación de flavonoides. Muestra niveles de resolución y sensibilidad mucho mayores que la cromatografía de capa fina, por lo que es usada para verificar la homogeneidad de las muestras aisladas por otras técnicas. Para el sistema de elución se usan sucesivamente disolventes como H₂O/MeOH, H₂O/MeOH/HOAc,

H₂O/CH₃CN en variadas proporciones utilizando sistemas de elución isocráticos o por gradientes.^{16, 32}

3.10.6 Métodos espectrofotométricos y espectroscópicos para su identificación

La espectrofotometría UV es ampliamente usada para la detección de flavonoides por requerir sólo pequeñas cantidades del compuesto puro y no destruirla. El espectro en metanol provee información sobre el tipo de flavonoide y el estado de oxidación. El máximo de absorción de los flavonoides varía de acuerdo con el estado de oxidación del anillo central y según el número y posición de grupos –OR, como resultado de los diferentes sistemas conjugados.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y de ¹³C son métodos bien establecidos para el análisis estructural de flavonoides. Hoy en día es posible hacer las asignaciones completas de todas las señales de hidrógenos y carbonos en el espectro de RMN de la mayoría de los flavonoides. Estas asignaciones se basan en los desplazamientos químicos y en las constantes de acoplamiento (*J*) observadas en espectros de hidrógeno y carbono en una dimensión.

De particular utilidad son los métodos que permiten el registro de dos dimensiones mostrando interacciones homonucleares (COSY) y espectroscopía con efecto nuclear Overhauser (NOESY), así como correlaciones heteronucleares (HSQC, HMBC) para facilitar la adquisición de toda la información estructural acerca de una aglicona y la correspondiente sustitución del azúcar, así como diglicósidos.

La espectrometría de masa es un método analítico muy sensible para la identificación de flavonoides o para llevar a cabo la caracterización estructural parcial, utilizando pequeñas cantidades de muestra. La técnica por impacto electrónico (EM-IE) se aplica principalmente para agliconas, ya que los glicósidos flavonoides son termolábiles y son susceptibles a descomposición, para ello es necesario aplicar métodos de ionización más suaves, como por ejemplo la técnica

de bombardeo rápido de átomos, técnicas de ionización química por desorción, ionización por electrospray, entre otras.^{16, 32}

3.11 Kaempferol

El kaempferol es un producto natural reconocido por su diversa actividad farmacológica y nutracéutica encontrándose distribuido como glicósido principalmente en diversas plantas, frutas y hortalizas. Este flavonoide se obtiene a partir de una extracción con etanol o metanol de fuentes naturales. Posteriormente para eliminar el azúcar del glicósido se debe realizar una hidrólisis enzimática o ácida para obtener la aglicona correspondiente.

Estudios han demostrado que el kaempferol y alguna de sus formas glicosiladas se caracterizan por su actividad biológica: antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria y su efecto cardioprotector. El cual lo hace un producto de interés para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.^{21, 23} El costo de 10 mg puede ser de \$1,300 a \$8,000 pesos de acuerdo al grado de pureza, siendo como muchos otros productos naturales una tentativa para su producción.

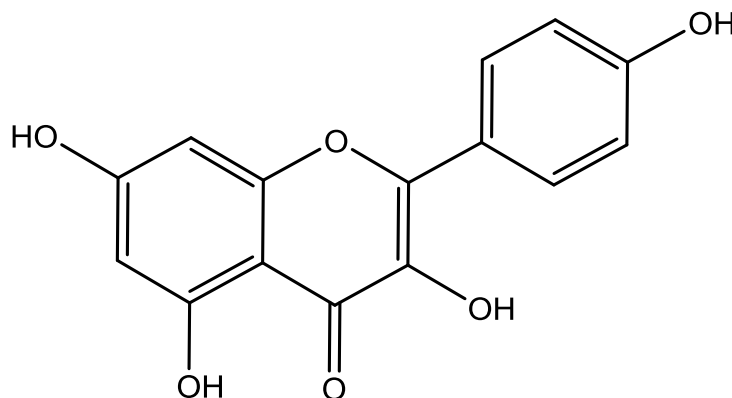


Figura 8. Estructura del kaempferol.

4. JUSTIFICACIÓN

Durante la post-cosecha y comercialización de las hortalizas en las centrales de abastos y mercados ambulantes se generan una gran cantidad de residuos vegetales; principalmente tallos y hojas, por lo tanto es importante buscar estrategias para el aprovechamiento de estos residuos. Ya que sólo un pequeño porcentaje de estos es aprovechado y el resto termina como desecho en tiraderos, convirtiéndose en un problema ambiental y de salubridad.

El rábano (*Raphanus sativus* Linneo), es un ejemplo de generador de residuos vegetales ya que en su mayoría sólo se ocupa la raíz, mientras que las hojas terminan en tiraderos. Entre las variedades de rábano existentes, el rábano negro (*Raphanus sativus* var. *niger*) se caracteriza por sus diversos usos etnofarmacológicos, es por ello el interés de estudiar sus residuos ya que son pocos los usos descritos para las hojas de esta especie. En la búsqueda del aprovechamiento de los residuos se debe cumplir una serie de criterios entre los cuales se destaca su disponibilidad, siendo las hojas del rábano rojo los residuos que más se generan y de fácil adquisición.

El estudio de la composición química y nutrimental de las hojas de dos variedades de rábano permitirá ampliar el conocimiento de esta planta, con la finalidad de aprovechar mejor sus residuos, con el objetivo de aislar y caracterizar un producto natural constituyente de estas partes de la planta; así como, también buscar un uso por su fuente de fibra y minerales.

5. HIPÓTESIS

El rábano (*Raphanus sativus* Linneo) son raíces que se destacan por su alto consumo en todo el mundo como “condimento” y también por su uso en la medicina tradicional debido a su contenido de minerales, fuente de glucosinolatos, isotiocianatos, compuestos fenólicos y como fibra dietética. Por lo que las hojas que se convierten en residuos sin ningún uso pueden ser aprovechados como otra fuente de nutrientes y de productos naturales.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Aislar e identificar algún producto natural presente en el extracto de acetato de etilo de las hojas del rábano negro (*Raphanus sativus* L. var. *niger*), establecer si lo contienen las hojas del rábano rojo (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*), evaluar su actividad biológica y proponer a estos residuos como una fuente alterna del producto natural caracterizado e identificado. Adicionalmente estudiar la composición nutrimental de ambas variedades de rábano.

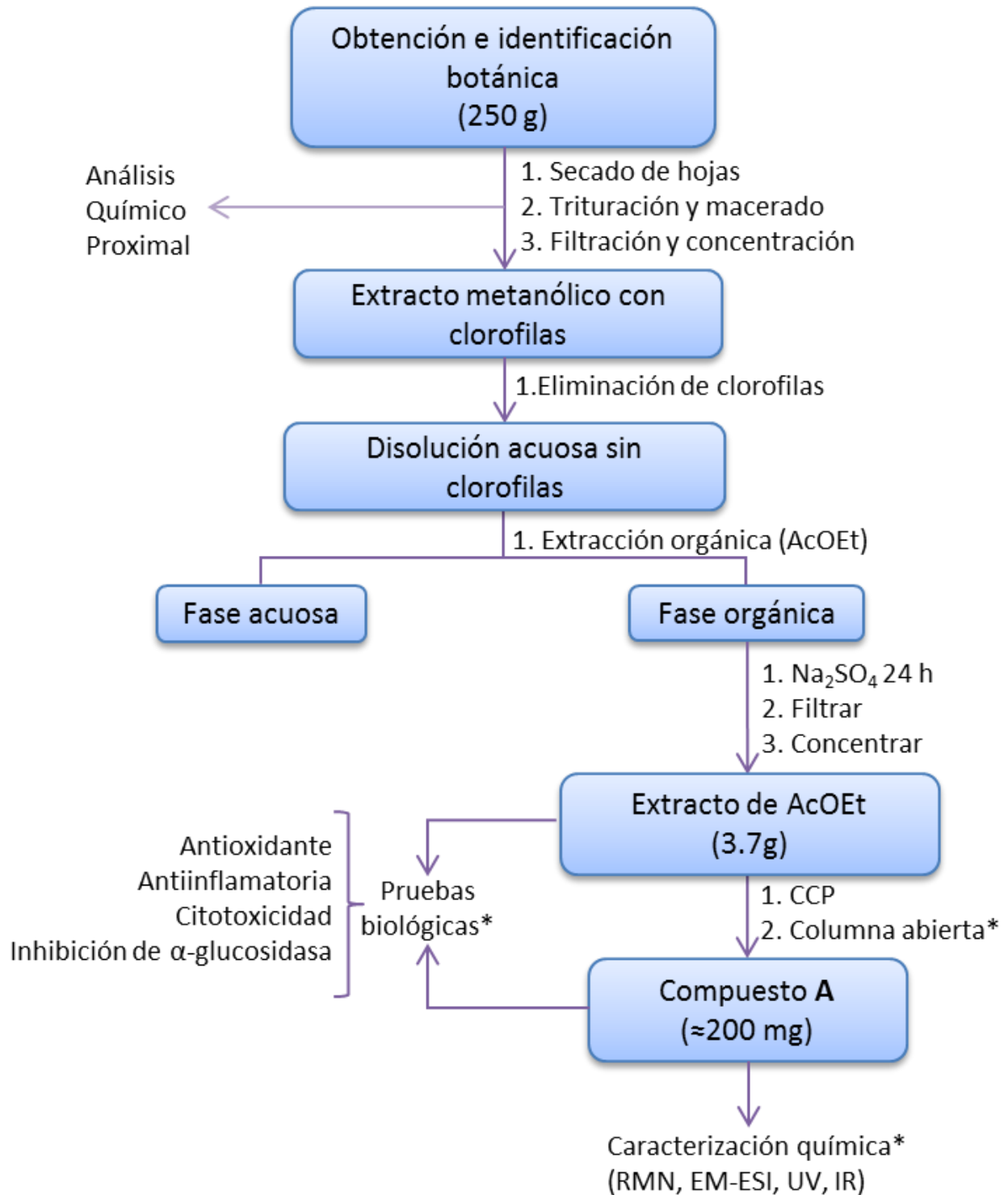
6.2 Objetivos particulares

- Obtener el material vegetal y su identificación botánica
- Obtener el extracto metanólico de las hojas de rábano negro y rábano rojo.
- Eliminar clorofilas del extracto metanólico de las hojas de rábano negro y rábano rojo.
- Realizar una extracción líquido-líquido de la disolución acuosa del extracto metanólico de ambos rábanos con acetato de etilo.

- Separar y purificar compuestos del extracto de acetato de etilo de ambos rábanos mediante cromatografía en placa de capa preparativa.
- Aislar por cromatografía en columna abierta al compuesto mayoritario del extracto de acetato de etilo del rábano negro.
- Caracterizar al compuesto aislado mediante el uso de diferentes técnicas espectroscópicas; resonancia magnética nuclear, infrarrojo, UV-visible, y polarimetría del extracto de acetato de etilo del rábano negro.
- Determinar la capacidad antioxidante, citotóxica, antiinflamatoria y antidiabética del extracto de acetato de etilo del rábano negro y el compuesto aislado.
- Establecer la presencia del compuesto aislado bioactivo en el extracto del rábano negro en el extracto de acetato de etilo de los residuos del rábano rojo utilizando CCF y HPLC.
- Realizar análisis químico proximal a las hojas de rábano negro y del rojo.

7. METODOLOGÍA

7.1 Esquema general de trabajo



*Realizados a partir de los residuos del rábano negro.

7.2 Obtención del material vegetal

Las hojas de rábano negro se adquirieron en el Mercado de Sonora ubicado en la delegación Venustiano Carranza en la Ciudad de México, en un puesto ambulante dedicado a la venta de plantas medicinales cuyo distribuidor del rábano negro proviene de Puebla.

Las hojas del rábano rojo se obtuvieron en un mercado ambulante ubicado en la delegación Tlalpan en la Ciudad de México.

7.3 Identificación botánica del material vegetal

Se realizó la identificación únicamente del rábano negro en el Instituto de Biología de la U.N.A.M, para ello se preparó el material vegetal realizándole cortes transversales de aproximadamente 1 cm, dejando una fracción de raíz y hojas unido. Posteriormente se prensó y se dejó secar a temperatura ambiente durante 3 días, una vez seco y prensado fue determinado por el especialista correspondiente.

7.4 Preparación del extracto de acetato de etilo

Los disolventes orgánicos empleados: hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol, fueron destilados antes de su uso.

7.4.1 Secado y macerado

El material vegetal se secó a temperatura ambiente aproximadamente 1 semana. Una vez seco, se cortó en fracciones pequeñas macerándolo en metanol entre 24 a 48 h a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de macerado se filtraron las hojas del extracto metanólico por gravedad a través de un embudo con un tapón de algodón desengrasado, posteriormente se concentró el filtrado en rotavapor (Marca Büchi, modelo R-114) a 40 °C y a una presión de 280 mbar.

7.4.2 Eliminación de clorofilas

El extracto metanólico obtenido presentó clorofilas por lo que se sometió a un tratamiento para la eliminación de estas. Para ello al extracto previamente concentrado se le añadió agua destilada y dejó reposar durante 24 h. Posteriormente se filtró al vacío en un embudo Büchner; el cual se colocó un papel filtro en la base y después una cama de celita.

7.4.3 Extracción con disolvente orgánico (Acetato de etilo)

Después de la filtración, se realizó una extracción líquido-líquido a la disolución acuosa obtenida utilizando acetato de etilo en proporciones iguales. Se realizaron dos extracciones más con acetato de etilo. La fase acuosa se concentró utilizando ventilación a temperatura ambiente.

A la fase orgánica se le añadió sulfato de sodio anhidro dejándose reposar por 24 h, transcurrido el tiempo se filtró para separar la sal y posteriormente se concentró en rotavapor a 40°C y a una presión de 180 mbar obteniendo el extracto de acetato de etilo.

7.5 Análisis previo al extracto de acetato de etilo

7.5.1 Cromatografía en capa fina

Al extracto de acetato de etilo se le realizó una cromatografía en capa fina. Para ello se utilizaron placas de aluminio de 20 x 20 cm, recubiertas con gel de sílice 60 (ALUGRAM® SIL G/UV254 MACHEREY-NAGEL) de 0.20 mm de espesor. La placa se preparó tomando una pequeña cantidad del extracto disuelto en metanol, aplicándose a 1 cm del borde inferior de la cromatoplaca con un capilar, colocándose en una cámara de elución con un sistema móvil de acetato de etilo : metanol (85:15), una vez el frente eluyente alcanzó 0.5 cm del borde superior de la placa, se retiró y dejó secar. Posteriormente se observó en la cámara de luz ultravioleta (UV) (Marca spectroline, Modelo CM-10) a una longitud de onda de 254 nm (corta) y 365 nm (larga). Finalmente se reveló con una disolución al 1% de

ácido-2-etiléster difenil boricoteramino en metanol, observándose a longitud larga en la cámara de UV.

7.6 Aislamiento y purificación del compuesto A

7.6.1 Cromatografía en placa preparativa

Para esta técnica se ocuparon placas de vidrio de 10 x 20 cm, recubiertas de gel sílice 200 (ALUGRAM® SIL G-200/UV254 MACHEREY-NAGEL) de 2.0 mm de espesor.

Se utilizaron aproximadamente 200 mg de extracto de acetato de etilo, el cual se disolvió en 1.5 mL de metanol aplicando a lo largo de la placa con ayuda de un capilar. La placa se introdujo en una cámara de elución con un sistema móvil de diclorometano : metanol : acetato de etilo (70:20:10), una vez que se dejó eluir la placa se retiró de la cámara y dejó secar. Posteriormente se reveló una pequeña fracción con revelador de flavonoides, se observó a una longitud de onda larga.

Cada fracción observada fue separada y colocada en un matraz erlenmeyer con 75 mL de acetato de etilo y 25 mL de metanol, eliminando la gel de sílice filtrando por gravedad a través de un embudo con un papel filtro, se concentró el filtrado en rotavapor a 40 °C y a una presión de 220 mbar.

7.6.2 Cromatografía en columna abierta

A continuación se describe el procedimiento de separación por cromatografía en columna abierta, para ello se pesaron 150 g de gel de sílice (SiO₂, malla 230-400) y se mezcló con 500 mL de una disolución de acetato de etilo y hexano (50:50); fase móvil, se vertió la mezcla en una columna de vidrio vertical con disco poroso (D=4.1 cm, h=70 cm), procurando que la fase estacionaria (SiO₂) quedara de manera uniforme y compacta, evitando los espacios vacíos a lo largo de la columna dejando eluir la fase móvil durante 5 min.

Una vez que la columna quedó correctamente empacada, se procedió a colocar la muestra, para esto se disolvió 5 g del extracto de acetato de etilo con el mínimo

volumen de disolvente para posteriormente mezclar con 5 g de gel de sílice hasta obtener un polvo café, eliminando el disolvente al vacío para después verter dentro de la columna. Se colectaron un total de 650 fracciones de 125 mL cada una, utilizando un gradiente de polaridad creciente iniciando con AcOEt : Hexano 50 : 50 hasta AcOEt : MeOH 50:50.

Cada fracción se concentró en rotavapor (190 mbar a 40 °C) y se monitoreó mediante una cromatografía en capa fina utilizando un sistema de elución acetato de etilo : metanol (85:15) observándose a una longitud corta en la cámara de UV.

Una vez obtenidas las fracciones, mediante cromatografía en placa fina se seleccionaron aquéllas que contenían el mismo compuesto para su cristalización. Para ello se disolvió cada fracción en metanol y se juntaron en un matraz Erlenmeyer, después se concentró el disolvente en un baño de agua y se indujo la cristalización enfriando en baño de hielo. Al observar la formación de un sólido se procedió a separarlo de las aguas madres al vacío utilizando un embudo Hirsch. Al sólido obtenido se le realizaron extracciones con diferentes disolventes; insolubles al compuesto, como diclorometano, acetato de etilo y agua. Finalmente se dejó secar el sólido al vacío y temperatura ambiente.

7.7 Caracterización química del compuesto A

El compuesto aislado fue caracterizado con los siguientes equipos y métodos espectroscópicos y espectrométricos:

- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C) y los experimentos de dos dimensiones: COSY, HMBC, HSQC. Se utilizó el equipo Bruker-Avance 700 MHz utilizando como disolvente Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆).
- Espectroscopia infrarroja (IR), se realizó en un espectrofotómetro FT-IR Brucker Tensor 27 en pastilla en celdas de Bromuro de potasio (KBr)

- Espectrometría UV-visible, se determinó en un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu, U160.
- Espectrometría de masas mediante ionización electrospray, se realizó por medio del cromatógrafo de líquidos marca Agilent Modelo 1200 acoplado a un espectrómetro de masas marca Bruker Esquire 6000 con electrospray y trampa de iones.
- Polarimetría, se determinó en un Polarímetro Perkin Elmer 343 utilizando luz de sodio a 589 nm.

7.8 Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas se realizaron en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la U.N.A.M. Las pruebas se le realizaron al extracto de acetato de etilo obtenido de los residuos del rábano negro y al compuesto **A**.

7.8.1 Actividad citotóxica

Los ensayos de citotoxicidad se evaluaron en las líneas celulares cancerosas de humano siguientes: glía de sistema nervioso central (U251), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HCT-15), mama (MCF-7), pulmón (SKLU), cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales Humanos sanos (FGH) evaluando el extracto de acetato de etilo y el compuesto **A** a una concentración de 50 µg/mL. Se utilizó como control mitoxantrona.

7.8.2 Actividad antioxidante

Las pruebas que se aplicaron para medir actividad antioxidante fueron las siguientes: cuantificación de la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e inhibición de la peroxidación de lípidos inducida con FeSO₄ en homogeneizado de cerebro de rata. Para estos ensayos se evaluó el extracto de acetato de etilo y compuesto **A** utilizando concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL y como control al BHT.

7.8.3 Actividad antiinflamatoria

La prueba de actividad antiinflamatoria efectuada fue: edema en oreja de ratón inducido con la aplicación tópica de 13-acetato de 12-O-Tetradecanoil-forbol (TPA) aplicando una dosis de 1µg/oreja de extracto de acetato de etilo y compuesto **A**. Utilizando como control celecoxilo.

7.8.4 Actividad antidiabética

Se realizó la prueba de inhibición de la enzima alfa-glucosidasa de levadura y de intestino de rata al extracto de acetato de etilo y compuesto **A** utilizando concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL y como control positivo ascarbosa.

7.9 Estudio del extracto de acetato de etilo mediante CCF y HPLC de las hojas del rábano rojo

Las hojas de rábano negro al no ser una fuente viable por su difícil adquisición debido a su poco uso y su presentación de venta. Se decidió realizar un estudio al extracto de acetato de etilo de las hojas del rábano rojo mediante CCF y HPLC con la finalidad de determinar la presencia del compuesto **A** y proponerlo como segunda fuente de dicho compuesto.

La CCF se realizó como se describe en el apartado 7.5.1 aplicando las mismas condiciones y revelador, en la Tabla 4 se muestran las condiciones utilizadas para el estudio de HPLC:

Cromatógrafo de líquidos:	Marca Agilent 1200 Series Binary SL		
Columna:	Synergi 4 μ m MAX-RP 80Å 150 x 2.0 mm		
Detector:	UV-Vis Arreglo de Diodos Waters 2996 λ =254nm		
Eluyente:	Acetonitrilo	Agua	
	Inicial	20	80
	30 min.	100	0
Flujo:	0.2 mL/min		

Tabla 4. Condiciones cromatográficas empleadas en HPLC.

7.10 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de las hojas del rábano negro y rábano rojo se realizaron en el laboratorio 322 del Conjunto E del departamento de alimentos y biotecnología de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Obtención e identificación botánica del material vegetal

Las hojas del rábano negro se obtuvieron en el mercado de Sonora, apartando un ejemplar completo para su identificación. Los residuos de rábano rojo se consiguieron en un mercado ambulante.



Figura 9. Rábano negro y rábano rojo (raíz con tallo y hojas).

La identificación botánica del rábano negro fue realizada por el M. en C. Rafael Torres Colín en el Instituto de Biología de la U.N.A.M. resguardándose el ejemplar en el Herbario Nacional de México con el número de folio 144896. Asegurando que se trabajó con la variedad seleccionada (Figura 10).

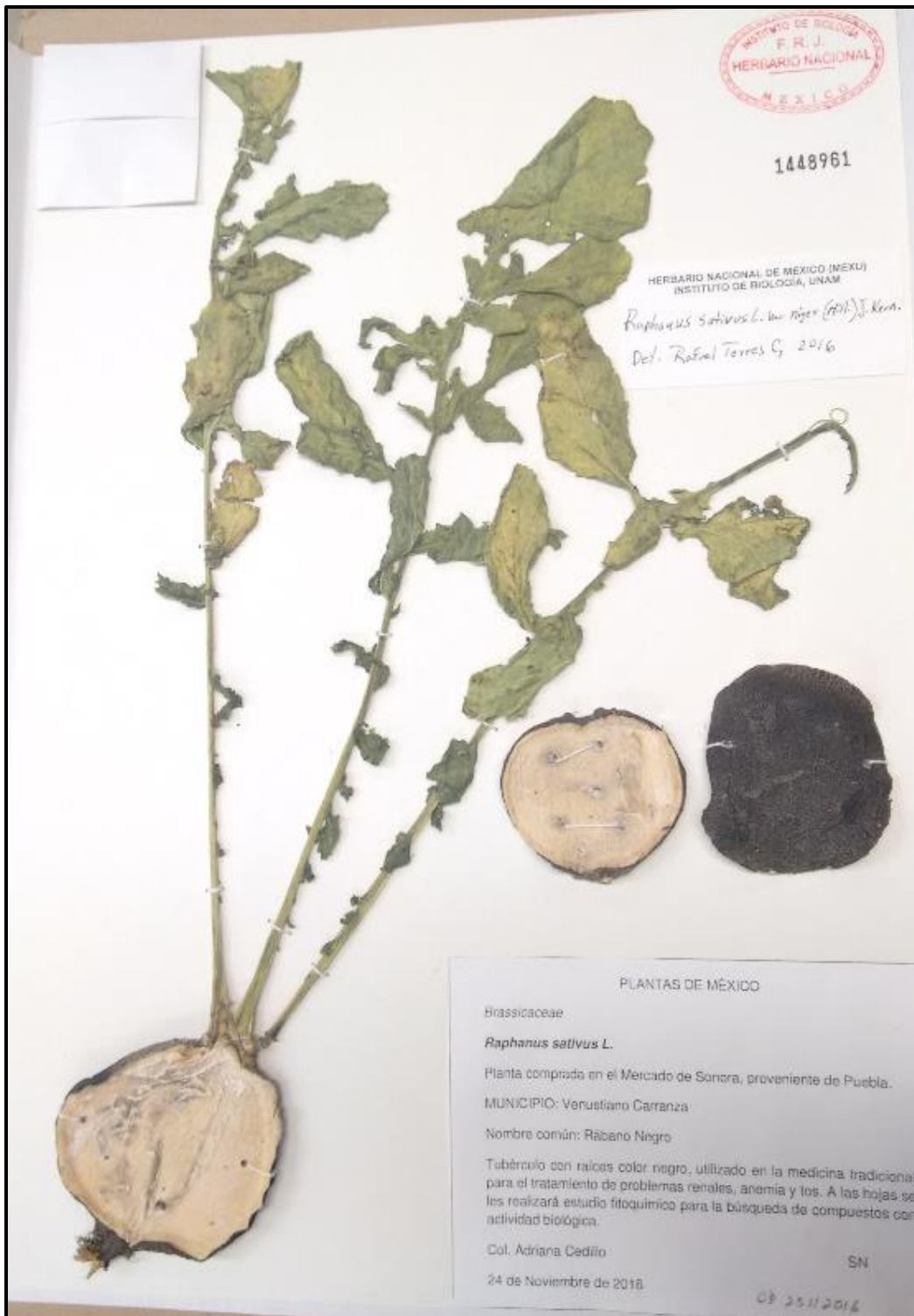


Figura 10. Ejemplar resguardado en el Herbario Nacional de México.

8.2 Preparación de extracto de acetato de etilo

En la Figura 11a se muestra el extracto obtenido después de 48 horas de macerado en metanol, se observa un líquido color verde intenso debido a la presencia de clorofilas, al filtrar el extracto a través de celita se logró la eliminación de estas obteniendo una disolución acuosa (Figura 11b).

Una vez realizada la extracción líquido-líquido con acetato de etilo a la disolución acuosa sin clorofilas, la fracción orgánica se concentró obteniendo un sólido color café fuerte denominado extracto de acetato de etilo (Figura 11c).

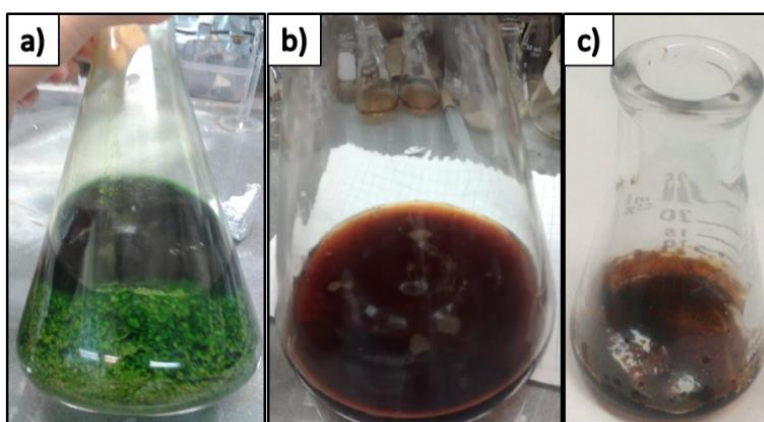


Figura 11. a) Extracto metanólico b) Disolución acuosa sin clorofilas
c) Extracto de acetato de etilo

8.3 Análisis previo al extracto de acetato de etilo

8.3.1 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina del extracto de acetato de etilo a una longitud de onda de 254 nm se aprecian una serie de compuestos con mayor intensidad en la parte inferior de la placa, más polares. Después de aplicar el revelador de flavonoides y visualizar a una longitud de onda de 365 nm, fluorescieron distintas manchas (azul, verde y naranja), evidenciando probable presencia de flavonoides (Figura 12).

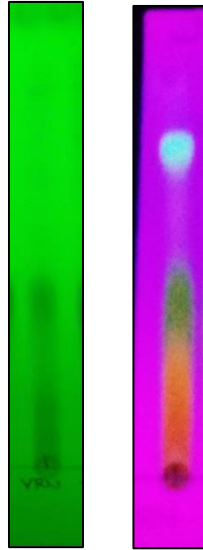


Figura 12. Cromatografía en capa fina del extracto acetato de etilo de rábano negro. (Izq. $\lambda=254$ nm y dcha. $\lambda=365$ nm con revelador de flavonoides).

8.4 Aislamiento y purificación del compuesto A

8.4.1 Cromatografía en placa preparativa

En la placa preparativa se marcaron 5 fracciones de interés como se muestra en la Figura 13 de las cuales se observó un precipitado en la fracción 3.

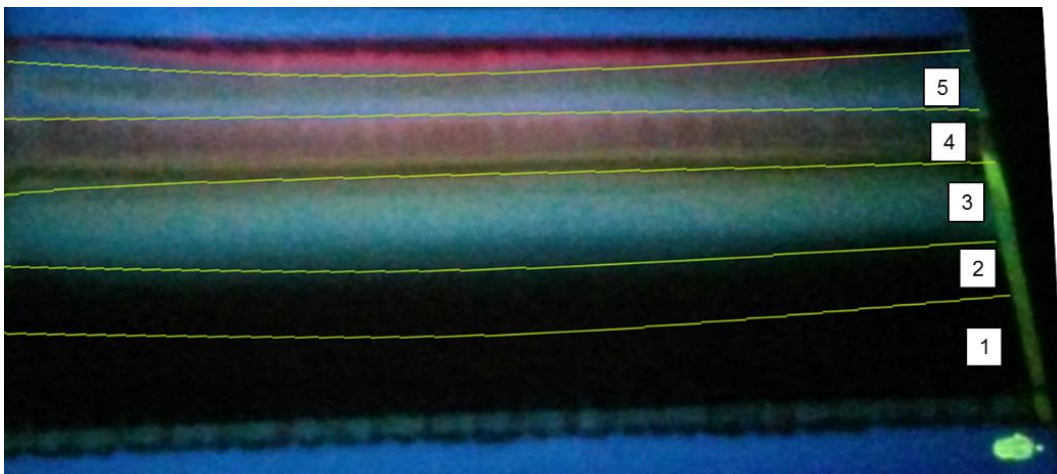


Figura 13. Fracciones seleccionadas en placa preparativa.

8.4.2 Cromatografía en columna abierta

Mediante la técnica de cromatografía en columna abierta se obtuvieron 650 fracciones de las cuales en un sistema de elución de acetato de etilo : hexano (83:17) se observó un precipitado de interés, las cuales se seleccionaron para su purificación.

Fracción	Sistema de Elución	Fracción	Sistema de Elución
1-41	50:50 ^a	292-301	81:19 ^a
42-51	55:45 ^a	302-481	83:17 ^a
52-121	56:44 ^a	482-521	84:16 ^a
122-151	57:43 ^a	522-551	85:15 ^a
152-171	58:42 ^a	552-561	87:13 ^a
172-191	59:41 ^a	562-571	89:11 ^a
192-211	60:40 ^a	572-581	95:5 ^a
212-231	61:39 ^a	582-591	97:3 ^a
232-241	63:37 ^a	592-610	99:1 ^a
242-251	65:35 ^a	611-620	100 ^b
252-261	70:30 ^a	621-630	90:10 ^c
262-271	75:25 ^a	631-640	80:20 ^c
272-281	77:23 ^a	641-650	50:50 ^c
282-291	79:21 ^a		

^a: AcOEt: Hex, ^b: AcOEt, ^c: AcOEt:MeOH

Tabla 5. Fracciones obtenidas en columna abierta.

En ambas técnicas de separación aplicadas al extracto de acetato de etilo; cromatografía en placa preparativa y cromatografía en columna abierta, se obtuvo un sólido amorfo de color amarillo pálido o claro (Figura 14) con un punto de fusión de 185-187 °C y una rotación óptica $[\alpha]_D = -210.78^\circ$ que denominamos compuesto **A**.



Figura 14. Compuesto **A**.

La cromatografía en capa fina del compuesto **A** revelado con una solución de ácido-2-etiléster difenil bórico-teramino se observa una mancha fluorescente color verde brillante a una longitud de 365 nm siendo característico de los compuestos tipo flavonoide con un R.f. de 0.43 (Figura 15).

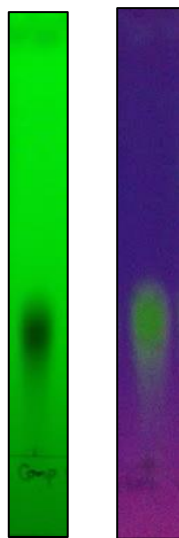


Figura 15. Cromatografía en capa fina del compuesto **A**. (Izq. $\lambda=254$ nm y dcha. $\lambda=365$ nm con revelador de flavonoides).

8.5 Caracterización del compuesto **A**

El compuesto **A** se caracterizó mediante diversas técnicas espectroscópicas (IR, UV-vis y RMN uni y bidimensional) y HPLC-EM (ESI).

8.5.1 Espectroscopía UV-Vis

En el espectro de UV-visible del compuesto **A** (Figura 16) se observan dos máximos de absorción, la banda II a una longitud de onda a 265.5 nm originada por el sistema benzoilo del anillo A y la banda I en 344.5 nm producida por el sistema cinamoilo del anillo B. La literatura establece que los compuestos del tipo flavonoide presentan dos máximos de absorción y aquellos pertenecientes al grupo de los flavonoles los presentan entre 240 a 280 nm para la banda II y 350-385 nm para la banda I.³²

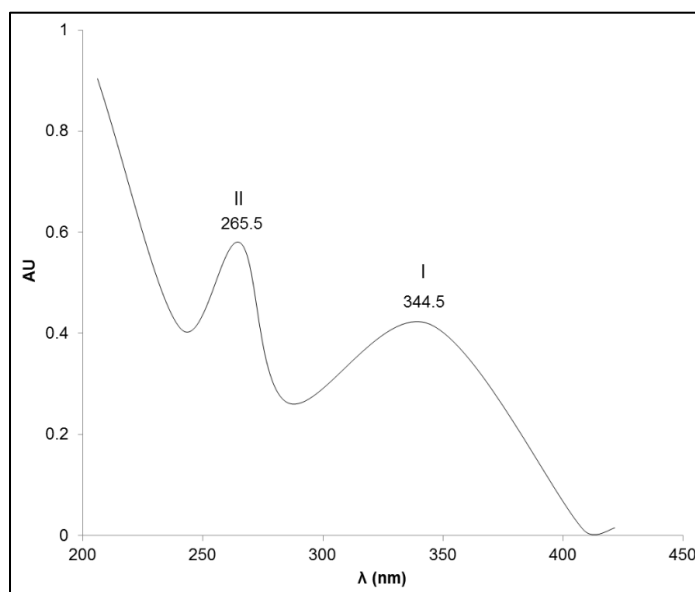


Figura 16. Espectro de absorción del compuesto **A**.

8.5.2 Espectroscopía infrarroja (Anexos. Espectro 1)

En el espectro de infrarrojo del compuesto **A** se presencian diversas bandas de absorción; de las cuales, se observa una banda ancha a una frecuencia de 3280 cm^{-1} característica del estiramiento del enlace entre el oxígeno y el hidrógeno del grupo hidroxilo, se presente otra banda de absorción en 1654.72 cm^{-1} correspondiente a la vibración del grupo carbonilo del anillo C y en 1087.30 cm^{-1} el estiramiento del enlace C-O del glucósido. También se observan dos bandas en 1596.72 y 1490.40 cm^{-1} para la insaturación C=C de los anillos aromáticos.

8.5.3 Espectrometría de masas

En el espectro de masas obtenido por la técnica ESI en modo positivo (Figura 17) se observa un pico de gran intensidad correspondiente al ion $[M+H]^+$ a m/z 579.3 (100%) del cual se puede deducir una masa molecular de 578.3 g/mol coincidiendo con la fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{14}$.

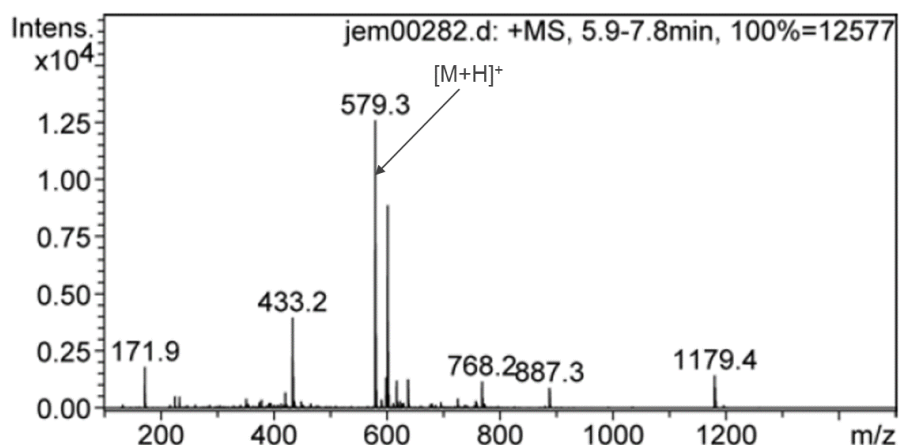


Figura 17. Espectrómetro de masas (ESI) del compuesto A.

8.5.4 Resonancia magnética nuclear

- Resonancia magnética nuclear de protón. (Anexos. Espectro 2)

1H -RMN (DMSO- d_6 , 700MHz): δ 7.78ppm (2H, d, $J= 8.7$ Hz, H-2' y H-6'), 6.91ppm (2H, d, $J= 8.7$ Hz, H-3' y H-5'), 6.78ppm (1H, d, $J= 2.3$ Hz, H-8), 6.45ppm (1H, d, $J= 2.5$ Hz, H-6), 5.28ppm (1H, s, H-1''), 0.8ppm (3H, d, $J= 5.7$ Hz, H-6''), 5.54 ppm (1H, s, H-1''') y 1.12ppm (3H, d, $J= 6.2$ Hz, H-6''').

En el espectro 1H -RMN se observan dos singuletes a un desplazamiento químico (δ) de 5.28 y 5.54 ppm correspondiendo a los protones unidos a los carbonos anoméricos C-1'' y C-1''' respectivamente. A campo alto se observan dos señales dobles en δ 0.8 y 1.12 ppm correspondientes a los protones de los metilos C-6'' y C-6''' del glicósido. También se aprecian un doblete que integran para un proton en δ 6.45 ppm para C-6 y otro doblete en δ 6.78 ppm para C-8 que corresponden al sistema benzoilo (anillo A). En δ 7.78 y 6.91 ppm, se observan dos señales

dobles para los protones de C-2'/C-6' y C-3'/C-5' del sistema cinamoilo (anillo B) respectivamente.

- Resonancia magnética nuclear de carbono. (Anexos. Espectro 3)

^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 700MHz): δ 157.99ppm (C-2), δ 134.67ppm (C-3), δ 178.07ppm (C-4), δ 161.06ppm (C-5) δ 99.62ppm (C-6), δ 161.83ppm (C-7), δ 94.77ppm (C-8), δ 156.25ppm (C-9), δ 105.94ppm (C-10), δ 120.46ppm (C-1'), δ 130.88ppm (C-2' y C-6'), δ 115.6ppm (C-3' y C-5'), δ 160.34ppm (C-4'), δ 102ppm (C-1''), δ 70.35ppm (C-2''), δ 70.83ppm (C-3''), δ 71.74ppm (C-4''), δ 70.21ppm (C-5''), δ 17.6ppm (C-6''), δ 98.53ppm (C-1'''), δ 70.23ppm (C-2'''), δ 70.46ppm (C-3'''), δ 71.24ppm (C-4'''), δ 69.94ppm (C-5''') y δ 17.6ppm (C-6''').

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan señales para 25 átomos de carbono de las cuales dos pertenecen a metilos, 16 a metinos y 9 a carbonos cuaternarios. A campo alto se observan señales a δ 18.05 y 17.6 ppm correspondientes a los carbonos de los grupo metilo (C-6''' y C-6''), a δ 98.53 y 102 ppm para los carbonos anoméricos (C-1''' y C-1'') y entre los valores δ 69.94 y 71.74 las señales de los metinos del glicósido. Para el sistema cinamoilo (anillo B) se observan 6 señales entre δ 115.6 y 157.99. Los metinos del sistema benzoilo (anillo A) aparecen a δ 99.62 y 94.77 ppm, mientras que los carbonos cuaternarios se aprecian entre δ 134.67 y 164.83 ppm. Finalmente se observa la señal del grupo carbonilo del anillo C a δ 178.07 ppm.

Los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC nos permitieron corroborar la conectividad de los sustituyentes en la molécula mediante la correlación carbono-hidrógeno e hidrógeno-hidrogeno. En las Figuras 18 y 19 podemos ver las correlaciones de cada experimento bidimensional antes mencionados.

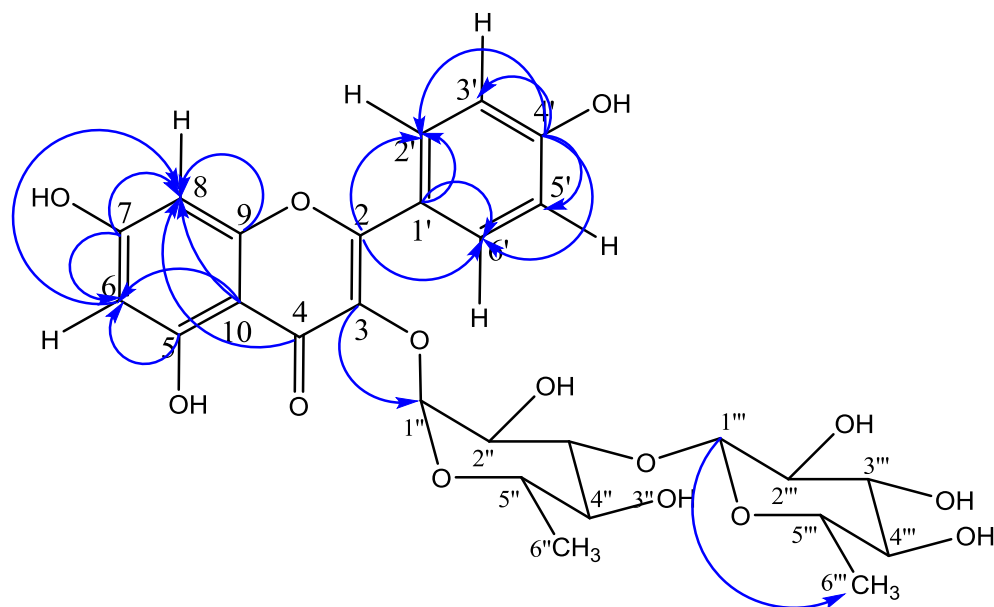


Figura 18. Correlaciones observadas en el espectro HMBC.

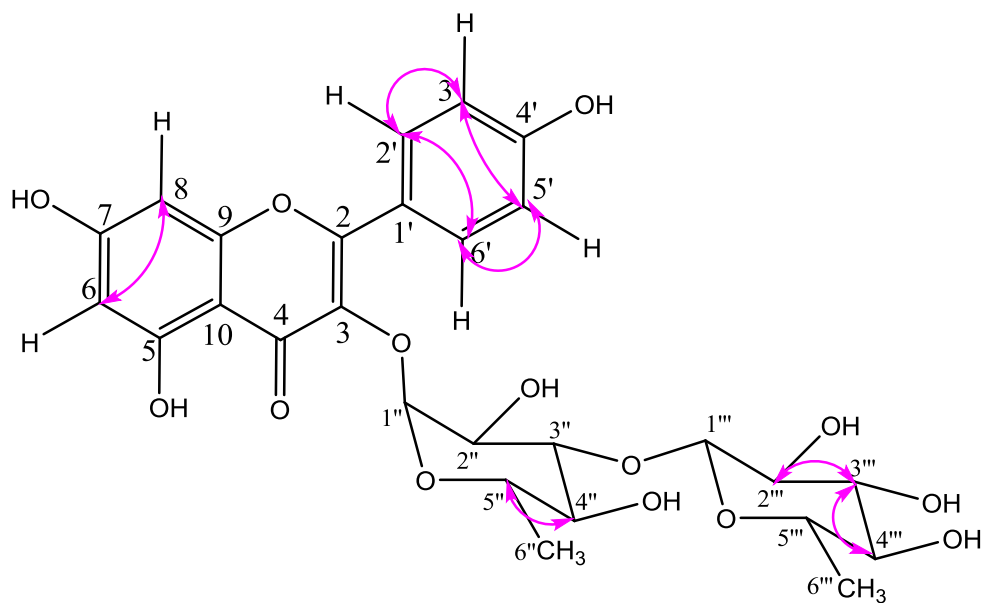


Figura 19. Correlaciones observadas en el espectro COSY.

El análisis de resonancia magnética nuclear uni y bidimensional nos permitió establecer una estructura al compuesto **A** (Figura 20).

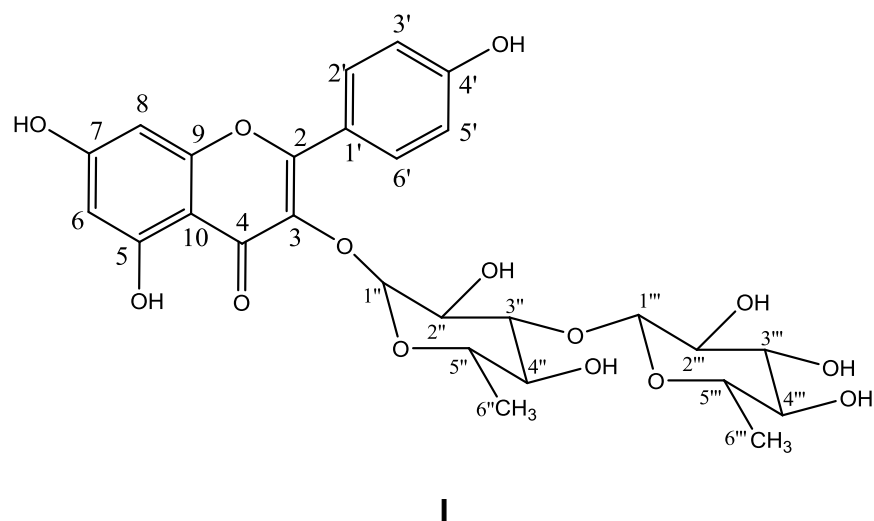


Figura 20. Estructura establecida para el compuesto **A**.

En la Tabla 6 se muestra el resumen de los datos obtenidos de los experimentos de resonancia magnética nuclear (uni y bidimensional).

Se realizó una búsqueda en la literatura y se encontró que la estructura propuesta como **A**, corresponde a la de un compuesto de tipo flavonoide denominado **Garcintina** que fue descrito por primera vez por M. Shiq Ali, et all, (2000)⁶⁵ lo aislaron de *Lotus garcinii* (Fabácea) como una espuma, con los datos adicionales que se indican en esta tesis se confirmó que el compuesto **A** tiene una fórmula del tipo de la Garcintina, aún no ha sido posible obtener una muestra original de la Garcintina, se continua con la confirmación de la estructura del compuesto **A**.

Posición	C	H, mult (J en Hz)	HMBC
	δ (ppm)		
2	157.99		H-2', H-6'
3	134.67		H-1''
4	178.07		H-8
5	161.06		H-6
6	99.62	6.45, d (2.52)	H-8
7	161.83		H-8, H-6
8	94.77	6.78, d(2.34)	H-6
9	156.25		H-8
10	105.94		H-8, H-6
1'	120.46		H-3', H-5'
2',6'	130.88	7.78, d (8.60)	H-2', H-6'
3',5'	115.6	6.91, d (8.71)	H-3', H-5'
4'	160.34		H-2', H-6', H-3', H-5'
1''	102	5.29, s	
2''	70.35	3.63, td (8.58,3.79)	
3''	70.83		
4''	71.74	3.3, td (9.36, 4.34)	
5''	70.21	3.84, s	
6''	17.6	0.8, d (5.65)	
1'''	98.53	5.54, s	
2'''	70.23	3.98, s	
3'''	70.46		
4'''	71.24		
5'''	69.94	3.98, d (3.97)	
6'''	18.05	1.12, d (3.97)	

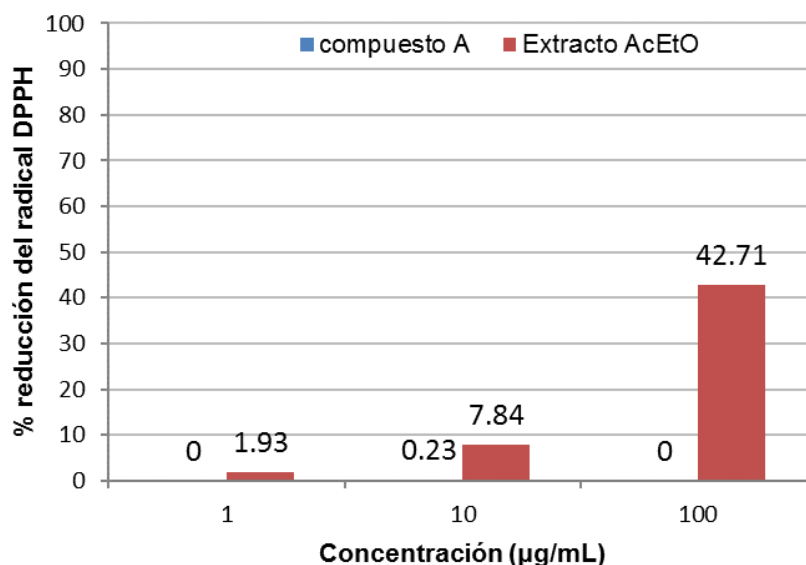
Tabla 6. Datos obtenidos en los espectros de RMN para la compuesto **A**.

8.6 Pruebas biológicas

8.6.1 Actividad antioxidante

- Ensayo de actividad atrapadora sobre el radical 2,2-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•)

En la Gráfica 4 se muestra el porcentaje de reducción del radical DPPH• a tres concentraciones diferentes del extracto de acetato de etilo y el compuesto **A**. El extracto de acetato de etilo a una concentración de 100 µg/mL presentó un porcentaje de reducción del radical del 42.71% mientras que el compuesto **A** no presentó actividad. De acuerdo con los resultados obtenidos se deduce que la capacidad de capturar el radical DPPH• no se debe al compuesto aislado sino a otros compuestos posiblemente de naturaleza fenólica presentes en el extracto.



Gráfica 4. Porcentaje de reducción del radica DPPH•.

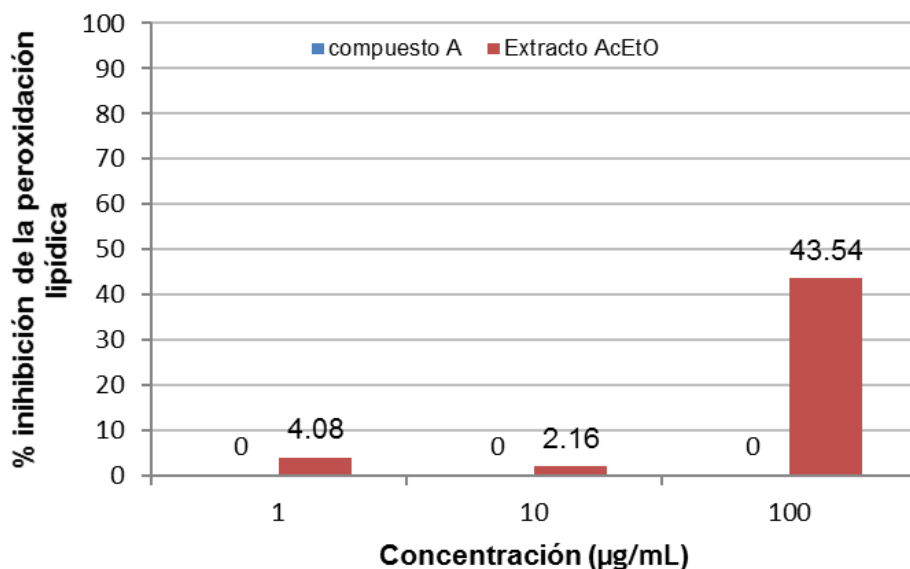
La acción antioxidante se debe en gran parte a que el grupo funcional fenol del flavonoide es capaz de capturar los radicales libres para formar moléculas más estables; radicales menos reactivos.

La nula actividad del compuesto **A** se debe a la presencia de dos glicósidos unidos al carbono 3 del anillo C, teniendo como único donador de protón al grupo hidroxilo del carbono 4' del anillo B.⁵³

- Ensayo de inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata en términos de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

La peroxidación de lípidos; relacionada con el estrés oxidativo, son una serie de reacciones de oxidación en cadena donde las especies reactivas del oxígeno reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular provocando el deterioro de la célula hasta su destrucción, vinculado con problemas en el sistema nervioso central.

En el Gráfico 5 se observa que el extracto de acetato de etilo a una concentración de 100 µg/mL inhibe el 43.54% de la peroxidación lipídica, en cambio el compuesto **A** no tiene ningún efecto inhibitorio. Por lo que otros compuestos que constituyen al extracto de acetato de etilo son los responsables de la inhibición de la peroxidación lipídica.

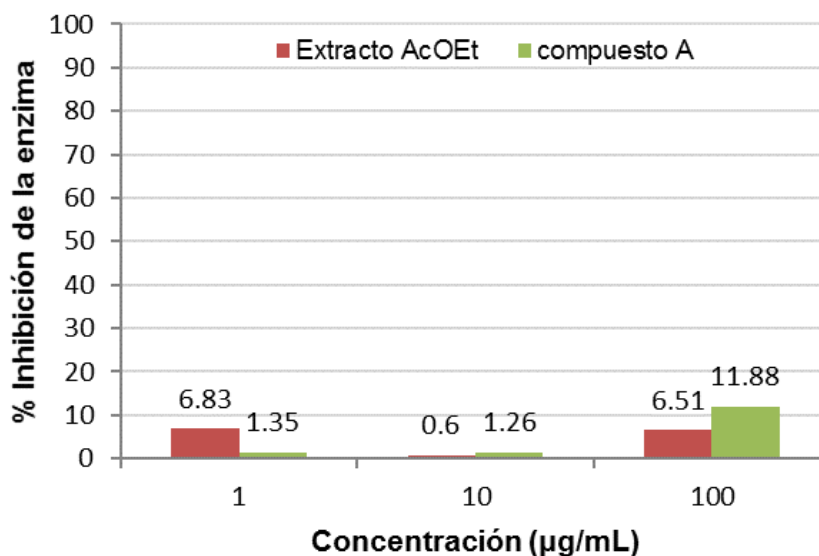


Gráfica 5. Efecto de inhibición de la peroxidación lipídica del extracto de acetato de etilo y el compuesto **A**

Los flavonoides además de su eficacia para capturar radicales libres también se distinguen por su capacidad de inhibir determinadas enzimas como: xantina oxidasa, lipoxigenasas, ciclooxigenasas, entre otras, las cuales se vinculan con la formación de especies reactivas del oxígeno.^{51, 54}

8.6.2 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa

Los resultados para la capacidad de inhibir a la enzima α -glucosidasa del extracto de acetato de etilo y compuesto **A** se muestran en el Gráfico 6 observándose que ambas muestras tuvieron un porcentaje de inhibición menor al 50% por lo que su capacidad para inhibir la enzima α -glucosidasa es nula. El compuesto **A** a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó 11.88% de actividad mientras que el extracto un 6.51%, deduciéndose que el compuesto aislado contribuye de manera importante en la inhibición de la enzima.



Gráfica 6. Efecto de inhibición de la enzima α -glucosidasa del compuesto **A** y el extracto de acetato de etilo.

El efecto de inhibición de la enzima α -glucosidasa se asocia con la insaturación y grupo carbonilo del anillo C, el grupo hidroxilo del carbono 3, así como, los hidroxilos que conforman al anillo B.⁶⁸

8.6.3 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de edema en oreja de ratón inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)

En la Tabla 7 se muestran los resultados del porcentaje de inhibición del edema para el extracto de acetato de etilo (25.15%) y compuesto **A** (20.72%) a una dosis de 1 mg/mL. El extracto de acetato de etilo presentó mayor inhibición del edema que el compuesto **A**, el cual de acuerdo con los resultados el compuesto **A** contribuye junto con otros compuestos presentes en el extracto con el efecto antiinflamatorio.

Compuesto	Dosis (mg/mL)	% Inhibición del edema
Extracto AcOEt	1	25.15
Compuesto A	1	20.72

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del edema del extracto de acetato de etilo y el compuesto **A**.

El mecanismo antiinflamatorio de los flavonoides se debe a su capacidad de inhibir enzimas involucradas en el proceso inflamatorio y mediadores pro-inflamatorios como las prostaglandinas. Así como su capacidad de suprimir a los fagocitos de los macrófagos.⁵¹

8.6.4 Actividad citotóxica

En la Tabla 8 se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento celular del extracto de acetato de etilo y el compuesto **A**, a una concentración de 50 µg/mL. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto de acetato de etilo no presentó inhibición relevante debido a que no tuvo un porcentaje superior al 50%. En cambio, el compuesto **A** inhibió el crecimiento de modo importante en la línea celular K562 (leucemia) con un 87.4 %.

Línea celular	Compuesto A	Extracto AcEtO
	% Inhibición del crecimiento	
U251 (Tumor cerebral)	6.9	17.5
PC-3 (Próstata)	S/A	17.1
K562 (Leucemia)	87.4	22.0
HCT-15 (Colon)	S/A	S/A
MCF-7 (Mama)	S/A	2.9
SKLU-1 (Pulmón)	S/A	14.9
FGH (Fibroblastos Gingivales Humanos sanos)	S/A	14.7

Tabla 8. Efecto de inhibición del crecimiento en distintas líneas celulares del compuesto **A** y el extracto de acetato de etilo.

La capacidad citotóxica de los flavonoides se basa en la inducción de apoptosis, interferir en enzimas como telomerasa y topoisomerasa involucradas en la expresión genética y la interrupción del ciclo celular; mitosis.⁴⁶

Las pruebas biológicas que se han hecho con el compuesto **A**, en este trabajo aportan conocimiento sobre la actividad biológica de este compuesto y del extracto obtenido. En la literatura no se han descrito resultados acerca de la actividad biológica de la Garcintina.

8.7 Estudio del extracto de acetato de etilo mediante CCF y HPLC de las hojas del rábano rojo

En la Figura 21 se muestran los resultados de la CCF, en donde se observa la presencia del compuesto **A** como una mancha color verde brillante a una longitud de onda larga al asperjar revelador de flavonoides. El compuesto **A**, aparece en los extractos de acetato de etilo del rábano rojo (RR) y rábano negro (RN). Por lo que los residuos de ambas variedades de rábano pueden ser ocupados como fuente del compuesto **A**.

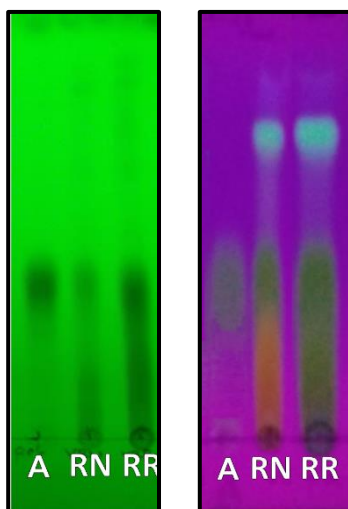


Figura 21. Cromatografía en capa fina. A: compuesto **A**, RN: rábano negro, RR: rábano rojo. (Izq. $\lambda = 254$ nm y dcha. $\lambda = 365$ nm con revelador de flavonoides).

En el Figura 22 se muestra el cromatograma del compuesto **A** donde se observa un pico con un tiempo de retención de 5.638 minutos con un porcentaje de área del 99.22 %. En los extractos de acetato de etilo del rábano negro (Figura 23) y rábano rojo (Figura 24) se observa que ambos extractos presentan un tiempo de retención similar al del compuesto **A**, afirmando con los espectros de UV y EM (Anexo 7). El compuesto **A** (garcintina) es el metabolito mayoritario abarcando un porcentaje de área del 45.83 % para el rábano negro y 53.92 % para el rábano rojo.

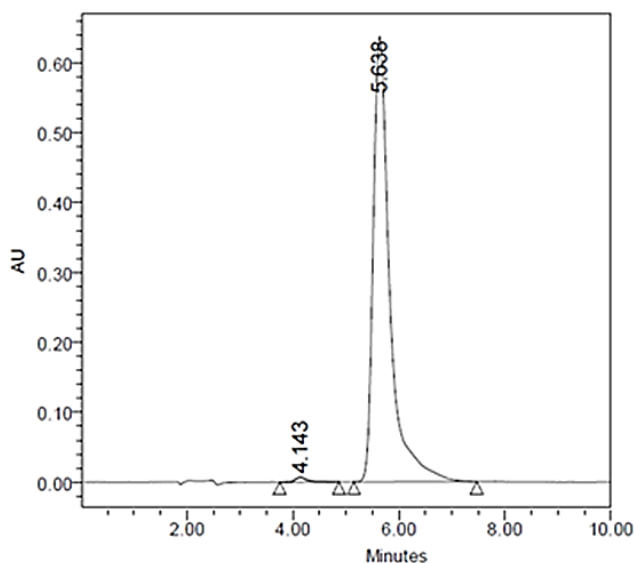


Figura 22. Cromatograma del compuesto **A**.

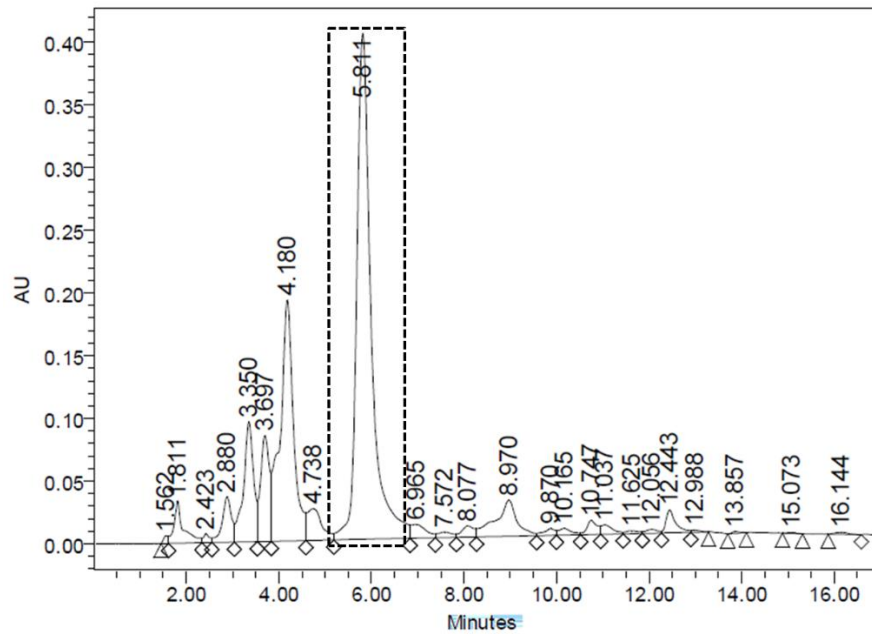


Figura 23. Cromatograma del extracto de acetato de etilo de rábano negro.

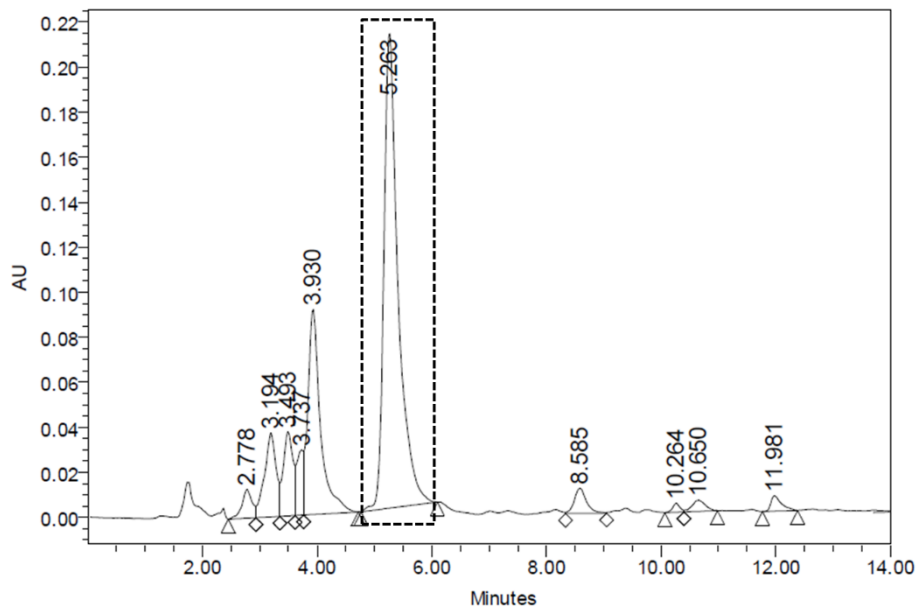


Figura 24. Cromatograma del extracto de acetato de etilo de rábano rojo.

8.8 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de las hojas de ambas variedades de rábano se presenta en la Tabla 9 mostrando el contenido de proteína cruda, lípidos, cenizas, fibra dietética y carbohidratos.

Parámetro	Hojas (g/100 g)		Raíz ^b (g/100 g)
	R. Rojo	R. Negro	R. Rojo
Humedad	87.85	86.88	95.24
Proteína cruda	3.53	2.71	0.57
Lípidos	0.20	0.28	0.07
Cenizas	1.75	2.09	0.77
Fibra dietética	6.31	8.00	0.32
Carbohidratos^a	0.36	0.04	3.03

^a Por diferencia

^b Valor teórico. (Goyeneche *et. al.*,2015)

Tabla 9. A.Q.P de hojas de las dos variedades de rábano.

Los resultados obtenidos son comparables con estudios previos, el artículo *Journal of Functional Food* presenta los siguientes valores para hojas del rábano rojo: 89.50% humedad, 3.81% proteína, 0.37% lípidos, 1.70% cenizas, 0.61% fibra cruda y 4.04% carbohidratos.²⁸

También podemos observar que el contenido de proteína cruda, cenizas y fibra dietética en las hojas de rábano es considerablemente mayor que en la raíz.

Las hojas de rábano negro presentaron mayor cantidad de fibra y cenizas a comparación de los residuos del rábano rojo, presentando mayor cantidad de proteína y carbohidratos.

Los residuos de rábano además ser aprovechadas como fuente de productos naturales también pueden incluirse en la dieta por su alto contenido de fibra.

La fibra aporta diversos beneficios al cuerpo humano como disminuir la absorción de glucosa, lípidos y aminoácidos, prolongar la sensación de saciedad y mejorar los movimientos peristálticos del sistema digestivo.

El compuesto **A** es un *O*-diglicósido del kaempferol el cual se ha aislado previamente de *Lotus garcinii*, actualmente ha sido la única fuente de obtención descrita. En este proyecto de tesis se reporta otra fuente del compuesto **A**, a partir del extracto metanólico de hojas de rábano negro y rábano rojo, siendo el compuesto **A** el metabolito mayoritario, aportando información sobre la composición química de esta planta.

A partir del compuesto **A** es posible obtener el kaempferol mediante una hidrólisis ácida o enzimática. La importancia del kaempferol es su aplicación en la industria farmacéutica; así como en la industria cosmética y alimentaria.

9. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado una metodología reproducible para obtener el compuesto **A**, a partir de las hojas de dos variedades de rábanos.
- Se logró aislar e identificar el metabolito secundario mayoritario, el compuesto **A**, a partir de un extracto de metanólico de hojas del rábano negro. (*Raphanus sativus var. niger*)
- El extracto de acetato de etilo del rábano negro a una concentración de 100 µg/mL logró inhibir el 42.71% del radical DPPH y un 43.54% en la peroxidación lipídica. En cambio, el compuesto **A** no presentó actividad antioxidante. El extracto de acetato de etilo y el compuesto **A** no presentaron inhibición a la enzima α -glucosidasa.
- El extracto de acetato de etilo del rábano negro no presentó inhibición celular a ninguna línea celular, en cambio el compuesto **A** presentó inhibición celular en la línea k562 (leucemia).
- Los extractos de acetato de etilo de los residuos de rábano negro y rábano rojo demostraron contener el compuesto **A** mediante cromatografía en placa fina y HPLC-UV.
- Los residuos del rábano rojo pueden ser empleados como otra fuente del compuesto **A**, cumpliendo con los criterios de selección para el aprovechamiento de residuos.
- Las hojas de rábano rojo y rábano negro demostraron contener mayor cantidad de proteína, cenizas y fibra comparado con la raíz. Por lo que estos residuos pueden ser aprovechados como alimento humano o animal.

- El estudio realizado a las hojas de *Raphanus sativus* Linneo permitió enriquecer su conocimiento acerca de su composición química y nutrimental permitiendo establecer a estos residuos como posible fuente flavonoides y nutrientes.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, K.; Varma, R. Radical scavenging ability and biochemical screening of a common Asian vegetable *Raphanus sativus* L. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2014**, *27* (1), 127–134.
2. Aguilar, G. A. G. Cold and Chilled Storage Technology. *Commer. Storage Fruits, Veg. Flor. Nurs. Stock.* **1997**, *66*, 481–484.
3. Alaoui-Jamali, M. Alternative and complementary therapies for cancer: Integrative approaches and discovery of conventional drugs. *Altern. Complement. Ther. Cancer Integr. Approaches Discov. Conv. Drugs* **2010**, 1–722.
4. Argueta V. A.; Cano A. L. M.; Rodarte M. E. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo III. D.F, México, Instituto Nacional Indígena. **1994**,
5. Baenas N.; Gómez-Jodar I.; Moreno D. A.; García-Viguera C.; Periago P. M. Broccoli and radish sprouts are safe and rich in bioactive phytochemicals. *Postharvest Biol. Technol.* **2017**, *127*, 60–67.
6. Banihani, S. A. Radish (*Raphanus sativus*) and diabetes. *Nutrients* **2017**, *9* (9). 1-9
7. Barillari, J.; Cervellati, R.; Costa, S.; Guerra, M. C.; Speroni, E.; Utan, A.; Iori, R. Antioxidant and choleric properties of *Raphanus sativus* L. sprout (Kaiware Daikon) extract. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (26), 9773–9778.
8. Barillari, J.; Iori, R.; Papi, A.; Orlandi, M.; Bartolini, G.; Gabbanini, S.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L. Kaiware Daikon (*Raphanus sativus* L.) extract: A naturally multipotent chemopreventive agent. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (17), 7823–7830.

9. Batubara, I.; Achmadi, S. S.; Nurwendari, W. Extraction technique to separate kaempferol from soursop (*annona muricata*) leaves. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7* (9), 106–110.
10. CAC/GL 23-1997, revisión 2010. Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables. *Nutr. Declar. Apl. Mbito D E* **2010**, 1–9.
11. Castro-Torres, I. G.; De la O-Arciniega, M.; Gallegos-Estudillo, J.; Naranjo-Rodríguez, E. B.; Domínguez-Ortíz, M. Á. *Raphanus sativus L. var niger* as a source of Phytochemicals for the Prevention of Cholesterol Gallstones. *Phyther. Res.* **2014**, *28* (2), 167–171.
12. Castro-Torres, I. G.; Naranjo-Rodríguez, E. B.; Domínguez-Ortíz, M. Á.; Gallegos-Estudillo, J.; Saavedra-Vélez, M. V. Antilithiasic and hypolipidaemic effects of *Raphanus sativus L. var. niger* on mice fed with a lithogenic diet. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**. 1-8
13. Chabot G. G.; Touil S. Y.; Pham H. M.; Dauzonne D. Flavonoids in cancer prevention and therapy: Chemistry, pharmacology, mechanism of action, and perspectives for cancer drug discovery. *Alternative and complementary therapies for cancer.* **2010**. 583-612.
14. Corona, V. M. Residuos Orgánicos. A limpiar el mundo. **2013**, 1.
15. Creus, E. V. A. G. Compuestos fenólicos. **2004**, *23*, 80–84.
16. Delgado, G., Romo de Vivar, A. Temas selectos de química de productos naturales. Cd. de Mx, México: Instituto de Química.
17. Escudero Álvarez, E.; González Sánchez, P. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* **2006**, *21* (2), 61–72.

18. FAO; COOPI; ACH. Producción de hortalizas. **2011**.
19. FAO; IICA; PRODAR. Productos frescos de verduras. Fichas técnicas. **2014**, 72.
20. Fonnegra G. R; Jiménez R. S. L., Plantas de la medicina aprobadas en Colombia. Medellín, Colombia, Universidad de Antioquia. **2007**, 218-220
21. Ganju Kuldeep, Ganju Eisha. Formulation and Characterization of Kaempferol Nanoparticles. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. **2014**, 04 (34), 59-63.
22. García Estefan A. El cultivo del rábano (*Raphanus sativus L.*) en el Ejido de Santa Anita, Municipio Tlaquepaque. Facultad de agronomía. U.G. **2010**.
23. Garde-Cerdán T.; Gonzalo-Diago A., Kaempferol: biosynthesis, food souces and Therapeutic uses, New York, EU, Nova Publishers. **2016**, 71-100.
24. Gimeno-Creus E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, **2004**, 23 (6), 80-84.
25. González Jiménez F. E. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispánica L.*), mediante electroforesis capilar. Escuela Nacional de ciencias biológicas. I.P.N. **2010**.
26. Gómez Pérez, L. Evaluación del cultivo de rábano (*Raphanus sativus L.*) bajo diferentes condiciones de fertilización orgánica e inorgánica. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53 (9), 1689–1699.
27. Goyeneche, R.; Fanovich, A.; Rodriguez Rodrigues, C.; Nicolao, M. C.; Di Scala, K. Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from radish leaves: Yield,

-
- antioxidant capacity and cytotoxicity. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, 135 (January), 78–83.
28. Goyeneche, R.; Roura, S.; Ponce, A.; Vega-Gálvez, A.; Quispe-Fuentes, I.; Uribe, E.; Di Scala, K. Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus L.*) leaves and roots. *J. Funct. Foods* **2015**, 16, 256–264.
29. Gross K. C.; Wang C. Y.; Saltveit M. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and Nursery stocks. **2016**, 66, 524-526.
30. Gutiérrez, R. M. P.; Perez, R. L. *Raphanus sativus* (Radish): Their Chemistry and Biology. *Sci. World J.* **2004**, 4 (16), 811–837.
31. Hanlon, P. R.; Barnes, D. M. Phytochemical Composition and Biological Activity of 8 Varieties of Radish (*Raphanus sativus L.*) Sprouts and Mature Taproots. *J. Food Sci.* **2011**, 76 (1), 185–192.
32. Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. (Eds.), (1975), The flavonoids. Texas, U.S.A. Springer Science.
33. Hernández-Cázares, A. S.; Real-Luna, N.; Delgado-Blancas, M. I.; Bautista-Hernández, L.; Velasco-Velasco, J. Residuos agroindustriales con potencial de compostaje. *Agroproductividad* **2016**, 9 (8), 10–17.
34. Hollman, P. C. H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharm. Biol.* **2004**, 42, 74–83.
35. Hoornweg, D.; Bhada-tata, P. What a waste: A global review of solid waste management. *Urban Dev. Ser. Knowl. Pap.* **2012**, 9.

-
36. Hossen, M. J.; Uddin, M. B.; Ahmed, S. S. U.; Yu, Z.-L.; Cho, J. Y. *Kaempferol: Review on natural sources and bioavailability*; **2016**.
37. INECC; SEMARNAT. Diagnóstico básico para la gestión integral de los residuos. **2012**, 201.
38. INEGI. (2018). Medio ambiente, asentamientos y actividades humanas, residuos. Recuperado de:
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=21385>
39. INEGI. Cultivos Perennes de México. VII Censo Agropecuario. **1998**, No. B C, 392.
40. Janjua, S.; Shahid, M. Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of root peel extract of *Raphanus sativus L. var niger*. **2013**, 1 (January), 1–7.
41. Juambellz, R. L. El impacto de los desechos sólidos sobre el medio. *Ciencias*. **1990**. 20. 37–41.
42. Jun, S. P.; Ho, S. R.; Duck, H. K.; Ih, S. C. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (8), 2951–2956.
43. Kitinoja, L. Innovative Approaches to Food Loss and Waste Issues. *Front. Issues Br.* **2016**.
44. Kuldeep, G. Formulation and Characterization of Kaempferol Nanoparticles. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* **2014**, 4 (34), 59–63.
45. Laiz-Saldaña, R., Tovar-Miranda, Durán-de-Bazúa, J. A. Solís-Fuentes. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: producción de biodiesel por

- transesterificación alcalina de aceite crudo de “almendras” de zapote mamey (*Pouteria sapota*). *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, **2009**, 24 (1), 48-56.
46. Liu, H.; Jiang, W.; Xie, M. Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **2010**, 5 (2), 152–164.
47. Malla H. J.; Aquino G. M.; Chota T. G.; Ayala B. M.; Medrano A. R.; Acevedo C. H. Estudio químico y nutricional de las hojas del rabanito, *Raphanus sativus L.*, como alimento para el consumo humano. *Rev. Per. Ing. Quím.*, **2003**, 5(2), 54-58.
48. Mejía G. F. L.; Correa M. H. A.; Gutiérrez B. J. E.; Castaño C. C. E. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L.*) en la obtención de azúcares fermentables. *Ingeniería y Ciencia*. **2007**. 3(6). 41-62.
49. Moreira y col. Tablas de composición de alimentos. (Rábanos). **2013**.
50. Nasevilla Bonilla F. J. Estudio de las características físico-químicas y nutricionales de dos ecotipos de rábano (*Raphanus sativus L.*) **2010**.
51. Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, 5.
52. Peñarrieta, J. M.; Tejeda, L.; Mollinedo, P.; Vila, J. L.; Bravo, J. A. Phenolic Compounds in Food. *Boliv. J. Chem.* **2014**, 31 (312), 68–81.
53. Plumb, G. W.; Price, K. R.; Williamson, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. *Redox Rep* **1999**, 4 (3), 123–127.
54. Procházková, D.; Boušova; I. & Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **2011**, 82, 513-523.

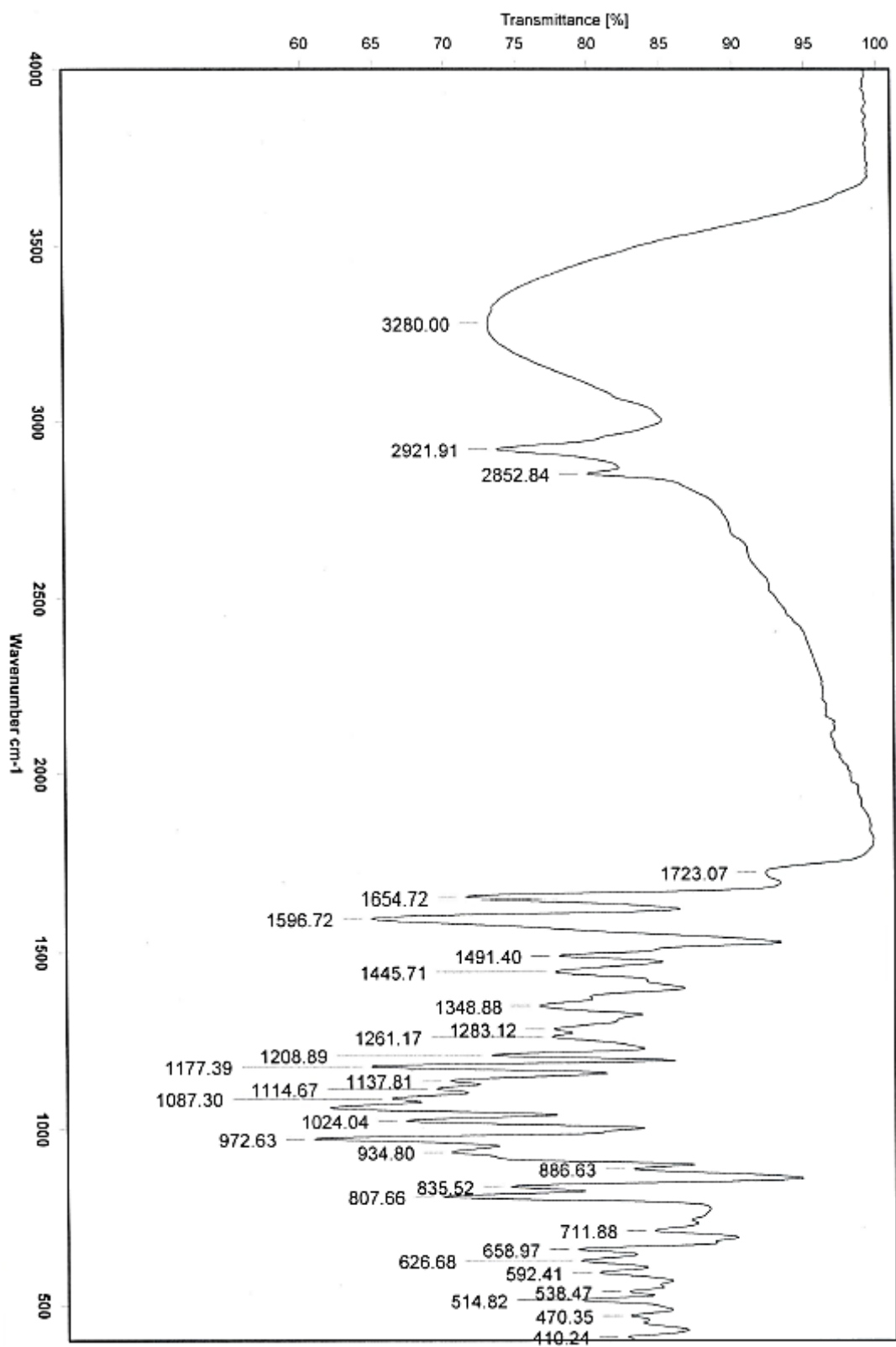
55. Ravishankar, D.; Rajora, A. K.; Greco, F.; Osborn, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45* (12), 2821–2831.
56. Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23* (4), 519–534.
57. Rojas Hurtado, M. P.; Martínez Palomino, T. Lípidos y Salud. *Cenipalma* **2010**, *10* (3), 1–8.
58. SAGARPA. Manual técnico par a la producción de hortalizas, huevo de gallina y carne de conejo.
59. Santanilla, E. B. F.; Moreno, G. A. M. Aprovechamiento de los residuos vegetales de una central de abastos para la obtención de etanol. *Épsilon*, **2010**, *14*, 21–31.
60. Santiago Calvo, A.; Magaña Lira, N.; Vázquez Romero, C. Cultivo de Rábano. *SAGARPA* **2014**, 14–15.
61. Saval, S. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *BioTecnología*. **2012**, *16* (2), 14–46.
62. SEDESOL. Manual Técnico sobre generación, recolección y transferencia de Residuos Sólidos Municipales. **2009**, 1–139.
63. SEMARNAT. Informe de la situación del medio ambiente en México. **2015**, 380.
64. Serafini, M.; Peluso, I.; Raguzzini, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.* **2010**, *69* (3), 273–278.

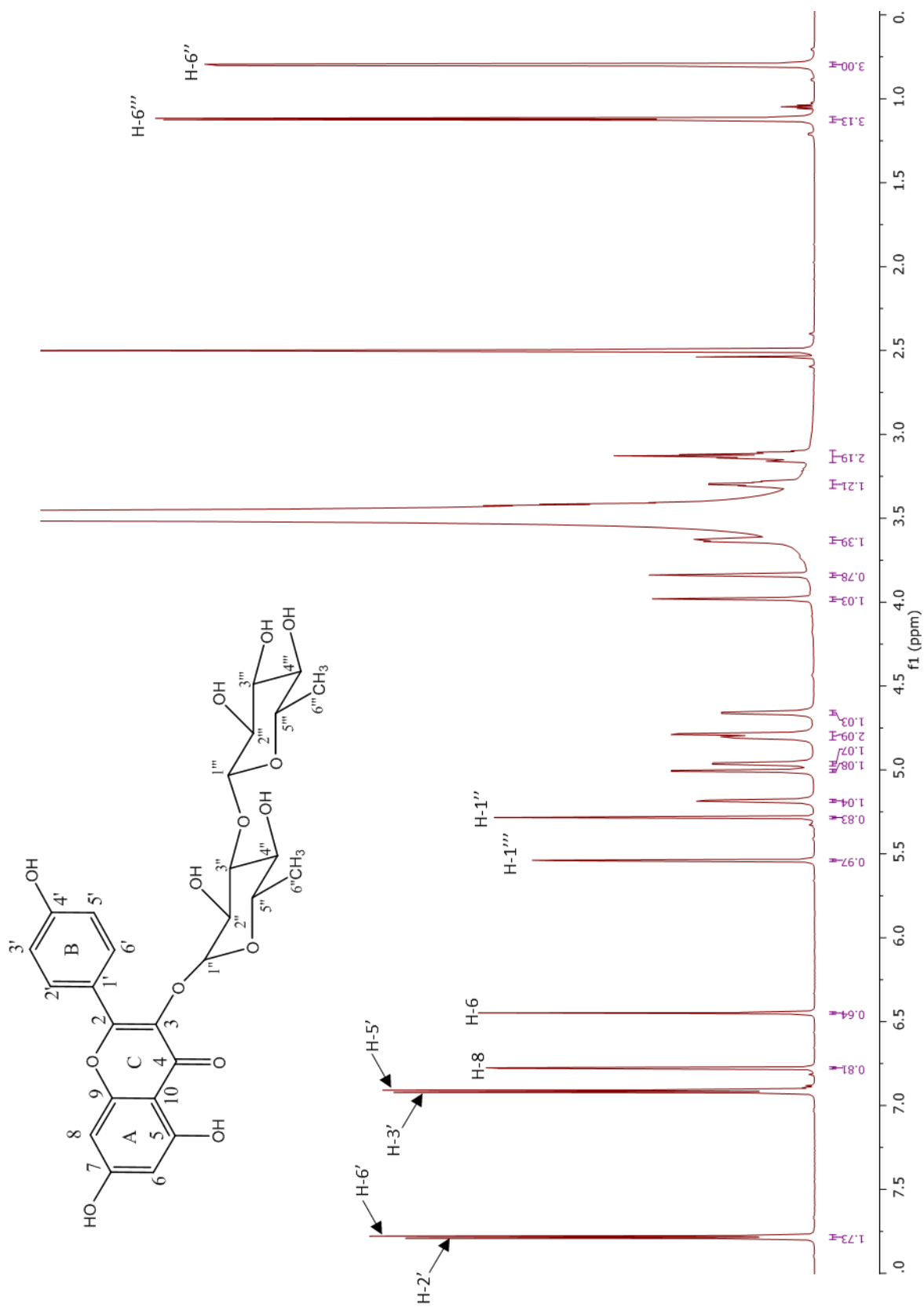
-
65. Shaiq, M.; Azhar I.; Ahmad, F.; Jahangir, M.; Perveen S.; Ahmad V.; Usmanghani K. Garcintin: A new flavonol glycoside from *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Natural Medicines*. **2000**, 253, 253–256.
66. SIAP. (2018). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado de: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
67. Singh P.; Singh J. Medicinal and therapeutic utilities of *Raphanus sativus*. *International journal of plant, animal and environmental sciences* **2013**, 3 (2), 103-105.
68. Tadera, K.; Minami, Y.; Takamatsu, K.; Matsuoka, T. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **2006**, 52 (2), 149–153.
69. Takaya, Y.; Kondo, Y.; Furukawa, T.; Niwa, M. Antioxidant Constituents of Radish Sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (27), 8061–8066.
70. Tapas, A.; Sakarkar, D.; Kakde, R. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* **2008**, 7 (3), 1089–1099.
71. Tsouvaltzis, P.; Brecht, J. K. Changes in quality and antioxidant enzyme activities of bunched and topped radish (*Raphanus sativus* L.) plants during storage at 5 or 10C. *J. Food Qual.* **2014**, 37 (3), 157–167.
72. Visentin, M.; Tava, A.; Iori, R.; Palmieri, S. Isolation and Identification for trans-4-(Methylthio)-3-butenyl Glucosinolate from Radish Roots (*Raphanus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40 (9), 1687–1691.

73. Wang, L. S.; Sun, X. D.; Cao, Y.; Wang, L.; Li, F. J.; Wang, Y. F. Antioxidant and pro-oxidant properties of acylated pelargonidin derivatives extracted from red radish (*Raphanus sativus var. niger*, *Brassicaceae*). *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48* (10), 2712–2718.
74. Walle, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36* (7), 829–837.
75. Welbaum, G. E. (2005), Vegetable production and practices. Boston, U.S.A, CAB International.
76. Yepes, S. M.; Johana, L.; Naranjo, M.; Sánchez. Valorización de residuos agroindustriales -frutas- en Medellín y el Sur del Valle del Aburrá, Colombia. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellin.* **2008**, *61* (1), 4422–4431.

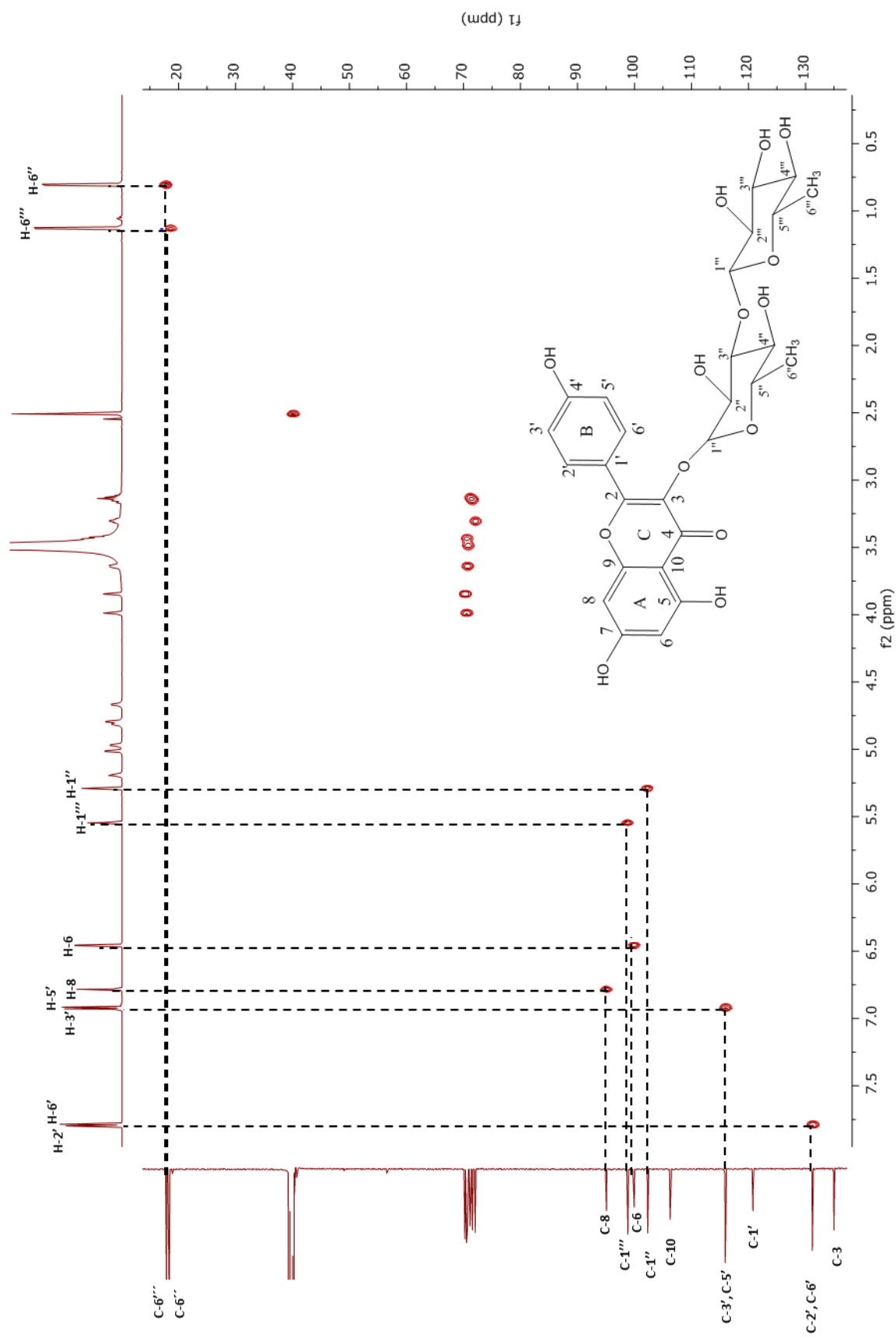
11. ANEXOS

Espectro 1. Espectro de infrarrojo (Pastilla con celdas de KBr) del compuesto **A** obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de *Raphanus sativus* L. var. *niger*

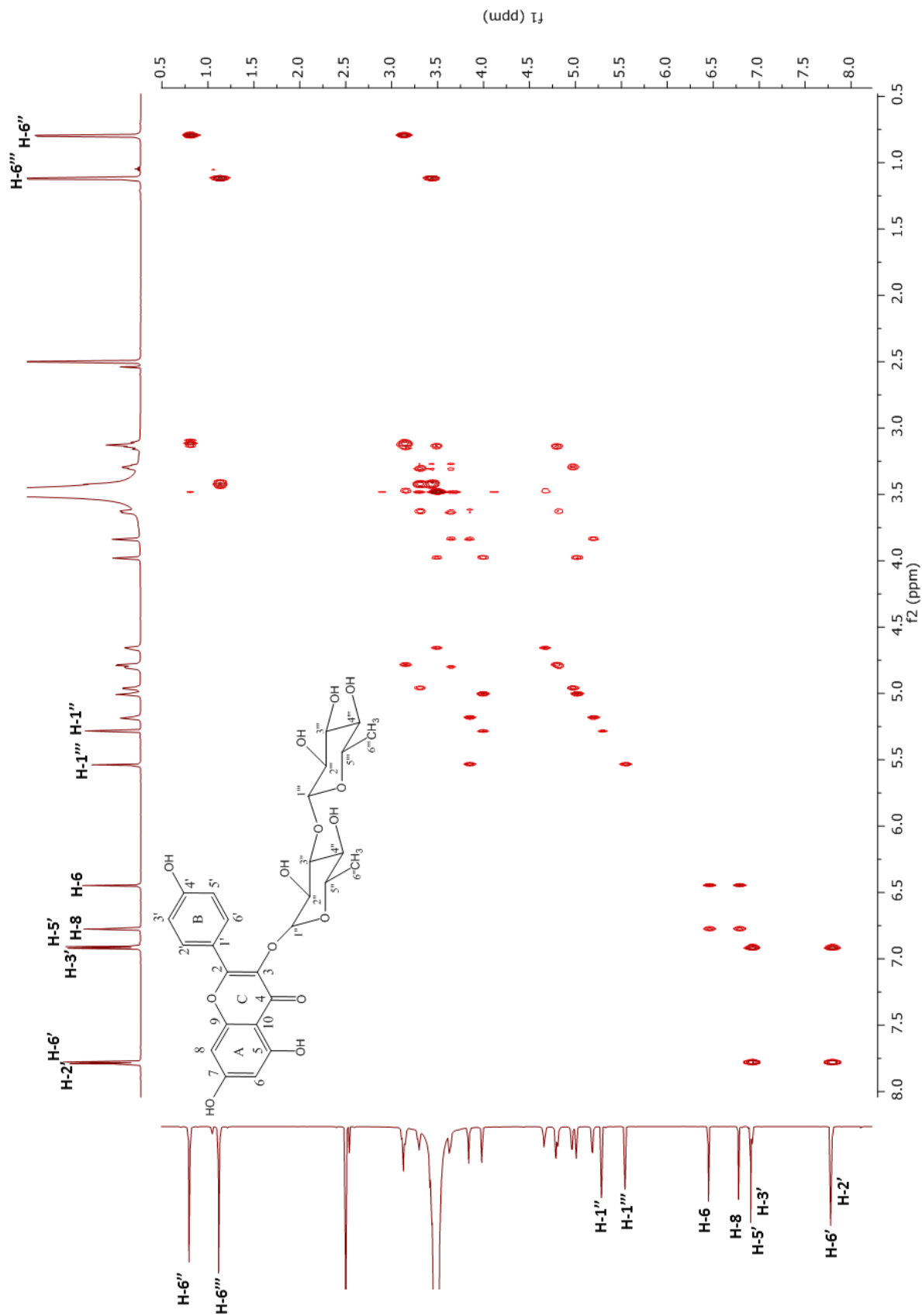




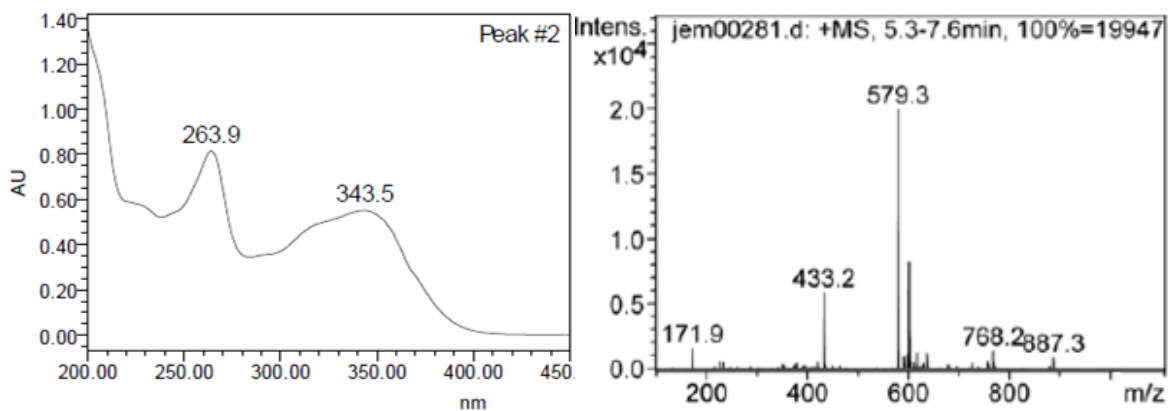
Espectro 2. Espectro de RMN-1H (DMSO-d₆, 700 MHz) del compuesto **A** obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de *R. sativus* L. var. *niger*



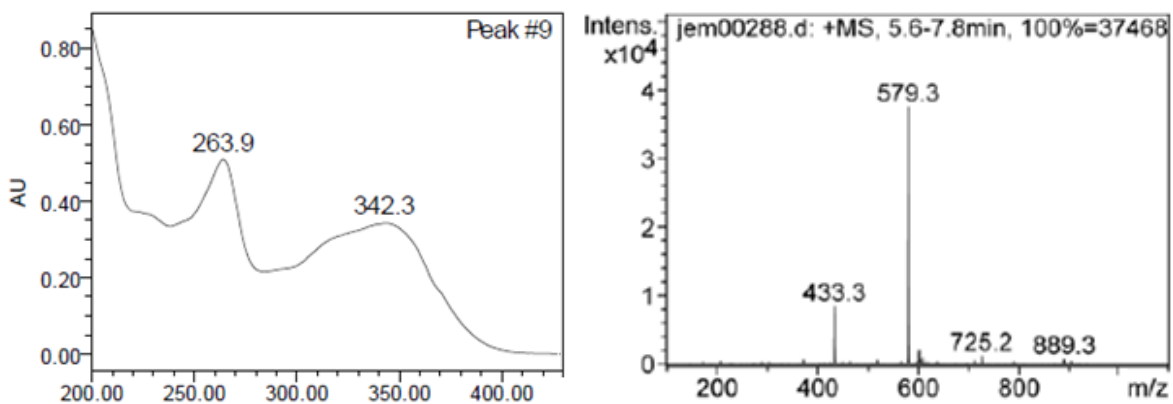
Espectro 4. Experimento HSQC del compuesto **A** obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de *R. sativus* L. var. *Niger*



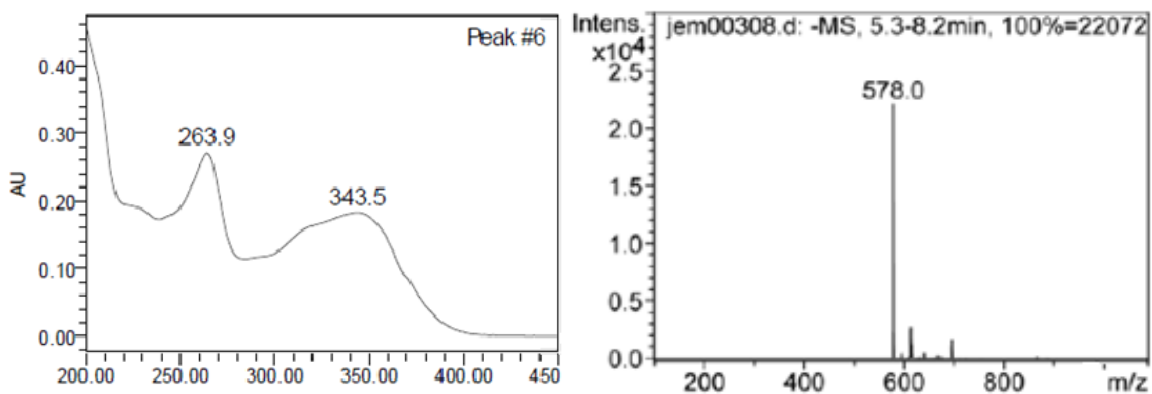
Espectro 6. Experimento COSY del compuesto **A** obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de *R. sativus* L. var. *Niger*



a) Compuesto A



b) Extracto rábano negro



c) Extracto rábano rojo

Anexo 7. Espectros de UV (dcha.) y EM (izq.) obtenidos del estudio de HPLC.