



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**NUEVAS APLICACIONES DE LA PLANTA CENICILLA
(*Helianthemum glomeratum*), SUS COMPONENTES
FLAVONOIDES PERMITEN PROPONERLA
COMO UN NUTRACÉUTICO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

GENARO ODIN GARCÍA GARCÍA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Dr. MANUEL JIMENEZ ESTRADA

VOCAL M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA

SECRETARIO M. en C. ARGELIA SANCHEZ CHINCHILLAS

1er. SUPLENTE M. en C. OCTAVIO FUENTES RAMIREZ

2do. SUPLENTE M. en C. NORMA CASTILLO RANGEL

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

**LABORATORIO 2-10 DEL DEPTO. DE PRODUCTOS NATURALES DEL
INSTITUTO DE QUIMICA DE LA UNAM**

ASESOR DEL TEMA

Dr. MANUEL JIMENEZ ESTRADA

SUSTENTANTE

GENARO ODIN GARCIA GARCIA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por su ejemplo de superación, su sacrificio, comprensión, confianza y estímulos brindados con infinito amor, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.

Con admiración y cariño... Gracias.

A mis distinguidas abuelitas Elena y *tere*[†] por sus enseñanzas, apoyo y consejos, porque son parte fundamental para la realización de mis metas en la vida, como mi carrera profesional.

Con admiración y cariño... Gracias

A mis primos favoritos Kaleb y Jorge, por escuchar mis aburridos temas de “*ciencia*” y contagiarme su alegría con sus ocurrencias.

A la Dra. *Patty* y a *Marce* por brindarme un su confianza y gran apoyo.

A mis amigos de **JN** por permitirme compartir valiosas y grandes anécdotas con ustedes.

A **la barda** y los **amigos** que conocí en la universidad por acompañarme en esta trayectoria de aprendizaje y conocimiento, por brindarme su amistad y muy buenos momentos.

Al **2-10** por su gran amistad, confianza y su apoyo en la tesis.

A los buenos amigos de la **P5** por su valiosa amistad, apoyo y confianza.

Al **rincón bohemio** (Agustín, Pablo, Emmanuel, Gerardo, Geraldina) por sus consejos en esas pláticas acompañadas de bebidas espirituosas y su amistad incondicional.

A Dios...

Un agradecimiento especial al Dr. Manuel Jiménez Estrada por su paciencia, atención y apoyo brindado para la realización de mi tesis.

Un agradecimiento A la M. en C. Lucia Cornejo Barrera y M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas por su atenta lectura, correcciones y comentarios a este trabajo.

Le agradezco a Ada Vázquez, Armando Torres y Nadia Rojano por su tiempo y esfuerzo dedicados a mi asesoría.

Al Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, le doy las gracias por el apoyo brindado.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE ANEXOS	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Nutracéuticos	3
2.1.1. Condiciones adecuadas de elaboración y conservación de nutracéuticos y/o alimentos con compuestos bioactivos (alimentos funcionales)	4
2.2. Flavonoides	6
2.2.1. Generalidades de los flavonoides	6
2.2.2. Propiedades biológicas de los flavonoides	9
2.2.3. Absorción de los flavonoides	12
2.3. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)	13
2.4. <i>Helianthemum glomeratum</i> (Lag.)	15
2.4.1. Generalidades de <i>Helianthemum glomeratum</i> (Lag.)	15
2.4.2. Estudios realizados sobre <i>Helianthemum glomeratum</i> (Lag.)	16
3. JUSTIFICACIÓN	19

4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos particulares	20
5. METODOLOGÍA	22
5.1. Obtención de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 1 y lote 2)	23
5.2. Detección cualitativa de los flavonoides campferol y quercetina en extractos de <i>H. glomeratum</i> (lote 1 y lote 2)	24
5.3. Cuantificación de campferol y quercetina en el extracto metanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 1 y lote 2)	24
5.4. Separación é identificación de los flavonoides campferol y quercetina en el extracto metanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 1)	26
5.5. Evaluación de la actividad del extracto acuoso y etanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 2) sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	27
5.6. Evaluación del extracto acuoso y etanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 2) en la inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata inducida con FeSO ₄	28
5.7. Evaluación de la actividad citotóxica del extracto acuoso y etanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 2)	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Obtención de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de <i>H. glomeratum</i>	32
6.2. Detección cualitativa de los flavonoides campferol	

y quercetina en extractos de <i>H. glomeratum</i>	33
6.3. Cuantificación de campferol y quercetina en el extracto metanólico de <i>H. glomeratum</i>	35
6.4. Separación é identificación de los flavonoides campferol y quercetina en el extracto metanólico de <i>H. glomeratum</i>	39
6.5. Evaluación de la actividad del extracto acuoso y etanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 2) sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	42
6.6. Evaluación del extracto acuoso y etanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 2) en la inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata inducida con FeSO ₄	44
6.7. Evaluación de la actividad citotóxica del extracto acuoso y etanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 2)	46
6.8. Propuesta para la aplicación de los extractos de <i>H. glomeratum</i> como nutracéutico	48
7. CONCLUSIONES	49
8. BIBLIOGRAFÍA	50

LISTA DE ABREVIATURAS

% p/v: porcentaje peso/volumen

% p/p: porcentaje peso/peso

°C: grados centígrados

μM: micromolar

AAD: Ácido 2-aminoetilester difenilbórico

AcOEt: Acetato de etilo

CCF: cromatografía en capa fina

cm: centímetros

DCM: Diclorometano

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

h: hora

H₂O: Agua

HCl: Ácido clorhídrico

HPTLC: Cromatografía en capa fina de alta resolución

IC₅₀: Concentración inhibitoria al 50%

MeOH: Metanol

min: minuto

mg: miligramo

MHz: Megahertz

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

N: Normal (concentración)

RMN-¹H: resonancia magnética nuclear protónica

RMN-¹³C: resonancia magnética nuclear de carbono 13

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

TBARS: sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

UI: Unidad internacional

UV: Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Estructura básica y numeración de los flavonoides.	6
Figura 2. Tipos de flavonoides.	8
Figura 3. <i>Helianthemum glomeratum</i> Lag. (Cenicilla).	15
Figura 4. Flavonoides aislados de <i>H. glomeratum</i> .	17
Figura 5. Diagrama general de la metodología.	22
Figura 6. Perfil cromatografico de los extractos de <i>H. glomeratum</i> .	33
Figura 7. Espectro de HPTLC para detección de campferol en extracto metanólico (lote 1), a 400 nm.	35
Figura 8. Espectro de HPTLC para detección de campferol en extracto metanólico hidrolizado (lote 2), a 400 nm.	36
Figura 9. Espectro de HPTLC para detección de quercetina en el extracto metanólico (lote 1), a 400 nm.	36
Figura 10. CCF de fracciones obtenidas de la columna cromatográfica del extracto metanólico (lote 1).	40
Figura 11. Efecto citotóxico de los extractos de <i>H. glomeraum</i> (lote 2) (50 µg/mL).	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos con beneficios a la salud.	3
Tabla 2. IC ₅₀ (µg/mL) de flavonoides frente a <i>G. lamblia</i> y <i>E. histolytica</i> .	18
Tabla 3. Condiciones para la obtención de extractos de <i>H. glomeratum</i> (lote 1 y 2).	23
Tabla 4. Curvas de calibración de campferol y quercetina.	25
Tabla 5. Concentración de muestras y referencias (DPPH).	27
Tabla 6. Rendimiento de los extractos de <i>H. glomeratum</i> .	32

Tabla 7.	Datos del área bajo la curva de campferol y quercetina en extractos metanólicos y extractos metanólicos hidrolizados, de <i>H. glomeratum</i> .	37
Tabla 8.	Porcentaje de campferol y quercetina en <i>H. glomeratum</i> .	37
Tabla 9.	Obtención de fracciones del extracto metanólico de <i>H. glomeratum</i> (lote 1), para identificación de campferol y quercetina.	39
Tabla 10.	Datos espectroscópicos y señales obtenidas de la interpretación del espectro de RMN- ¹³ C.	41
Tabla 11.	Actividad sobre el radical DPPH.	42
Tabla 12.	Actividad en la inhibición de la peroxidación lipídica.	44
Tabla 13.	Efecto citotóxico de los extractos de <i>H. glomeraum</i> (lote 2) (50 µg/ml).	47

ÍNDICE DE ANEXOS

A1.	Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata	57
A2.	Curvas de calibración de campferol y quercetina por HPTLC	57
A3.	Tratamiento de datos para la cuantificación de los flavonoides campferol y quercetina.	59
A4.	Espectro de RMN- ¹ H de la fracción 4 obtenida a partir del extracto metanólico (lote 1).	61
A5.	Espectro de RMN- ¹³ C de la fracción 4 obtenida a partir del extracto metanólico (lote 1).	62

1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países con mayor biodiversidad a nivel mundial, abarcando una variedad de plantas endémicas, algunas de las cuales son empleadas en la medicina tradicional, y son comercializadas en varias regiones del país para el tratamiento de enfermedades.

Helianthemum glomeratum (Lag.) (cenicilla) es una planta de origen mexicano que es utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Calzada, Alanís, 2007).

Esta especie presenta compuestos del tipo flavonoide, los cuales poseen entre otras características, la capacidad de capturar radicales libres, actuando como antioxidantes (García, *et al.*, 2010). Los radicales libres están relacionados con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como la aterosclerosis y cáncer, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años (Tapas, *et al.*, 2008; García, *et al.*, 2010).

Así mismo, se ha propuesto una relación inversa entre el padecimiento de este tipo de enfermedades y el consumo de alimentos que presentan compuestos fenólicos como los flavonoides (Nijveldt, *et al.*, 2001).

De este modo, con el fin de mejorar la calidad de vida y disminuir el riesgo de padecer enfermedades, los consumidores han optado por incluir en su dieta alimentos con compuestos que ofrezcan esta funcionalidad (Kaushik y Kaushik, 2010), de ahí la demanda de los alimentos funcionales y el gran crecimiento de este mercado a nivel mundial (Faruque, *et al.*, 2011).

*“Deja que el alimento sea tu medicina
y la medicina tu alimento”*

Hipócrates

2. ANTECEDENTES

2.1. Nutraceuticos

Nutraceutico es un término implementado por el Dr. Stephen DeFelice en el año de 1989. Es definido como un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios a la salud, previniendo o tratando enfermedades (Kalra, 2003; Kaushik y Kaushik, 2010), más allá de la nutrición básica.

Así, los nutraceuticos son sustancias biológicas extraídas de fuentes naturales que se caracterizan por métodos que promueven la conservación de sus propiedades originales sin hacer ningún tipo de alteración química (Birujete, *et al.*, 2009).

Los principales ingredientes nutraceuticos activos en plantas son flavonoides, compuestos que el cuerpo humano no puede sintetizar y uno de los modos de adquirirlos es mediante la ingesta de alimentos que los contengan, algunos ejemplos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Compuestos con beneficios a la salud

<i>Compuestos</i>	<i>Beneficio</i>
Carotenoides	
Licopeno	Podría reducir el riesgo de cáncer de próstata
Flavonoides	
Flavonoles	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer
Flavonas	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer

Fuente: Fragmento de tabla tomado de Alvidrez, *et al.*, 2002.

La nutrición en los seres humanos es indispensable para su salud física y mental, del mismo modo es importante para su actividad diaria. Estos compuestos presentes en los alimentos además de ayudar en la prevención y/o tratamiento de

enfermedades, son un complemento para tener un estado saludable (Birujete, *et al.*, 2009).

La promoción de una mejor calidad en la salud, debido a la ingesta de compuestos como los flavonoides en la dieta, ha incrementado el interés en los alimentos nutraceuticos (Kalra, 2003; Tapas, *et al.*, 2008).

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés de los consumidores hacia ciertos alimentos que aporten beneficios a su organismo. Así, se ha empezado a hacer conciencia de auto-cuidado para promover una salud óptima, relacionando la dieta como parte esencial para la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Alvídrez, *et al.*, 2002; Kaushik, Kaushik, 2010).

Esta alta demanda por parte de los consumidores por ingerir alimentos que puedan prevenir enfermedades cronicodegenerativas, impulsa aún más el desarrollo de la industria de los alimentos nutraceuticos o con alguna funcionalidad (Alvídrez, *et al.*, 2002). Como es mostrado por Faruque, *et al.*, 2011; en donde hace mención al crecimiento que se espera tenga el mercado global de los nutraceuticos, pasando de \$117.3 billones de dólares en el 2007 a los \$176.7 billones de dólares en el 2013. Por ejemplo: se han desarrollado productos que favorecen las defensas contra el estrés oxidativo, ayudando a la prevención de enfermedades cardiovasculares, utilizando sustancias antioxidantes como la vitamina E y C, flavonoides o carotenoides (Cortés, *et al.*, 2005).

2.1.1. Condiciones adecuadas de elaboración y conservación de nutraceuticos y/o alimentos con compuestos bioactivos (alimentos funcionales).

Para la elaboración de nutraceuticos y/o alimentos con compuestos bioactivos, a partir de extractos de plantas, se deben tener ciertas consideraciones como las siguientes.

Es necesario considerar la estabilidad de estos compuestos bioactivos durante el procesamiento y el almacenado, ya que de eso depende su actividad (Harbourne, *et al.*, 2011).

Para la preparación de extractos de alta calidad que se incorporan a los alimentos, el material vegetal debe secarse y almacenarse en condiciones apropiadas que favorezcan su estabilidad durante tratamientos post-cosecha, ya que los niveles de compuestos bioactivos, como los flavonoides, en las plantas pueden ser afectados por las técnicas aplicadas, por ejemplo el secado, cuyo objetivo es secar al material vegetal lo más rápido posible para mantener su calidad.

Las extracciones deben ser con los disolventes adecuados, ya que el uso de disolventes orgánicos puede limitar el uso en sistemas alimenticios por ser dañinos si se ingieren. El uso de agua y etanol se han adoptado como buenos disolvente para extracciones utilizadas en la industria alimenticia (Harbourne, *et al.*, 2011).

Los tratamientos térmicos prolongados son un factor que puede disminuir la actividad antioxidante por degradación de los flavonoides y compuestos fenólicos, como lo mencionan Rodríguez, *et al.* 2010; Inurreta, 2007 y Agostini, *et al.* 2004. No obstante, estos procesos térmicos ayudan a incrementar la vida de almacenamiento de los alimentos (Harbourne, *et al.* 2011).

Malas condiciones de almacenamiento de los alimentos con compuestos bioactivos, pueden conducir a la pérdida de éstos y a cambios de color indeseables. Se ha reportado que el almacenamiento a temperaturas de 4°C mantiene el contenido de antocianinas, así como sus características de color en jugos, durante largos periodos (Harbourne, *et al.*, 2011). Del mismo modo se recomienda limitar la exposición de los alimentos al oxígeno y a la luz, ya que estos factores pueden disminuir la concentración de los flavonoides y por tanto modificar su actividad (Inurreta, 2007).

2.2. Flavonoides

2.2.1. Generalidades de los flavonoides

Los flavonoides son un grupo importante de componentes fenólicos que constituyen una de las clases de metabolitos secundarios de las plantas, están ampliamente distribuidos en las hojas, flores, frutos y vegetales. Les proporcionan color a las plantas y protección contra de la radiación ultravioleta (Kuklinski, 2000; Heinrich, *et al.*, 2004; Nollet, 2004; Tapas, *et al.*, 2008).

Los flavonoides son estructuras del tipo $C_6-C_3-C_6$ con dos anillos aromáticos (ciclo A y ciclo B) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno (ciclo C) y generalmente poseen un grupo carbonilo en la posición 4 (figura 1) (Kuklinski, 2000).

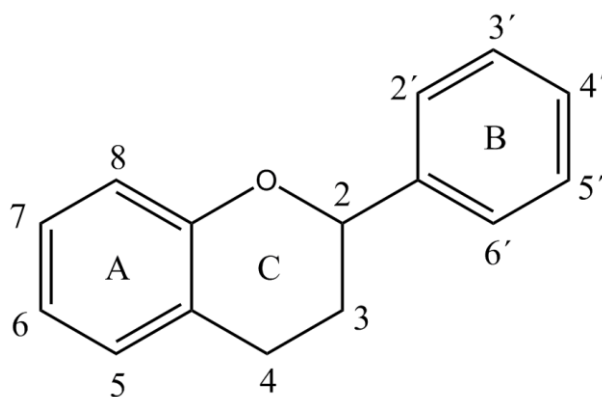


Figura 1. Estructura básica y numeración de los flavonoides

Pueden clasificarse en distintos tipos de acuerdo a su estructura (figura 2) (Hollman, Katan, 1999; Nollet, 2004), como:

- Flavonas y flavonoles

El ciclo A de estos flavonoides se encuentra generalmente sustituido por dos hidroxilos en C-5 y C-7, estos hidroxilos se pueden encontrar libres o esterificados. El ciclo B está sustituido normalmente en C-4', no obstante, puede encontrarse 3', 4'-disustituido o con menor frecuencia 3', 4', 5'- trisustituidos con los sustituyentes hidroxilos o -OCH₃. Además presentan un doble enlace en C-2, C-3.

Los flavonoles tienen un sustituyente -OH y las flavonas carecen de éste sustituyente, en C-3.

Los flavonoles constituyen uno de los principales grupos de los flavonoides, algunos de ellos son la miricetina, la galangina, la quercetina y el campferol, que están presentes en diversos alimentos. Por ejemplo, la quercetina está presente en cebolla, miel, manzanas, brócoli, cerezas, uvas y espinacas; el campferol en fresas, brócoli y rábano (Badui, 2006).

- Flavanonas y dihidroflavonoles

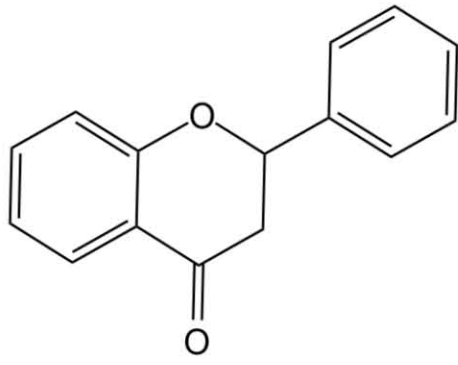
Estos flavonoides se caracterizan por la ausencia del doble enlace entre C-2, C-3. Los dihidroflavonoles tienen un sustituyente -OH y las flavanonas carecen de éste sustituyente, en C-3. (por ejemplo: narangina, presente en la naranja y limón).

- Chalconas

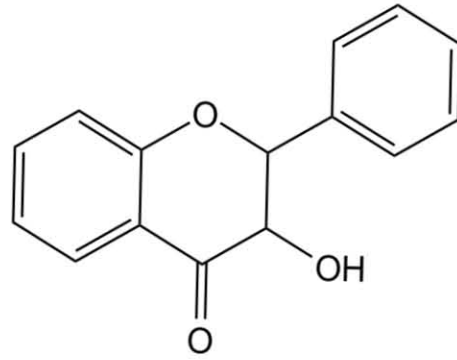
Las chalconas, desprovistas del heterociclo central (ciclo C), se caracterizan por la presencia de una cadena tricarbonada, cetónica, α,β -insaturada.

- Catequinas

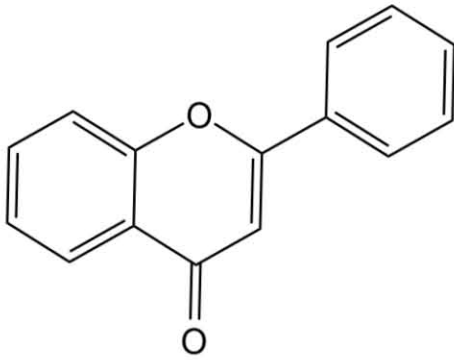
Las catequinas se caracterizan por la carencia del doble enlace entre C-2, C-3 y del grupo carbonilo en C-4 (Bruneton, 2001).



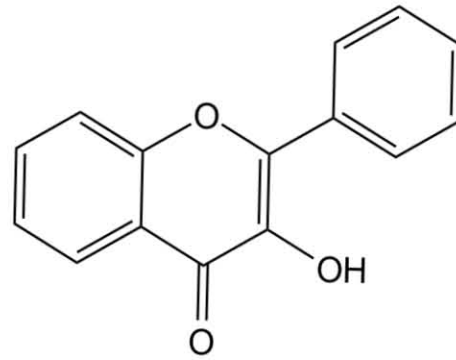
Flavanona



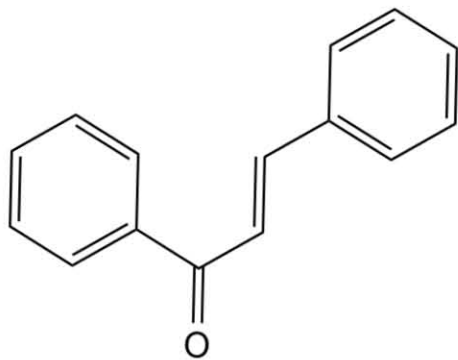
Dihidroflavonol



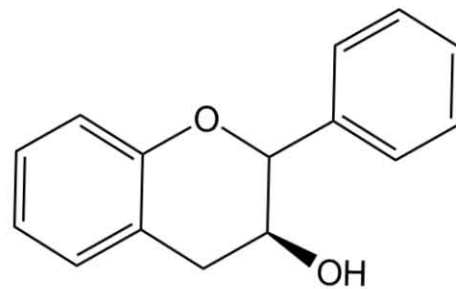
Flavona



Flavonol



Chalcona



Catequina

Figura 2. Tipos de flavonoides

Los flavonoides contribuyen en la calidad del color y de las propiedades sensoriales de los frutos y vegetales, así como de sus alimentos y bebidas derivados (Nollet, 2004) y están presentes como agliconas o heterósidos.

Los heterósidos generalmente se encuentran como glicósidos unidos a azúcares mediante enlaces β en algún carbono (C-glicósido) o con mayor frecuencia en algún hidroxilo (O-glicósido). Comúnmente el hidroxilo en C-3 de los flavonoles y el hidroxilo en C-7 de las flavonas son los implicados (Tapas, *et al.*, 2008). Los glicósidos pueden ser mono-, di- o trisacarídicos, formados con D-glucosa o D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa o D-xilosa (Bruneton, 2001).

2.2.2. Propiedades biológicas de los flavonoides

Los flavonoides por su actividad biológica toman un papel positivo en la salud humana ya que se ha reportado que actúan en la prevención de enfermedades, por lo cual se ha incrementado el interés en estos compuestos en años recientes (Nollet, 2004). Éstos presentan actividad antibacterial, antiviral, antialérgicas, antiinflamatoria, pero en su gran mayoría presentan actividad antioxidante, siendo ésta la de mayor impacto en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, como arterosclerosis, hipertensión, cáncer, entre otras (Villar del F., 1999; Martínez, *et al.*, 2002; Houston, 2005; Tapas, *et al.*, 2008; García, *et al.*, 2010).

- Actividad antibacterial y antiviral

Flavonoides como la quercetina presentan propiedades antibacteriales, la cual se ha reportado inhibe completamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

En lo que respecta a las propiedades antivirales, los flavonoides con la hidroxilación en la posición C-3 parecieran tener mayor actividad que los glicósidos en esta posición, puesto que se ha encontrado que la galangina, caempferol y quercetina, en este orden de importancia, son activos contra el virus del Herpes (Tapas, *et al.*, 2008).

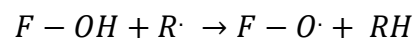
- Actividad antioxidante

Estudios epidemiológicos indican una relación inversa entre la ingesta de alimentos ricos en flavonoides y otros compuestos fenólicos, como frutas, vegetales, chocolate, vino tinto y té verde y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Villar del F., 1999; Martínez, *et al.*, 2002; Letenneur, *et al.* 2007; Crozier, *et al.* 2009).

Diversas enfermedades crónico-degenerativas se han asociado a altas concentraciones o una eliminación inadecuada de radicales libres. El incremento de estas sustancias causa estrés oxidativo, generando como consecuencia, disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas, como los fosfolípidos de las membranas celulares y proteínas (Martínez, *et al.*, 2002; García, *et al.*, 2010).

Los flavonoides proporcionan efectos antioxidantes que pueden ayudar a la captura y estabilización de radicales libres, así como a quelación de metales; ambos implicados con enfermedades cardiovasculares (Pérez, Martínez, 2001; Martínez, *et al.*, 2002; Houston, 2005; García, *et al.*, 2010).

Los sustituyentes hidroxilos de los flavonoides son determinantes para esta actividad antioxidante y participan en la siguiente reacción.



En donde

$F - OH$: flavonoide

$R\cdot$: Radical libre

El hidroxilo en el anillo B de los flavonoides es importante en la captación de radicales libres, hidroxilo ($\cdot OH$) y peroxilo ($ROO\cdot$) principalmente, estabilizándolos debido a la conjugación de los anillos aromáticos que genera un efecto de

resonancia. Del mismo modo la presencia del hidroxilo libre en posición C-3 y el doble enlace entre C-2 y C-3 en conjugación con un grupo carbonilo en C-4, está relacionada con la captura de radicales libres por los flavonoides y les brinda una mayor actividad antioxidante comparado con heterociclos saturados y los esterificados en C-3.

No obstante, la eliminación de los sustituyentes glicosídicos *in vivo* puede incrementar significativamente la actividad de los flavonoides ingeridos en la dieta. La sustitución del anillo A, es poco relacionado con la actividad antioxidante. (Heim, *et al.*, 2002). La actividad de captación de radicales libres de algunos flavonoides se ha reportado en este orden: miricetina > quercetina > ramnetina > naringenina > apigenina > catequina > campferol (Tapas, *et al.*, 2008).

La peroxidación lipídica es un proceso clave en diversas patologías y es causada por el estrés oxidativo (Schinella, *et al.*, 2002). Distintos índices de este estrés oxidativo usados en algunos estudios, como en las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), demuestran la eficiencia antioxidante de flavonoides *in vitro* (Heim, *et al.*, 2002), además se ha demostrado la protección de los lípidos frente a la peroxidación *in vivo*, por acción de estos compuestos (Crozier, *et al.*, 2009).

La protección a la peroxidación lipídica debido a la ingesta de flavonoides tiene gran importancia en la prevención o el retraso del desarrollo de arterosclerosis. Se observó una reducción en el riesgo de mortalidad de más del 50% por cardiopatía coronaria debido al consumo de 42 mg/día de flavonoles (Hollman, Katan, 1999; Villar del F., 1999). Del mismo modo, Nijveldt, *et al.*, 2001, hace referencia a estudios en donde encuentran una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y la concentración de colesterol en plasma y daños al corazón. También se ha observado en ratas que la quercetina en particular mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y protege las arterias coronarias mejorando la circulación (Martínez, *et al.*, 2002).

Aunado a esto, algunos estudios han demostrado que los flavonoides tienen efecto en la carcinogénesis *in vitro* y apuntan a que también lo tienen *in vivo* (Grotewold, 2006). Se ha observado que con el consumo incrementado de flavonoides (mayor al consumo promedio) presentes en frutas y vegetales, se experimenta una disminución del 50% en el riesgo de cáncer en el tracto digestivo y en las vías respiratorias (Martínez, *et al.*, 2002). Del mismo modo se ha relacionado con un mejor funcionamiento cognitivo (Letenneur, *et al.*, 2007).

El consumo de los flavonoides está relacionado con los hábitos alimenticios de cada país a lo largo de todo el mundo, siendo en algunos casos mayor o menor, independientemente de esto la ingestión promedio se estima en 23 mg/día, predominando en esta concentración los flavonoles y en especial la quercetina. Las fuentes alimenticias principales de los flavonoles son, entre otras, el té negro, las cebollas, las manzanas y la pimienta negra (Martínez, *et al.*, 2002; Hollman, Katan, 1999).

2.2.3. Absorción de los flavonoides

Como fue descrito, los flavonoides de la dieta están presentes en los alimentos enlazados a azúcares como β -glicósidos. Estos enlaces de los azúcares resisten la hidrólisis de las enzimas pancreáticas, siendo la microbiota intestinal la responsable de la hidrólisis de los azúcares, transformando los flavonoides glicosilados en agliconas mediante las β -glicosidasas modificando en algunos casos su absorción y efectos. (Hollman, Katan, 1999; Heim, *et al.*, 2002; Laparra, Sanz, 2010). Por ejemplo, se ha reportado que la hidrólisis y absorción de la aglicona correspondiente del campferol-3-O-glucósido y quercetina-3-O-glucósido se lleva a cabo en el intestino delgado (Heim, *et al.*, 2002). No obstante, existe la posibilidad de que los flavonoides glicosilados aparte de ser hidrolizados por la microbiota, puedan ser absorbidos de otra manera, mediante la interacción con los transportadores epiteliales de glucosa; como se ha reportado para el caso de los glicósidos de quercetina a excepción de la rutina (Heim, *et al.*, 2002). Además se ha observado que existe una absorción de los flavonoides como agliconas o como

glicósidos en mayor o menor proporción, como es el caso de la absorción de la quercetina como aglicona y la quercetina glicosilada (24% y 52% respectivamente) (Hollman, Katan, 1999).

Los compuestos flavonoides también pueden afectar la microbiota intestinal, puesto que una parte de ellos no son completamente absorbidos y metabolizados y generan una acumulación en el intestino que ejerce una actividad bacteriostática, inhibiendo selectivamente el crecimiento de patógenos (Laparra, Sanz, 2010).

2.3. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)

La cromatografía en capa fina (CCF) es un método utilizado para el análisis cualitativo de muestras y estándares mediante una fase estacionaria (capa) y una fase móvil (disolvente), método por el cual no es posible cuantificar compuestos sin ayuda de algún equipo. Para llevar a cabo un análisis cuantitativo se utilizan métodos como cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).

A través del método de HPTLC se pueden analizar diversas muestras y estándares simultáneamente y separar una gran variedad de compuestos orgánicos, inorgánicos, biológicos, polímeros, entre otros, por ejemplo los flavonoides. Sin embargo está limitado a compuestos no volátiles. Es utilizado en la industria farmacéutica para estudios y monitoreos de fluidos biológicos, del mismo modo se emplea para analizar residuos de contaminantes en los alimentos y en aplicaciones similares.

El material de separación para HPTLC está disponible en forma de capa en vidrio o en hoja de aluminio. Las capas tienen partículas más pequeñas (6 μm en vez de 12 a 20 μm), son más delgadas (100 a 200 μm en vez de 250 μm) y, la distribución de las partículas son significativamente más cerradas y uniforme que los adsorbentes convencionales de cromatografía en capa fina. Estos factores

generan una fácil y eficiente separación, favoreciendo límites de detección más bajos. El tiempo de análisis en HPTLC es de 3 a 15 minutos dependiendo de las muestras por placa y la distancia que tenga que recorrer el disolvente. Se puede ahorrar un mayor tiempo, si muchas muestras son sometidas a una misma cromatografía.

La manera más simple de aplicar las muestras es usando un capilar de volumen fijo depositando su contenido cuando es tocada la placa y aplicando una presión constante. La realización de un análisis cuantitativo mediante HPTLC se lleva a cabo con una mejor precisión haciendo una aplicación secuencial de las muestras con un dispositivo mecanizado como el Nanomat. Las muestras después de ser corridas en la cromatografía pueden ser rociadas con reactivos para mejorar su apreciación.

La evaluación de los cromatogramas se lleva a cabo mediante un scanner, la separación de cada carril son escaneados con una luz en forma de una abertura cuya longitud y anchura son seleccionadas. La luz reflejada es medida a través de un fotosensor. Un integrador o programa de cómputo relaciona la concentración y la respuesta óptica; siendo la intensidad de luz medida, directamente proporcional a la cantidad de la sustancia.

En este análisis se selecciona y posiciona automáticamente una lámpara (deuterio o tungsteno, para cubrir un rango de 190 a 800 nm), se fija la velocidad del escaneo (hasta un máximo de 100 mm/s) y la resolución (entre 25 y 100 μm) (todas las funciones son controladas mediante una computadora). Llevado a cabo el escaneo, el equipo transmite todos los datos medidos para su procesamiento con un programa de cómputo específico o CATS.

Este análisis por HPTLC es utilizado en algunos casos con mayor frecuencia que el análisis por HPLC, por ser más económico y la facilidad a analizar muchas muestras simultáneamente (Settle, 1997; Sherma, Fried, 2003).

2.4. *Helianthemum glomeratum* (Lag.)

2.4.1. Generalidades de *Helianthemum glomeratum* (Lag.)

La planta *Helianthemum glomeratum* (Lag.) (cenicilla) (figura 3) perteneciente a la familia *Cistaceae*, es una especie originaria de la República Mexicana; habita en climas seco, semiseco y húmedo y se encuentra distribuida principalmente en los estados de Tlaxcala, Michoacán, Aguascalientes, Nayarit y Chiapas. Esta planta es conocida por los nombres comunes de cenicilla, hierba de la gallina, cenicillo, hierba del moro, hierba ceniza o juanita (medicinatradicionalmexicana.unam.mx).



Figura 3. *Helianthemum glomeratum* (Lag.) (Cenicilla).

Los usos medicinales de esta planta mexicana son con mayor frecuencia para tratar desórdenes del aparato digestivo, tales como mal estomacal, vómitos y especialmente para diarrea; suele emplearse la infusión de las hojas y tallos de la planta como agua de uso hasta contrarrestar los síntomas y/o sentir mejoría.

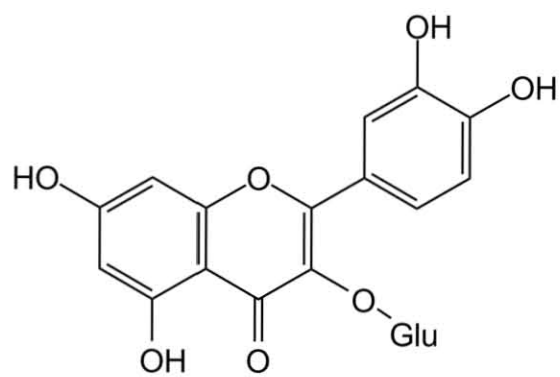
2.4.2. Estudios realizados sobre *Helianthemum glomeratum* (Lag.)

Esta planta ha sido tema de estudio debido a los efectos que presenta en contra de los desórdenes del aparato digestivo para los que es utilizada, principalmente la diarrea. Investigaciones realizadas han demostrado que la planta *H. glomeratum* presenta componentes flavonoides a los cuales se les atribuye el efecto terapéutico (Calzada, *et al.*, 1995; Meckes, *et al.*, 1997; Calzada, Alanís, 2007).

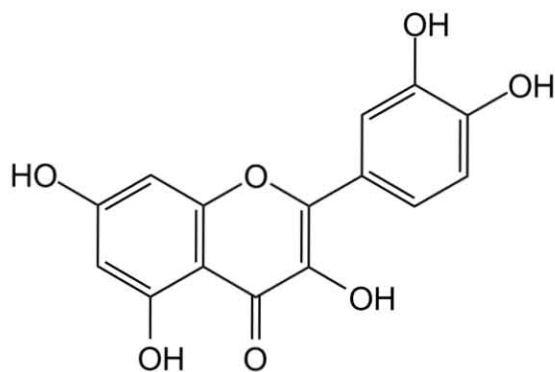
Los extractos y los componentes flavonoides obtenidos de las partes aéreas de la *H. glomeratum* se han evaluado contra algunos microorganismos causantes de problemas gastrointestinales en el ser humano. Ensayos *in vitro* del extracto metanólico de *H. glomeratum* han demostrado actividad en contra de *Entamoeba histolytica* (IC₅₀ 7.98 µg/mL) y *Giardia lamblia* (IC₅₀ 119.64 µg/mL). (Calzada, *et al.*, 1998; Meckes, *et al.*, 1999).

Asimismo, el extracto metanólico y el extracto acuoso fueron probados contra distintas bacterias enteropatógenas. Ambos extractos mostraron efecto contra diversas bacterias, principalmente contra cepas de *Vibrio* y *Shigella*. No obstante el extracto metanólico presentó mayor efecto contra *Vibrio parahemoliticus* y *Vibrio cholerae* a diferencia del extracto acuoso; la actividad contra este tipo de microorganismos es importante, ya que están asociadas con diarreas sanguinolentas y acuosas respectivamente (Meckes, *et al.*, 1997).

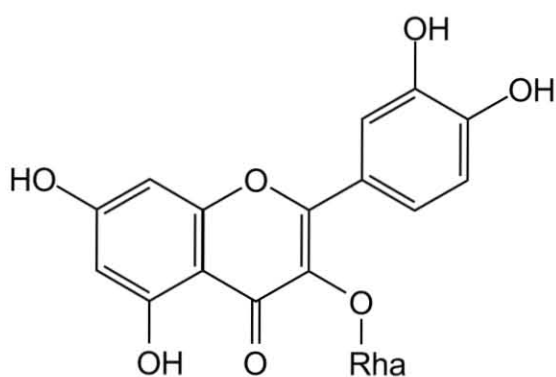
Algunos flavonoides como campferol, quercetina, tilirósido, astragalina, quercitrina é isoquercitrina (figura 4), aislados de las partes aéreas de la planta *H. glomeratum* (Calzada, *et al.*, 1995; Meckes, *et al.*, 1997; Calzada, Alanís, 2007), se probaron en contra de *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*.



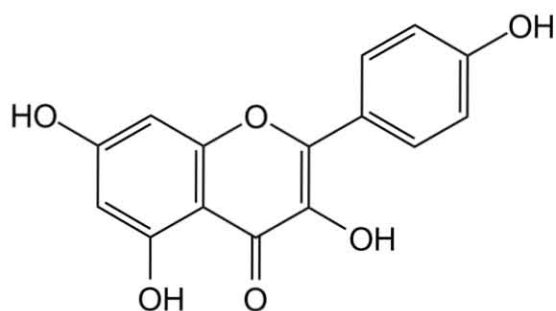
Isoquercitrina



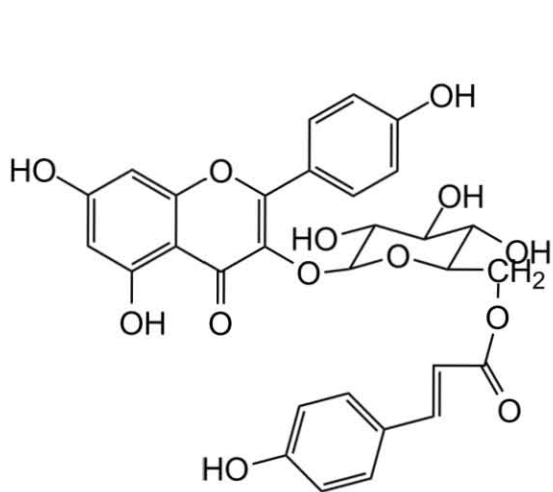
Quercetina



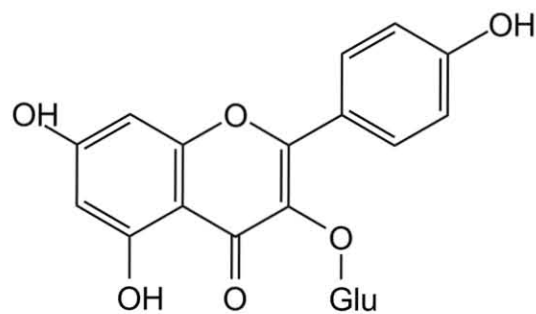
Quercitrina



Campferol



Tilirósido



Astragalina

Figura 4. Flavonoides aislados de *H. glomeratum*

De estos estudios *in vitro* se observó que el campferol fue el compuesto más activo en contra *G. lamblia* y *E. histolytica*. Los compuestos tilirósido, quercitrina y quercetina, mostraron efecto contra *G. lamblia*. Asimismo, el tilirósido y la isoquercitrina presentaron efecto en contra de *E. histolítica*. La astragalina fue la que mostró una actividad menor contra ambos organismos (tabla 2). Sin embargo, todos los componentes fueron menos activos que el metronidazol y la emetina (controles) (Meckes, *et al.*, 1999; Calzada, Alanís, 2007).

Tabla 2. IC₅₀ (µg/mL) de flavonoides frente a *G. lamblia* y *E. histolytica*

	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>
campferol	7.9	8.7
tilirósido	17.4	17.5
quercitrina	24.2	98
quercetina	26.4	114.3
isoquercitrina	47.5	14.7

De manera similar, se reportó la actividad *in vivo* de los compuestos campferol y tilirósido contra *G. lamblia*, con una dosis efectiva al 50% (ED₅₀) de 2.057 mmol/Kg y 1.429 mmol/Kg respectivamente, actividad similar al metronidazol (1.134 mmol/Kg) utilizado como positivo (Barbosa, *et al.*, 2007).

Los efectos antidiarreicos que muestra *H. glomeratum* pueden ser debidos a la existencia de los flavonoides en los extractos, ya que, tanto los extractos como los componentes aislados, presentan actividad antibacterial y en contra de los protozoarios *G. lamblia* y *E. histolytica* (Meckes, *et al.*, 1997).

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Al considerar la incidencia de enfermedades crónico degenerativas como la hipertensión y arterosclerosis, los consumidores han buscado alternativas en su alimentación para reducir el riesgo de presentarlas y mejorar su calidad de vida. Los alimentos con funcionalidad son una opción para este fin, debido a la presencia de compuestos activos como los flavonoides. Por ello, el crecimiento del mercado de estos alimentos y la demanda de desarrollar nuevos productos.

En la búsqueda de nuevas aplicaciones de las plantas medicinales mexicanas, cuyo uso es limitado, proponemos añadir extractos de *Helianthemum glomeratum* en los alimentos y así contribuir a la ampliación del mercado de las plantas medicinales mexicanas, como otra fuente para la industria alimentaria.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Proponer los extractos acuoso y etanólico de la especie *Helianthemum glomeratum* como nutracéuticos para enriquecer alimentos, en función de la actividad antioxidante que presenten estos derivados, considerando los flavonoides que muestran.

4.2. Objetivos particulares

- Obtener el material vegetal para el estudio.
- Detectar la presencia de los flavonoides campferol y quercetina en los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *H. glomeratum*.
- Cuantificar los flavonoides campferol y quercetina en el extracto metanólico de *H. glomeratum* a través de HPTLC.
- Separar é identificar los flavonoides campferol y quercetina en el extracto metanólico de *H. glomeratum* a través de RMN.

- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum*, mediante el método de DPPH y TBARS.

- Evaluar la actividad citotóxica del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum*, a través del método de sulforrodamina B.

- Proponer una aplicación de los extractos de *H. glomeratum* en un alimento.

5. METODOLOGÍA

La metodología general del estudio se muestra en la figura 5, posteriormente se describen las metodologías realizadas para cada determinación.

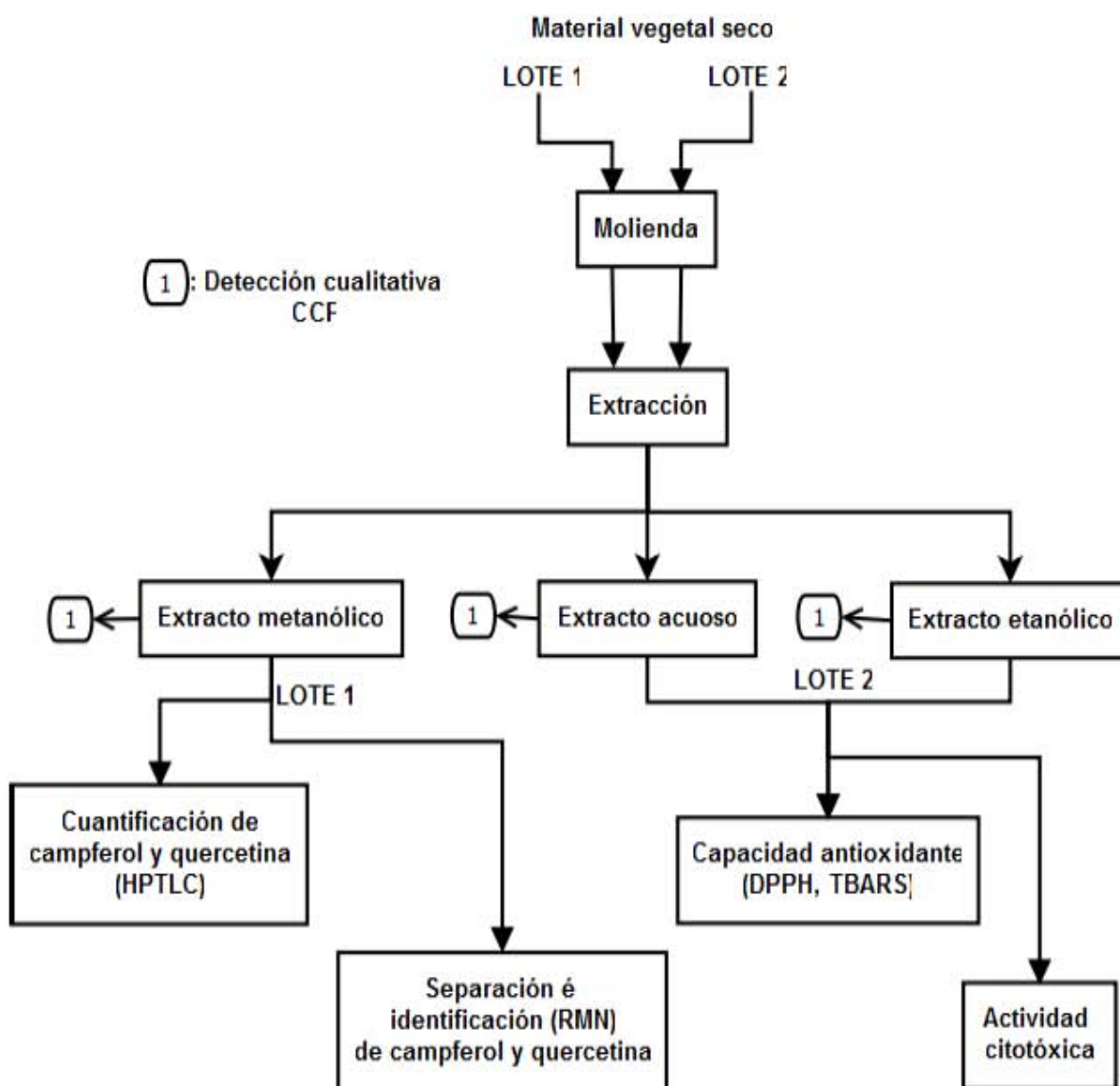


Figura 5. Diagrama general de la metodología

Material vegetal

Se emplearon las partes aéreas secas de dos lotes de *H. glomeratum* para la realización de los experimentos, identificados de la siguiente manera:

Lote 1: *H. glomeratum* colectada en Apizaco, Tlaxcala.

Lote 2: *H. glomeratum* comprada en Pasaje Catedral, en el Centro Histórico de la Ciudad de México.

En cada experimento se mencionará el o los lotes que se emplearon.

5.1. Obtención de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *H. glomeratum* (lote 1 y 2)

La obtención de extractos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología empleada por Calzada, *et al.*, 1995; con modificaciones adecuadas a nuestras condiciones de trabajo.

Las partes aéreas secas de *H. glomeratum* (lote 1 y 2) por separado, se trituraron utilizando un molino PULMEX mini 100 y posteriormente se llevaron a cabo tres extracciones independientes, con H₂O, EtOH y MeOH, empleando 15 g del material vegetal para cada una. Las extracciones se realizaron mediante maceraciones consecutivas del material vegetal (Tabla 3) a temperatura ambiente por un periodo de una hora. Terminadas las maceraciones, los extractos se filtraron a presión reducida a través de papel filtro Whatman No. 2.

Tabla 3. Condiciones para la obtención de extractos de *H. glomeratum* (lote 1 y 2).

Extracción	Maceraciones	Disolvente	Volumen de disolvente por maceración (mL)
Acuosa	3	agua destilada	400
Etanólica	3	etanol destilado	400
Metanólica	3	metanol destilado	400

El extracto acuoso se liofilizó por 24 h a -42 °C en un equipo LABCONCO freezone 6. Los extractos etanólico y metanólico se concentraron a presión reducida a una temperatura máxima de 40 °C, empleando un rotavapor Büchi R-11.

5.2. Detección cualitativa de los flavonoides campferol y quercetina en extractos de *H. glomeratum* (lote 1 y lote 2)

La detección cualitativa de los flavonoides campferol y quercetina en los extractos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF); se utilizaron cromatofolios ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ de 0.20 mm y como referencias se emplearon quercetina y campferol (SIGMA). La cromatoplaca se eluyó en un sistema de disolventes AcOEt:MeOH:H₂O [100:16.5:13.5] (Calzada, Alanís, 2007).

La cromatoplaca se roció con ácido 2-aminoetilester difenilbórico (SIGMA) al 1 % (p/v) en metanol (AAD) (Wagner, *et al.* 1984) y posteriormente se visualizó bajo luz UV a 365 nm usando una lámpara Espectroline modelo ENF-260C.

5.3. Cuantificación de campferol y quercetina en el extracto metanólico de *H. glomeratum* (lote 1 y lote 2)

Previo a la cuantificación, se realizó una hidrólisis ácida a los extractos. Esta hidrólisis de los extractos metanólicos se llevó a cabo siguiendo la técnica propuestas por Harborne J. B., 1998.

Se disolvieron 50 mg del extracto de *H. glomeratum* (lote 1) y 500 mg del extracto de *H. glomeratum* (lote 2), en 2.5 mL de metanol y seguidamente se agregaron 10 mL de una solución acuosa de HCl 2N. La hidrólisis ácida se llevó a cabo por 30 min a 80 °C con agitación constante.

Al término del periodo de hidrólisis ácida, la solución se filtró a través de papel filtro Whatman No. 2 y el filtrado obtenido se sometió a cuatro extracciones líquido-líquido con 30 mL de AcOEt cada una. La fase orgánica se recuperó y llevó a pH neutro, con agua. Posteriormente se concentró a presión reducida a una temperatura máxima de 40 °C.

La cuantificación de campferol y quercetina en el extracto metanólico se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).

Para la cuantificación se realizaron curvas de calibración por separado de los estándares (anexo A2). Las concentraciones que se utilizaron se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Curvas de calibración de campferol y quercetina.

Muestra	µg/mL _{meOH}					
Campferol	0.1	0.3	0.6	0.75	1	2
Quercetina	0.166	0.333	0.5	0.666	1	-

La aplicación de estas diluciones se realizó en cromatoplasmas de sílica gel 60F 254 de 10 X 10 cm y se llevaron a cabo mediante un equipo Camag nanomat 3, con un capilar calibrado a 1 µL. Se aplicaron 2 µL de cada una de las diluciones de la curva de campferol y de la curva de quercetina, por separado. La curva de calibración de campferol se eluyó en un sistema DCM:AcOEt [4:6] y la de quercetina en un sistema DCM:AcOEt [1:9]. Posteriormente las placas se rociaron con AAD.

Los extractos metanólicos (lote 1 y lote 2) y los hidrolizados de éstos, se llevaron a una concentración de 10 mg/mL en metanol para la cuantificación de los flavonoides. Se aplicaron 2 µL de estas soluciones por duplicado, en dos placas diferentes y se eluyeron con los sistemas mencionados anteriormente, en función del flavonoide que se cuantificó. Posteriormente se rociaron con AAD.

La lectura de las curvas de calibración y de las muestras se realizó midiendo la absorbancia a 400 nm, con una velocidad de escaneo de 20 mm/s y una dimensión del ancho del haz de luz de 0.20 x 0.20 mm, utilizando un equipo Camag TLC Scanner 3. El análisis de los datos se llevó a cabo con la ayuda del software Wincats™ 3.0. La concentración de campferol y quercetina en los extractos metanólicos y sus hidrolizados se obtuvo mediante la interpolación de datos en las curvas de calibración obtenidas.

5.4. Separación e identificación de los flavonoides campferol y quercetina en el extracto metanólico de *H. glomeratum* (lote 1)

Para la separación de los flavonoides, el extracto metanólico (1.2g) se sometió a una columna cromatográfica (sílica gel 70-230) (Calzada, Alanís, 2007). Ésta se eluyó inicialmente con AcOEt, y posteriormente se aumentó la polaridad con MeOH hasta llegar a una relación AcOEt:MeOH [96:4]. El desarrollo de la columna se siguió mediante CCF eluidas con una mezcla de AcOEt:MeOH [8:2] y rociadas con AAD. Se reunieron las fracciones con composición similar.

La fracción de interés se sometió a experimentos de RMN-¹H y RMN-¹³C a 300 MHz, realizados en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química de la UNAM, para la identificación de los compuestos.

El análisis de los espectros se llevó a cabo mediante el software NMRnotebook™ 2.60 build 0.2

5.5. Evaluación de la actividad del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2) sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Este experimento se realizó en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, empleando una técnica espectrofotométrica midiendo la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Cotelle, *et al.*, 1996).

Se tomaron por triplicado 50 μ L del extracto acuoso y etanólico por separado y 50 μ L por cuatriplicado de las referencias quercetina y α -tocoferol, a diferentes concentraciones (Tabla 5); se depositaron en una microplaca de 96 pozos y posteriormente se agregaron 150 μ L de una solución etanólica de DPPH 133.33 μ M, (concentración final 100 μ M). La mezcla se protegió de la luz y se incubó 30 min a 37 °C con agitación constante, finalizado el tiempo de incubación, se leyó la absorbancia a 515 nm por medio de un lector de microplacas (ELx 808 Bio-Tek).

Tabla 5. Concentración de muestras y referencias (DPPH)

Muestra	concentración (ppm)									
extracto acuoso	10	17.8	31.6	56.2	100					
extracto etanólico	10	17.8	31.6	56.2	100					
quercetina	0.72	0.96	1.28	1.7	2.27	3.02	4.03	5.19	7.17	
α -tocoferol	5.75	7.66	10.2	13.6	18.2	24.2	31.9	43		

La actividad sobre el DPPH se expresa como porcentaje de reducción del radical y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) 100$$

en donde:

C = absorbancia del control (DPPH 100 μ M)

E = absorbancia de las muestras o referencias (DPPH 100 μ M + muestras)

Posteriormente se estimó la concentración inhibitoria al 50 % (IC₅₀).

5.6. Evaluación del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2) en la inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata inducida con FeSO₄

La determinación de la inhibición de la peroxidación de lípidos se realizó en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM y se llevó a cabo mediante el ensayo de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa, *et al.*, 1979; Rossato, *et al.*, 2002), basado en la lectura espectrofotométrica de un compuesto colorido formado por la reacción del ácido tiobarbitúrico y el malonaldehído, el cual es producto de la oxidación de los lípidos. El ensayo se llevó a cabo en tres etapas.

Primera etapa. Homogeneización del cerebro de rata.

El cerebro de rata se extrajo por completo, se colocó en solución salina al 0.9 % y se lavó con agua destilada para quitar restos de sangre. El cerebro se pesó y se agregaron 10 mL de buffer de fosfatos (9.5 mM, pH= 7.4) por cada gramo, posteriormente se homogeneizó por 60 s y se centrifugó 10 min a 3000 rpm, y se recuperó el sobrenadante.

Segunda etapa. Cuantificación de proteína por el método de Lowry y ajuste de concentración (Lowry, *et al.*, 1951).

Se tomaron por duplicado 5 μ L del sobrenadante del homogenizado de cerebro de rata y se colocaron en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se añadieron 20 μ L de agua destilada é inmediatamente se adicionaron 150 μ L de una mezcla de reacción (0.98 mL de una solución de Na₂CO₃ al 2 % en NaOH 0.1N, 0.01 mL de una solución de tartrato de Na-K al 2 % y 0.01 mL de una solución de CuSO₄ al 1 %), se homogeneizaron e incubaron por 10 min a temperatura ambiente.

Al término del tiempo de incubación, se adicionaron 25 μ L de reactivo de Folin (ácido fosfomolibdotúngstico) disuelto en agua (1:1) y se incubaron por 30 min a

temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 540 nm y se obtuvo el contenido de proteína en el homogenizado, mediante la ecuación:

$$\text{proteína } (\mu\text{g/ml}) = \left(\frac{A_{540\text{nm}} - 0.05012}{0.0028} \right) 40$$

Se ajustó el contenido de proteína a 2.666 mg/mL con buffer de fosfatos (9.5 mM, pH= 7.4).

Tercera etapa. Inducción de la oxidación con FeSO₄.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en baño de hielo. Se colocaron por duplicado para cada muestra, 375 μL de sobrenadante del homogenizado de cerebro de rata (2.666 mg prot/mL) en tubos eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se agregaron 50 μL de una solución 20 μM de EDTA en buffer de fosfatos y enseguida se adicionaron 25 μL del extracto acuoso y etanólico (10, 17.78, 31.62, 56.23 y 100 ppm) y de las referencias quercetina (0.32, 0.56, 1, 1.78, 3.16, 5.62 y 10 μM) y α -tocoferol (0.1, 0.32, 1, 3.16, 10, 31.62 y 100 μM) y se incubaron 30 min a 37 °C con agitación.

Terminado el tiempo de la primera incubación se agregaron 50 μL una solución de FeSO₄ 100 μM y se incubaron por segunda vez durante una 1 h a 37 °C con agitación. Finalizando el segundo tiempo de incubación se añadieron 500 μL de reactivo ácido tiobarbitúrico (ácido tiobarbitúrico al 0.5 % disuelto en NaOH 0.05N:ácido tricloroacético al 30 % [1:1]) y se colocaron en baño de hielo por 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 12,000 rpm a temperatura ambiente por 5 min y posteriormente se incubaron 30 min en baño de agua a 80 °C. En la Tabla A1.1. del anexo A1 se observan los volúmenes de las soluciones utilizados para cada experimento.

Pasado el tiempo de incubación a 80 °C se tomaron por duplicado 200 μL de cada tubo y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector Elx 808 Bio-Tek. Se estimó la IC₅₀ de los extractos y las referencias.

5.7. Evaluación de la actividad citotóxica del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2)

La actividad citotóxica de los extractos en líneas celulares de cáncer humano se determinó en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la UNAM mediante el método de sulforrodamina B (SRB), basado en la medición de la absorbancia de células cancerosas tratadas con el colorante aniónico SRB, que se une electrostáticamente a proteínas aniónicas precipitadas con ácido tricloroacético.

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640, suplementado con 10 % de suero fetal de bovino, 100 UI/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B. Las líneas se conservaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Se colocaron 100 µL de cada cultivo (U251: glía sistema nervioso central, K562: leucemia, MCF-7: mama, PC-3: próstata, HCT-15: colon y SKLU: pulmón) en una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. Una vez terminado el periodo de adaptación se adicionaron 100 µL de cada extracto (50 µg/mL) y se incubaron por un período de 48 h a 37 °C.

Terminadas las 48 h de incubación, las células se precipitaron con 50 µL de una solución acuosa de ácido tricloroacético al 50 % p/v y se incubaron durante 60 min a 4 °C. Después, la placa se lavó con agua desionizada y se dejó secar, los sobrenadantes se descartaron. Las células se trataron con 100 µL de una solución de SRB al 0.4% p/v en ácido acético 1%, por 30 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente se lavó la placa con ácido acético 1% y se dejó secar a temperatura ambiente. Realizado esto, las células se solubilizaron con una solución 10 mM de base Tris no amortiguada. Se determinó la absorbancia a 515 nm, en un lector Elx 808 Bio-Tek.

La citotoxicidad se expresó como porcentaje de inhibición de crecimiento celular y se calculó con la ecuación:

$$\%IC = 100 - [B/A \times 100]$$

en donde:

A = absorbancia de células sin tratar

B = absorbancia de células tratadas con extracto

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *H. glomeratum*

Para la obtención de los flavonoides campferol y quercetina, se llevaron a cabo las extracciones de *H. glomeratum*, con H₂O, EtOH y MeOH respectivamente. Los rendimientos de los extractos obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento de los extractos de *H. glomeratum*.

Extracto	Rendimiento (% _{peso seco})	
	Lote 1	Lote 2
Acuoso	15.33	24.64
Etanólico	6.37	13.62
Metanólico	7.33	23.70

Se observó que los rendimientos más altos correspondieron a los extractos acuosos, y los más bajos a los etanólicos, para ambos lotes. Esto puede ser debido a que del extracto acuoso además de extraer flavonoides, entre otros componentes, se extraen azúcares presentes en la planta (Bruneton, 2001). No obstante, en el lote 1, el extracto acuoso presentó solamente 1% de diferencia frente al extracto metanólico de ese mismo lote.

Entre el rendimiento del extracto etanólico y el metanólico del lote 1, existe una diferencia de 0.96 %, siendo el extracto metanólico el de mejor rendimiento frente al etanólico. Del mismo modo, el extracto etanólico del lote 2 presentó un menor rendimiento (cerca del 10 %) frente al extracto metanólico del lote 2.

El rendimiento del extracto metanólico de *H. glomeratum* del lote 1 (7.33 %) fue muy similar al rendimiento obtenido por Calzada, Alanís, 2007 (7.48 %) y menor al obtenido por Calzada, *et al.*, 1995 (9.66 %) para este mismo extracto. Sin embargo el extracto metanólico del lote 2 tuvo un mayor rendimiento (23.7%), comparado

con todos los demás. Respecto a los resultados obtenidos, la edad de la planta puede ser un factor en la diferencia del rendimiento de los extractos.

6.2. Detección cualitativa de los flavonoides campferol y quercetina en extractos de *H. glomeratum*

En las CCF se observó un Rf muy similar para campferol (0.72) y quercetina (0.71), que se emplearon como referencias. Se presentaron compuestos con un Rf similar al de las referencias en el extracto metanólico y etanólico de ambos lotes, como se puede evidenciar en la figura 6.

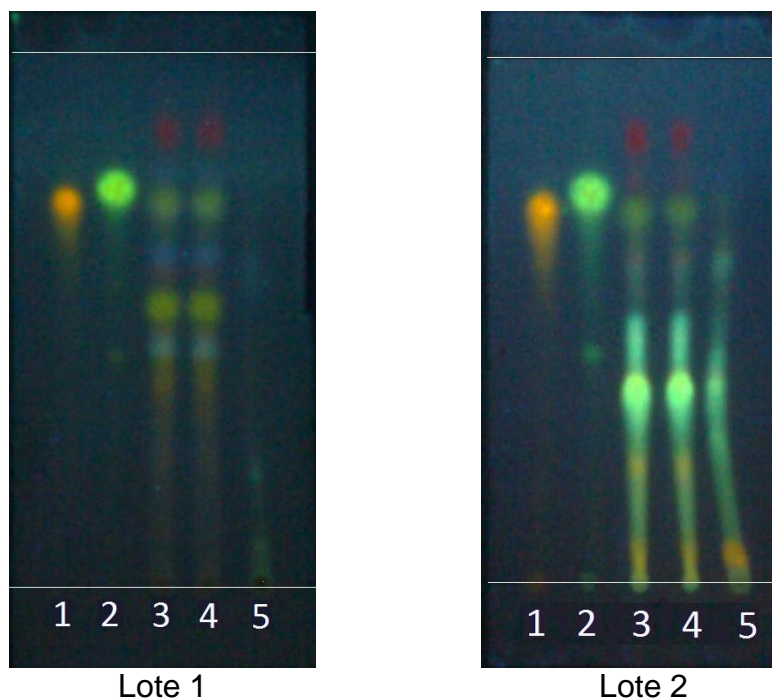


Figura 6. Perfil cromatográfico de los extractos de *H. glomeratum*.
1) Quercetina, 2) Campferol, 3) Extracto metanólico, 4) Extracto etanólico y
5) Extracto acuoso; Sistema de elución AcOEt:MeOH:H₂O [100:16.5:13.5],
Rociados con AAD

En el extracto metanólico y etanólico del lote 1 (figura 6) se detectó una marca, que puede ser un compuesto o una mezcla de compuestos del tipo flavonoide, cuyo Rf de 0.71 es el mismo que presentó el estándar de quercetina. En el extracto metanólico y etanólico del lote 2 (figura 6) se observa una marca con Rf de 0.69, el cual es muy parecido a los de las referencias, en el extracto acuoso se aprecia esta marca de una manera muy tenue.

Al ser muy similares los Rf's de las referencias, no se puede asegurar que esta marca se deba a la presencia de quercetina o de campferol en el extracto metanólico y etanólico, pero si es debida a la presencia de flavonoides; ya que la fluorescencia que presenta la marca en los extractos es semejante a la que presentan las referencias, como se observa en la figura 6.

Además, en los tres extractos de los dos lotes diferentes se observaron distintos compuestos del tipo flavonoides por su fluorescencia anaranjada y amarilla, la cual se debió a la solución AAD con la que se roció la cromatoplaca, que proporciona fluorescencia naranja o amarilla si se trata de quercetina o sus glicósidos, y fluorescencia amarilla o amarilla-verde si se trata de campferol o sus glicósidos (Wagner, 1984).

El perfil cromatográfico de ambos lotes es diferente a pesar de que se trata de la misma especie de planta, no obstante, este cambio en la composición puede deberse a la variabilidad de la planta o a la procedencia de la misma.

6.3. Cuantificación de campferol y quercetina en de extracto metanólico *H. glomeratum*

En la figura 7 se muestra el espectro que se obtuvo del análisis por HPTLC del extracto metanólico del lote 1 y en la figura 8 el espectro del extracto metanólico hidrolizado del lote 2. La presencia de campferol se detectó a 400 nm y presentó un Rf de 0.51 en el sistema de elución DCM:AcOEt [4:6]. En la figura 9 se muestra el espectro del análisis por HPTLC del extracto metanólico del lote 1, para la detección de quercetina a 400 nm, el cual presentó un Rf de 0.45 en un sistema de elución de DCM:AcOEt [1:9]. Los sistemas de elución se eligieron, porque con ellos se obtuvo una mejor separación y definición de los compuestos a cuantificar.

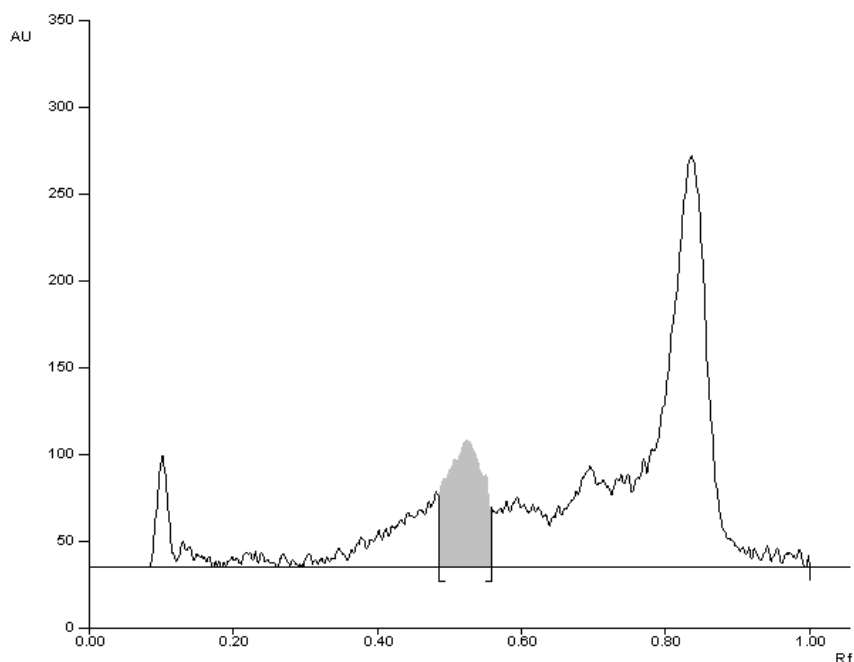


Figura 7. Espectro de HPTLC para detección de campferol en extracto metanólico (lote 1), a 400 nm.

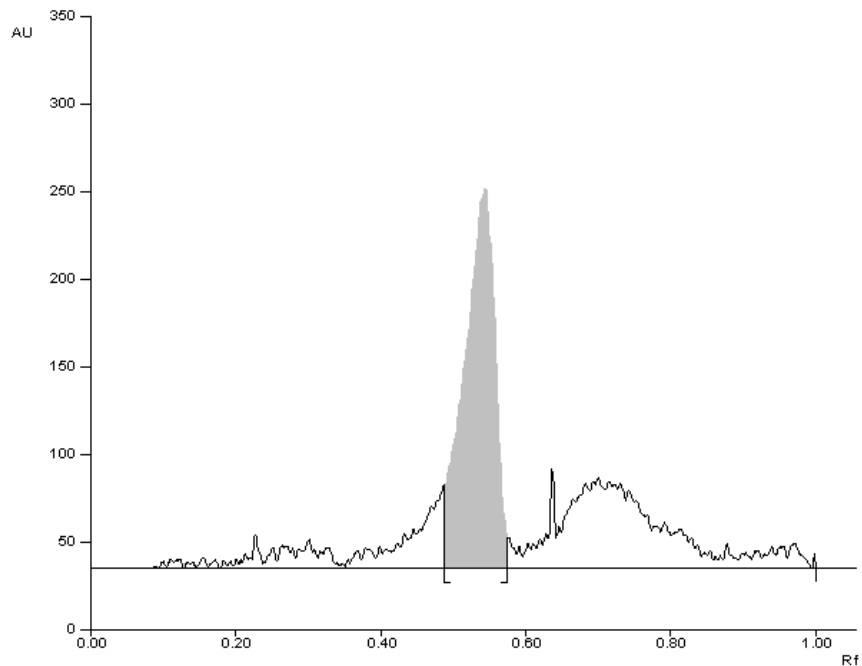


Figura 8. Espectro de HPTLC para detección de campherol en extracto metanólico hidrolizado (lote 2), a 400 nm.

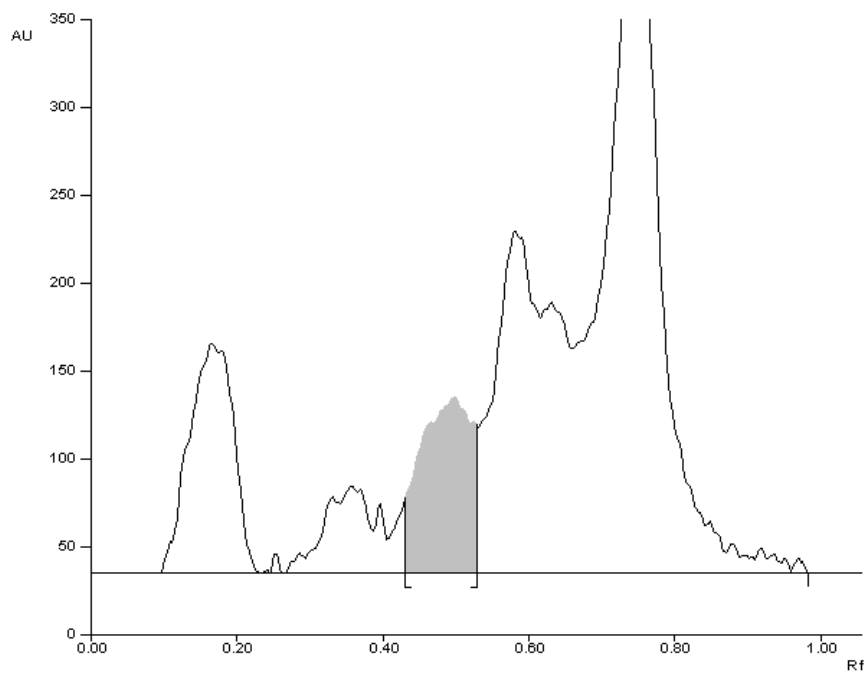


Figura 9. Espectro de HPTLC para detección de quercetina en el extracto metanólico (lote 1), a 400 nm.

En la Tabla 7 se observan los datos del área bajo la curva dados en unidades arbitrarias (UA), obtenidos mediante el análisis en HPTLC del campferol y la quercetina en los extractos metanólicos y los extractos metanólicos hidrolizados de *H. glomeratum*.

Tabla 7. Datos del área bajo la curva de campferol y quercetina en extractos metanólicos y extractos metanólicos hidrolizados, de *H. glomeratum*.

MUESTRA	Campferol	Quercetina
	Área (UA)	Área (UA)
Extracto metanólico <i>H. glomeratum</i> (lote 1)	3479.2	3824.1
Extracto metanólico <i>H. glomeratum</i> (lote 2)	N. D.	N. D.
Extracto metanólico <i>H. glomeratum</i> hidrolizado (lote 1)	N. D.	N. D.
Extracto metanólico <i>H. glomeratum</i> hidrolizado (lote 2)	10335.05	N. D.

N. D.: No detectable

Los datos mostrados son el resultado del promedio de 2 ensayos por separado.

El porcentaje de campferol y quercetina en *H. glomeratum* que se obtuvo mediante la interpolación de datos en las curvas de calibración y un tratamiento posterior (anexo A3), se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de campferol y quercetina en *H. glomeratum*.

MUESTRA	Campferol (% p/p)	Quercetina (% p/p)
Extracto metanólico <i>H. glomeratum</i> (lote 1)	$6.5 \times 10^{-3} \pm 5.7 \times 10^{-4}$	$9.3 \times 10^{-3} \pm 4.5 \times 10^{-4}$
Extracto metanólico <i>H. glomeratum</i> (lote 2)	N. D.	N. D.
Extracto metanólico hidrolizado de <i>H. glomeratum</i> (lote 1)	N. D.	N. D.
Extracto metanólico hidrolizado de <i>H. glomeratum</i> (lote 2)	$1.77 \pm 3.36 \times 10^{-3}$	N. D.

N. D.: no detectable

En el extracto metanólico del lote 1 se detectaron el campferol y la quercetina en su forma libre, una vez que se llevó a cabo la hidrólisis no se detectó ninguno de

los flavonoides. Estos resultados son distintos para el caso del extracto metanólico del lote 2, en el cual no se detectó la presencia de campferol y quercetina libre, una vez que se realizó la hidrólisis ácida del extracto se observó la presencia de campferol, pero no de quercetina (Tabla 7).

Este comportamiento puede deberse a que el campferol en el extracto del lote 2 se encuentra en forma glicosilada y es liberado a su forma aglicona mediante la hidrólisis ácida, además se observa que la quercetina no está presente de ninguna de las dos formas. En el extracto del lote 1, se detectaron ambos flavonoides en su forma aglicona. Sin embargo, una vez que se llevó a cabo la hidrólisis ácida no se detectaron ninguno de éstos (Tabla 8), siendo una posibilidad la descomposición de éstos compuestos por efecto del tratamiento térmico aplicado durante la hidrólisis ácida, como lo menciona Rodríguez G., *et al.*, 2010. De acuerdo a los datos obtenidos también se puede relacionar a los flavonoides glicosilados con una mejor estabilidad frente a tratamientos térmicos y ácidos, a comparación de los flavonoides como agliconas, de lo contrario se hubiese podido detectar para su cuantificación al campferol y la quercetina del extracto metanólico del lote 1, después de la hidrólisis ácida.

El porcentaje de campferol (6.5×10^{-3} %) y quercetina (9.3×10^{-3} %) en el extracto metanólico de *H. glomeratum* del lote 1 (Tabla 8) fue mayor en ambos casos, que el reportado por Calzada, *et al.*, 1995, quién obtuvo el campferol y la quercetina de *H. glomeratum* en 3.9×10^{-3} % y 3.8×10^{-3} % respectivamente. Además, se observó que para Calzada *et al.*, 1995, la concentración de los dos flavonoides fue muy similar entre ellos, caso distinto al obtenido en este trabajo; puesto que la quercetina se presentó en mayor cantidad en casi una tercera parte con respecto al campferol.

Por otra parte se observó una relación inversa en lo que respecta al rendimiento del extracto metanólico del lote 1 (Tabla 6) y la concentración de los flavonoides en *H. glomeratum*, en este trabajo (Tabla 8) y Calzada, *et al.*, 1995; ya que en este trabajo se obtuvo un menor rendimiento para el extracto metanólico (7.33 %) pero

una mayor concentración de campferol (6.5×10^{-3} %) y quercetina (9.3×10^{-3} %), a diferencia de Calzada, *et al.*, 1995, que mostró un mayor rendimiento para el extracto metanólico (9.66 %), pero una menor concentración de los flavonoides campferol (3.9×10^{-3} %) y quercetina (3.8×10^{-3} %) en *H. glomeratum*.

Esta diferencia en la concentración de los flavonoides, pudo presentarse por el lugar de la recolección puesto que estos compuestos, entre otros, varían de acuerdo al origen geográfico, la época de crecimiento o el tiempo de almacenamiento (Dae-Ok, *et al.*, 2003); ya que las plantas que se emplearon en este estudio fueron colectadas en diferentes lugares (Apizaco, Tlaxcala y pasaje de la catedral del D.F.) y con la que trabajó Calzada *et al.*, 1995 fue colectada en Chiapas.

6.4. Separación é identificación de los flavonoides campferol y quercetina en el extracto metanólico de *H. glomeratum*

La separación del campferol y quercetina en el extracto metanólico de *H. glomeratum* (lote 1) se realizó mediante cromatografía en columna, de la cual se obtuvieron 8 fracciones como se puede observar en Tabla 9, no se llevó a cabo con el extracto metanólico del lote 2, porque no se observó la presencia de los flavonoides libres. Además de que en la detección cualitativa por CCF se observaron marcas más definidas lo cual podría ayudar a la separación de los compuestos presentes.

Tabla 9. Obtención de fracciones del extracto metanólico de *H. glomeratum* (lote 1), para identificación de campferol y quercetina.

Eluyente	Proporción (%)	No. Fracciones	Fracciones reunidas
AcOEt	100	1-63	1-3, 4-8, 9-11
AcOEt:MeOH	99:1	64-113	12-51, 52-66
AcOEt:MeOH	98:2	114-118	67-113
AcOEt:MeOH	97:3	119-120	114-124
AcOEt:MeOH	96:4	121-134	125-134

Mediante la CCF que se realizó con las fracciones reunidas, se decidió utilizar la fracción cuatro para realizar experimentos de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C), debido a la presencia de compuestos con Rf y fluorescencia similar a los flavonoides de referencia campferol y quercetina, y presenta una menor cantidad de compuestos a diferencia de las siguientes fracciones, como se visualiza en la figura 10, aunado a esto, se muestra una mejor separación de las marcas de interés en la fracción 4 (carril 6) con respecto a las de la fracción 3 (carril 5).

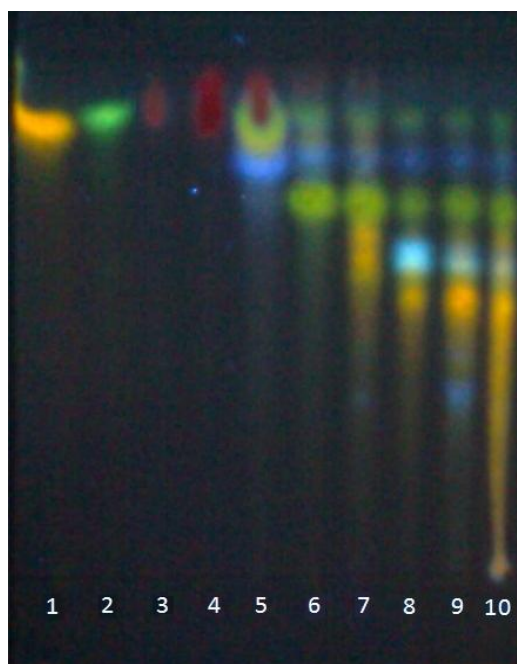


Figura 10. CCF de fracciones obtenidas de la columna cromatográfica del extracto metanólico (lote 1); rociada con AAD;
1) Quercetina; 2) Campferol; 3) Frac. 1; 4). Frac. 2; 5) Frac. 3; 6) Frac. 4;
7) Frac. 5; 8) Frac. 6; 9) Frac. 7; 10) Frac. 8;
Sistema de elución AcOEt:MeOH:H₂O [100:16.5:13.5]

En la interpretación del espectro de RMN-¹H (anexo A4), se obtuvieron señales entre 6 y 8 ppm que son representativas de compuestos fenólicos, del mismo modo se obtuvieron señales entre 3 y 4 ppm indicativas de la presencia de azúcares. En el espectro de RMN-¹³C se obtuvieron señales correspondientes a la estructura base de los flavonoides y de azúcares (Tabla 10). El análisis del

espectro de RMN-¹³C (anexo A5) se realizó con apoyo de datos espectroscópicos tomados de Markham, *et al.*, 1978.

La información obtenida mediante el análisis en CCF, en conjunto con el análisis de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, permitieron discernir la presencia de compuestos flavonoides y de azúcares en esta fracción analizada.

En las demás fracciones que se observan en la figura 10, se puede visualizar la presencia de más compuestos de este tipo con un carácter más polar, como componentes glucosilados. Del mismo modo en el análisis por CCF mostradas en las figuras 6, se observa la presencia de este tipo de compuestos en los extractos.

Tabla 10. Datos espectroscópicos y señales obtenidas de la interpretación del espectro de RMN-¹³C.

	Datos de Markham, <i>et al.</i> , 1978					Señales experimentales
	Campferol (C)	Quercetina (Q)	C-3-O-glu	Q-3-O-glu	Q-3-O-rha	RMN- ¹³ C
C-2	146.8	146.9	156.3	156.5	156.4	144.5
C-3	135.6	135.5	133.0	133.7	134.4	133.1
C-4	175.9	175.8	177.4	177.6	177.7	177.4 y 175.7
C-5	160.7	160.7	161.1	161.3	161.2	160.9 y 161
C-6	98.2	98.2	98.7	98.8	98.6	97.9
C-7	163.9	163.9	164.1	164.2	164.0	163.9
C-8	93.5	93.3	93.6	93.6	93.5	92.8
C-9	156.2	156.2	156.3	156.5	157.0	152.2
C-10	103.1	103.1	104.1	104.2	104.2	101.9
C-1'	121.7	122.1	121.0	121.4	121.0	120.7
C-2'	129.5	115.3	130.7	115.3	115.4	115.7 y 130.1
C-3'	115.4	145.0	115.0	144.8	145.1	114.7 y 144.5
C-4'	159.2	147.6	159.8	148.5	148.3	159.5 y 144.5
C-5'	115.4	115.6	115.0	116.5	115.8	115.7
C-6'	129.5	120.0	130.7	121.6	121.0	130.1 y 120.7
C-1''			101.4	101.4	101.9	101.9
C-2''			74.2	74.3	70.4	73.8 y 69.7
C-3''			76.5	76.8	70.6	76.4
C-4''			70.1	70.3	71.5	70.3
C-5''			77.2	77.5	70.1	76.4 y 70.3
C-6''			61.0	61.3	17.3	62.0 y 17.4

glu: glucosa; rha: ramnosa

6.5. Evaluación de la actividad del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2) sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

La técnica de DPPH es una de las más utilizadas para la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos o compuestos (Prior, *et al.*, 2005). En esta determinación se utilizaron como estándares quercetina y α -tocoferol, porque ambos son de origen natural y presentan actividad antioxidante (Martínez, *et al.* 2002; Prior, 2003; Tapas, *et al.*, 2008; Lee, *et al.* 2004).

Mediante este ensayo se evaluó la capacidad de capturar el radical DPPH únicamente de los extractos acuoso y etanólico de *H. glomeratum* del lote 2, debido a la disponibilidad de extracto. Los valores de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los estándares y los extractos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Actividad sobre el radical DPPH.

Muestra	Concentración (ppm)	Absorbancia (515 nm)	% reducción del radical DPPH	IC ₅₀ (ppm)
DPPH 100 μ M	-	0.830 \pm 0.032	0	-
Quercetina (n=4)	0	0.741 \pm 0.018	-	3.68 \pm 0.16
	0.72	0.665 \pm 0.017*	10.37 \pm 0.32	
	0.96	0.642 \pm 0.018**	13.46 \pm 0.49	
	1.28	0.603 \pm 0.019**	18.80 \pm 0.69	
	1.70	0.559 \pm 0.018**	24.70 \pm 0.92	
	2.27	0.509 \pm 0.016**	31.42 \pm 1.07	
	3.02	0.419 \pm 0.014**	43.49 \pm 1.54	
	4.03	0.313 \pm 0.018**	57.75 \pm 2.28	
	5.19	0.181 \pm 0.024**	75.55 \pm 3.26	
	7.17	0.107 \pm 0.003**	85.53 \pm 0.28	
a-tocoferol (n=4)	0	0.741 \pm 0.018	-	13.67 \pm 0.45
	5.75	0.609 \pm 0.026**	17.96 \pm 1.74	
	7.66	0.553 \pm 0.027**	25.51 \pm 2.02	
	10.21	0.488 \pm 0.02**	34.31 \pm 1.80	
	13.62	0.400 \pm 0.019**	46.13 \pm 1.98	
	18.16	0.284 \pm 0.017**	61.65 \pm 2.19	
	24.22	0.135 \pm 0.009**	81.76 \pm 1.11	
	31.93	0.106 \pm 0.007**	85.79 \pm 0.63	
	43.07	0.106 \pm 0.007**	85.78 \pm 0.58	

Extracto acuoso (n=3)	10	0.756±0.027	8.88±0.38	57.15±1.96
	17.78	0.705±0.028*	15.09±0.27	
	31.62	0.610±0.028**	26.58±0.63	
	56.23	0.456±0.028**	45.12±1.33	
	100	0.195±0.027**	76.63±2.31	
Extracto etanólico (n=3)	10	0.747±0.023	10.00±0.68	51.56±2.02
	17.78	0.688±0.030*	17.09±0.64	
	31.62	0.584±0.032**	29.70±1.20	
	56.23	0.415±0.033**	50.11±2.07	
	100	0.146±0.025**	82.58±2.31	

Los valores representan el promedio de experimentos independientes \pm error estándar de la media. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (0).

Se observó que los estándares quercetina y α -tocoferol tuvieron mayor capacidad antioxidante que los extractos de *H. glomeratum*, pues se requirió una menor concentración de esos compuestos para poder reducir al 50 % la concentración inicial del radical DPPH. Sin embargo, entre el extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* se observó una capacidad antioxidante similar (CI_{50} : 57.15±1.96 y 51.56±2.02 ppm, respectivamente) (Tabla 11).

En un estudio realizado por García, *et al.*, 2010, se observó que el extracto metanólico de orujo de uva presentó una IC_{50} del DPPH de 24 $\mu\text{g/mL}$, poder antioxidante mayor al que presentaron ambos extractos de *H. glomeratum*. Sin embargo, Lim, *et al.*, 2007 evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de diferentes frutas como la guayaba, la papaya, la naranja y el plátano, en donde obtuvo la IC_{50} de cada una de ellas (1710, 3500, 5400 y 13400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Se observó que los extractos de *H. glomeratum*, presentaron un mayor efecto antioxidante en comparación con estos datos reportados por Lim, *et al.*, 2007.

Estos resultados son de relevancia, puesto que los extractos de *H. glomeratum* presentaron mayor capacidad para reducir el radical libre DPPH sobre los extractos de algunas frutas.

Las frutas son ampliamente consumidas porque además de proporcionar nutrientes constituyen una fuente de flavonoides para los seres humanos, cuyo consumo, se ha relacionado inversamente con las enfermedades crónico-degenerativas.

6.6. Evaluación del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2) en la inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata inducida con FeSO₄

Se evaluó la capacidad de los extractos para inhibir la peroxidación de lípidos en cerebro de rata, mediante el ensayo de TBARS. Los valores de la IC₅₀ de las referencias y las muestras se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Actividad en la inhibición de la peroxidación lipídica.

Muestra	Concentración (ppm)	TBARS (ppm/mg prot.)	% inhibición de peroxidación	IC ₅₀ (ppm)
Quercetina	Basal control	0.379±0.045	-	0.452±0.009
	0.10	9.649±0.748	-	
	0.17	9.129±0.624*	5.23±1.17	
	0.30	8.582±0.593*	10.93±1.20	
	0.54	6.989±0.735**	27.88±2.05	
	0.96	3.598±0.330**	62.68±1.93	
	1.70	1.390±0.168**	85.23±2.81	
	3.02	0.492±0.120**	94.90±1.13	
		0.418±0.127**	95.65±1.24	
α-tocoferol	Basal control	0.200±0.011	-	2.92±0.93
	0.04	6.589±0.213	-	
	0.14	6.283±0.188*	4.62±0.57	
	0.43	6.048±0.242*	8.26±1.31	
	1.36	5.211±0.332*	21.13±2.56	
	4.31	3.676±0.569**	44.84±6.74	
	13.62	2.725±0.335**	59.00±3.71	
	43.07	1.849±0.319**	72.3±3.87	
		1.408±0.364**	79.09±4.79	
Extracto acuoso	Basal	0.26±0.01	-	51.25±2.75

	FeSO4	11.30±0.27	-	
	10	10.42±0.08*	7.72±2.71	
	17.78	10.07±0.25**	10.77±3.10	
	31.62	8.70±0.25**	22.86±3.96	
	56.23	4.81±0.23**	57.36±2.94	
	100	1.79±0.11**	84.12±1.09	
	Basal	0.26±0.01	-	
	FeSO4	9.65±0.18	-	
	10	7.82±0.02**	18.92±1.78	
Extracto etanólico	17.78	7.07±0.01**	26.76±1.51	34.26±0.91
	31.62	5.44±0.19**	43.61±1.71	
	56.23	2.72±0.15**	71.79±1.31	
	100	1.09±0.07**	88.77±0.61	

Los valores representan el promedio de 3-5 experimentos independientes \pm error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Ambos extractos de *H. glomeratum* presentaron menor actividad y por lo tanto se requirió mayor concentración para inhibir la peroxidación lipídica en comparación con los estándares quercetina y α -tocoferol (0.45 y 2.92 ppm respectivamente). El extracto etanólico mostró mayor actividad para inhibir la peroxidación de los lípidos en comparación al extracto acuoso (IC_{50} : 35.26±2.75 y 51.25±2.75 ppm respectivamente), no obstante, a una concentración de 100 ppm ambos extractos exhibe una actividad para la inhibición de la peroxidación lipídica similar entre ellos (84.12 % y 88.77 %, respectivamente) y mayor al 80 % (Tabla 12).

Por otro lado, el extracto etanólico y el acuoso presentaron una mayor actividad antioxidante en TBARS, a comparación de la ciruela probada por Rivas, García, 2002, en donde reportó una IC_{50} de 85 μ g para la peroxidación lipídica medida mediante TBARS; siendo los flavonoides algunos de los compuestos que contiene esta fruta. Estos efectos antioxidantes están relacionados con la compleja mezcla de este tipo de compuestos como lo menciona Leong, Shui, 2002.

Esta confrontación es de importancia, ya que se observa una mayor eficiencia en la actividad antioxidante por parte de los extractos de *H. glomeratum* con respecto a la ciruela, para inhibir la peroxidación de una macromolécula como los lípidos,

que están presente en los seres humanos y que al descomponerse mediante peroxidación son relacionados con enfermedades cardiovasculares.

Los extractos de *H. glomeratum* evaluados en ambas pruebas (inhibición de la peroxidación lipídica y reducción del radical DPPH), demostraron tener actividad antioxidante. El extracto acuoso mostró una IC₅₀ similar en ambos ensayos, mientras que el extracto etanólico mostró una menor IC₅₀ para el caso de la inhibición de peroxidación lipídica en comparación con la actividad sobre el radical DPPH, lo cual pudo deberse a que los flavonoides presentes en el extracto etanólico tienen una menor respuesta para capturar radicales libres comparada con la capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos. De los dos extractos el que exhibió mejor actividad antioxidante fue el extracto etanólico y basándose en el análisis cualitativo por CCF, pudo deberse a la diferencia en cuanto a la composición química del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2).

6.7. Evaluación de la actividad citotóxica del extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2)

Se evaluó la actividad citotóxica de los extractos acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2) mediante el método de SRB, en seis líneas de células cancerosas (U251: glía SNC, K562: leucemia, MCF-7: mama, PC-3: próstata, HCT-15: colon y SKLU-1: pulmón). En la Tabla 13 se presenta el efecto citotóxico del extracto acuoso y del extracto etanólico.

Se observó que ambos extractos presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento celular menor al 50% en todas las líneas a la concentración utilizada de 50 µg/mL. De las líneas celulares, las que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron la línea de próstata (43.32 %) por efecto del extracto etanólico y la línea celular de pulmón (43.50 %) por acción del extracto acuoso.

Tabla 13. Efecto citotóxico de los extractos de *H. glomeraum* (lote 2) (50 µg/mL).

Muestras	% inhibición del crecimiento celular					
	U251 (SNC)	PC-3 (próstata)	K562 (leucemia)	HCT-15 (colon)	MCF-7 (mama)	SKLU-1 (pulmón)
Extracto acuoso	ND	ND	22.94	1.88	36.65	43.50
Extracto etanólico	21.19	43.32	39.56	30.94	14.91	14.00

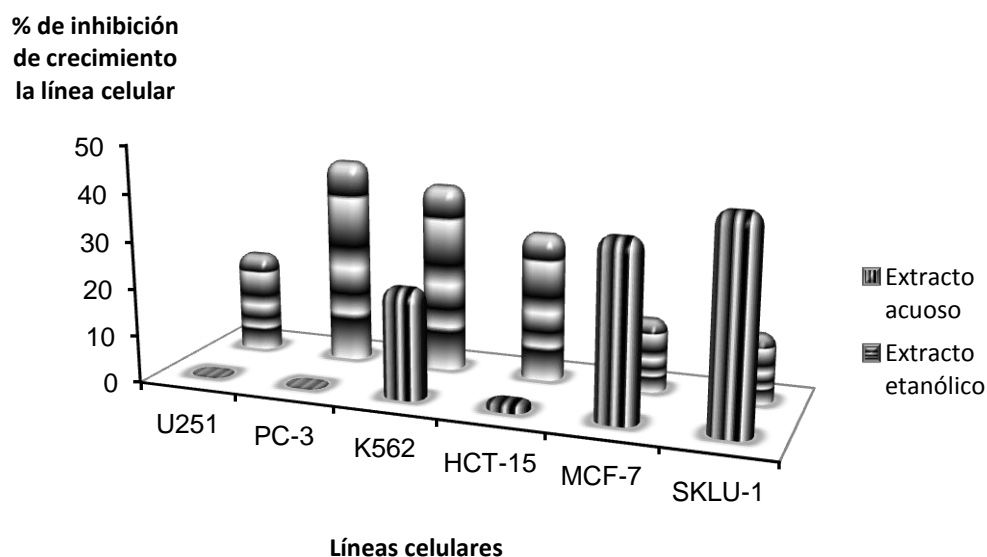


Figura 11. Efecto citotóxico de los extractos de *H. glomeraum* (lote 2) (50 µg/mL)

El extracto etanólico presentó el menor porcentaje de inhibición en las líneas celulares de pulmón (14.00 %) y de mama (14.91 %), a diferencia del extracto acuoso que mostró sus mayores porcentajes de inhibición ante estas dos líneas (43.50 % y 36.65 % respectivamente). Por otro lado el extracto acuoso exhibió un porcentaje muy bajo para el caso de células de colon y ningún porcentaje de inhibición ante las líneas celulares del sistema nervioso central y de próstata.

Estos resultados representan la primera evaluación para observar el efecto que presentan los extractos, no obstante, se requiere de un análisis más a fondo para determinar si presentan un afecto específico para células cancerígenas y determinar la citotoxicidad *in vivo*.

6.8. Propuesta para la aplicación de los extractos de *H. glomeratum* como nutracéutico

Los extractos de *H. glomeratum* de acuerdo a los resultados obtenidos, presentaron efecto antioxidante el cual se le puede atribuir a la mezcla de flavonoides que presentan.

Los compuestos antioxidantes, como ya se mencionó, puede reducir el riesgo de diferentes enfermedades; de esta manera, los extractos al presentar actividad antioxidante (en algunos casos mayor a la que proporcionan extractos de distintas frutas) podrían ser considerados como una opción de nutracéutico ó para incluirlos en alimentos procesados y obtener alimentos con los compuestos bioactivos, que brindarían un efecto benéfico al consumidor, como fuente de antioxidantes.

Tomando en cuenta lo planteado anteriormente se propone la utilización del extracto acuoso o etanólico en bebidas de sabores, proporcionando efectos preventivos en enfermedades crónico-degenerativas, mediante la actividad antioxidante que presentan, debido a la solubilidad total o parcial que presentan ambos extractos en agua.

Las características en cuanto al empaque del producto terminado podrían ser adecuadas para mantener la estabilidad de los compuestos flavonoides, reduciendo la exposición al oxígeno y a la luz, almacenando y conservando el producto a temperatura ambiente o a temperatura de refrigeración, poniendo en riesgo lo menos posible la actividad antioxidante.

Por otro lado, se tendrían que realizar pruebas sensoriales posteriores al alimento terminado, para determinar sus características organolépticas y la aceptación de los consumidores.

Aunado a esto, también se tendrían que llevar a cabo determinaciones como polifenoles totales y flavonoides totales para determinar la concentración de extracto que se requeriría agregar a la bebida.

7. CONCLUSIONES

- Se lograron detectar compuestos flavonoides en los extractos metanólico y etanólico del lote 1 y 2 de *H. glomeratum*.
- Se cuantificó campferol y quercetina como aglicona en el extracto metanólico de *H. glomeratum* del lote 1 y campferol presente como glicósido en el extracto metanólico de *H. glomeratum* del lote 2.
- Se identificó la estructura base de los flavonoides provenientes del extracto metanólico de *H. glomeratum* del lote 1 mediante RMN.
- El extracto acuoso y etanólico del lote 2 presentaron capacidad para capturar el radical DPPH con una IC_{50} 57.15 ± 1.96 y 51.56 ± 2.02 ppm respectivamente.
- El extracto acuoso y etanólico del lote 2 exhibieron capacidad para inhibir la peroxidación lipídica con una IC_{50} 51.25 y 34.26 ppm respectivamente.
- Se evaluó la actividad citotóxica del extracto acuoso y etanólico del lote 2, obteniéndose una citotoxicidad menor al 45% en todas las líneas evaluadas.
- Con base a la actividad antioxidante mostrada por el extracto acuoso y etanólico de *H. glomeratum* (lote 2), fue posible proponerlos para su uso en alimentos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Agostini R. L., Morón J. M.J., Ramón A.N. y Ayala G. A., 2004. Determinación de la capacidad antioxidante de los flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54:89-92.

Alvídrez M. A., González M. B.E., Jiménez S. Z., 2002, Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales, *Revista Salud Pública y Nutrición*. 3:1-6.

Badui D. S., *Química de alimentos*, 4^a ed., Pearson educación. México. 2006. pp. 417-419.

Barbosa E., Calzada F. and Campos R. 2007. *In vivo* anti-giardial activity of the tree flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*. 109:552-554.

Birute G. A., Juárez H. E., Sieiro O. E., Romero V. R., Silencio B. J.L., 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría*. 76:136-145.

Bruneton J., *Farmacognosia. Fitoquímica plantas medicinales*, segunda edición, Acribia. España. 2001. pp. 306-310, 314 y 315.

Calzada F., Alanís A. D., 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research*. 21:78-80.

Calzada F., López R., Meckes M. and Cedillo R. R. 1995. Flavonoids of the aerial parts of *helianthemum glomeratum*. International Journal of Pharmacognosy. 33:351-352.

Calzada F., Alanís A. D., Meckes M., Tapia C. A., Cedillo R. R., 1998. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of southern Mexico. Phytotherapy Research. 12:70-72.

Cortés R. M., Chiralt B. A. y Puente L., 2005. Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. VITAE. 12:5-14.

Cotelle N., Bernier J. C., Catteau J. P., Pommery J., Wallet J. C., Gaydou E. M. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. Free Radical & Medicine. 20:35-43.

Crozier A., Jaganath I. B. and Clifford M. N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Natural Product Reports. 26:1001–1043.

Dae-Ok Kim, Seung W. J. and Chang Y. L., 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry. 81:321-326.

Faruque A. Md., Amir Ashraf S., Ali A. F., Akhtar A. J., Siddiquee R., 2011. Nutraceutical market and its regulation. American Journal of Technology. 6:342-347.

García B., Verde S., Castro R., Chávez M., Oranday C., Núñez G., Rivas M. 2010. Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 41:28-36.

Grotewold E., The science of flavonoids, Springer, USA, 2006. pp 218.

Harborne J. B., 1965. Plant polyphenols-XIV. Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry*. 4:107-120.

Harborne J. B., *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman & Hall, 3^a edition, 1998, pp. 74, 76.

Harbourne N., Marete E., Jacquier J. C., O'Riordan D., 2011. Stability of phytochemicals as sources anti-inflammatory nutraceuticals in beverages – A review. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.009.

Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:572-584.

Heinrich M., Gibbons S., Williamson E. M., *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*, Churchill Livingstone ELSEVIER, UK. 2004. pp. 75.

Hollman P. C. H. and Katan M. B. 1999. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. 37:937-942.

Houston M. C. 2005. Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 47:396-449.

Inurreta S. Y., 2007. Calidad de los alimentos funcionales caso: flavonoides como antioxidantes. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.

Kalra E. K. 2003. Nutraceuticals – Definition and introduction. American Association of Pharmaceutical Scientists. 5:1-2.

Kaushik N. and Kaushik D., 2010, Functional foods: Overview and Global Regulation. 2:47-52.

Kuklinski C., Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, Ediciones OMEGA. Barcelona, España. 2000. pp. 106 y 107.

Laparra J. M. and Sanz Y. 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. Pharmacological Research. 61:219-225.

Lee J., Koo N. and Min D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3:21-33.

Leong L.P. and Shui G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry. 76:69-75.

Letenneur L., Proust L. C., Le Gouge A., Dartigues J. F. and Barberger G. P. 2007. Flavonoid Intake and Cognitive Decline over a 10-Year Period. American Journal of Epidemiology. 165:1364–1371.

Lim Y. Y., Lim T. T. and Tee J. J. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. Food Chemistry. 103:1003-1008.

Lowry O. H., Rosebroug N. J., Farr A. L. and Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. The Journal Biological Chemistry. 193:265-275.

Markham K. R., Teran B., Stanley R., Geiger H. and Mabry T. J. 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III Naturally occurring flavonoid glycosides and acylated derivatives. *Tetrahedron*. 34:1389-1397.

Martínez F. S., González G. J., Culebras J. M. y Tuñón M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 6:271-278.

Meckes M., Calzada F., Tapia C. A. and Cedillo R. R., 1999. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research*. 13:102-105.

Meckes M., Torres J., Calzada F., Rivera J., Camorlinga M., Lemus H and Rodríguez G., 1997. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research*. 11:128-131.

Meckes M., Villareal M. L. and Tortoriello J., 1995. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytotherapy Research*. 9:244-250.

Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. EC., Boelens P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition*. 74:418–25.

Nollet L. M.L., *Handbook of food analysis, Physical characterization and nutrient analysis*, Marcel Dekker, Second edition, 2004. pp 657 y 658.

Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95:351-358.

Pérez T. G. y Martínez S. G., 2001. Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 20:297-306.

Prior RL. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 78:570S-578S.

Prior R. I., Wu X. and Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:4290-4302.

Rivas G. J.C., García A. M., 2002. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 9:31-38.

Rodríguez G. M.V., Guzmán M. S.H., Abdrade E. E. y Hernández L. D., Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de jugo obtenido mediante tratamiento enzimático en zarzamora comercial (*Rubus spp.*) del estado de Michoacán. 12° Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato Gto. 2010.

Rossato J. I., Ketzer L.A., Centuriao F. B., Silva S. J., Lüdtke D. S., Zeni G., Braga A. L., Rubin M. A. and Rocha B. T., 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research*. 27:297-303.

Schinella G.R., Tournier H.A., Prieto J.M., Mordujovich de Buschiazzo P. and Ríos J.L. 2002. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences*. 70:1023–1033.

Settle F. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Prentice Hall. 1997. pp. 221 y 222, 224-227, 230-233.

Sherma J. and Fried B., Handbook of Thin Layer Chromatography, Marcel Dekker, third edition, 2003. pp. 3 y 4.

Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B., 2008. Flavonoids as nutraceuticals: A review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 7:1089-1099.

Vibrans H., 1997. Lista florística comentada de plantas vasculares silvestres en San Juan Quetzalcoapan, Tlaxcala, México. Acta Botánica Mexicana. 38:21-67.

Villar del F. Á.M., Farmacognosia general, editorial síntesis, España, 1999 pp. 214 y 215.

Wagner H., Bladt S. and Zgainski E. M., Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas, Springer-Verlag, 1984. pp. 164-165 y 172-173.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. México. medicinatradicionalmexicana.unam.mx

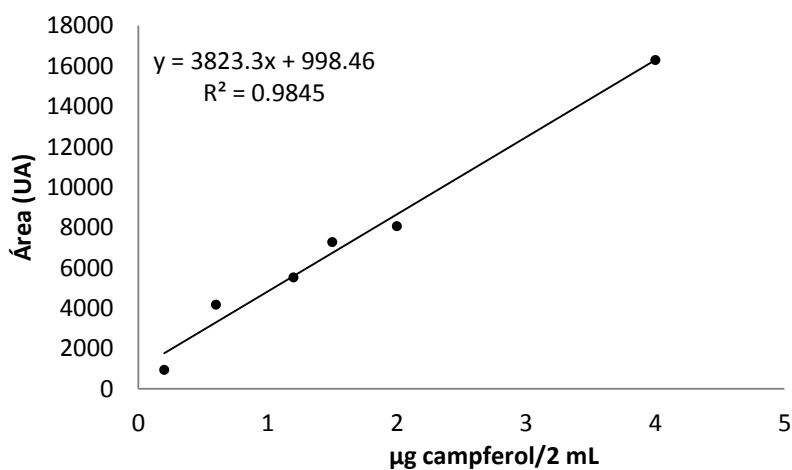
ANEXOS

A1. Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata.

Tubos para cada experimento					
Volumen	Blanco	Basal	FeSO ₄	FeSO ₄ +vehículo	Muestra
375 µl	PBS	Sobrenadante	Sobrenadante	Sobrenadante	Sobrenadante
50 µl	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA
25 µl	Vehículo	PBS	PBS	Vehículo	Muestra
50 µl	FeSO ₄	Agua	FeSO ₄	FeSO ₄	FeSO ₄
500 µl	TBA	TBA	TBA	TBA	TBA

Tabla A1.1. Volumen de las soluciones para llenar los tubos que se preparan por duplicado para cada experimento. El volumen final debe ser de 1 ml.

A2. Curvas de calibración de campferol y quercetina por HPTLC.

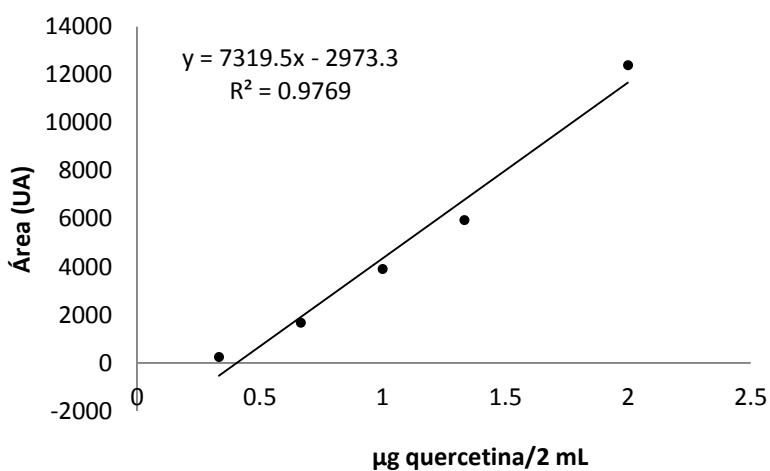


Curva de calibración de campferol

Curva de calibración para cuantificar campferol

μg campferol/ 2 mL	0.2	0.6	1.2	1.5	2	4
Área (UA)	952	4180.1	5529.8	7282.4	8070.2	16297.6

UA = Unidades Arbitrarias



Curva de calibración de quercetina

Curva de calibración para cuantificar quercetina

μg quercetina/ 2 mL	0.333	0.666	1	1.333	2
Área (UA)	248.2	1674.9	3909.8	5945.2	12390.4

UA = Unidades Arbitrarias

A3. Tratamiento de datos para la cuantificación de los flavonoides campferol y quercetina.

Ecuación a partir de la curva de calibración de campferol

$$y = 3823.3x + 998.46 \longrightarrow x = \frac{y-998.46}{3823.3}$$

$$\mu g \text{ campferol} = \frac{3639.2 - 998.46}{3823.3}$$

$$\mu g \text{ campferol} = 0.6488 \longrightarrow \mu g \text{ campferol} / \mu l = 0.3244$$

Concentración de la muestra: 10 mg/ml

Porcentaje de campferol en 10 mg de extracto metanólico $\frac{0.3244}{10} \times 100 = 3.24 \%$

Contenido de campferol en extracto metanólico total $200 \text{ mg} \times 3.24\% = 6.5 \text{ mg}$

Porcentaje de campferol en 100 g de cenicilla $\frac{0.0065g}{100g} \times 100 = 0.0065 \%$

Porcentaje de campferol en 100 g de cenicilla (lote 1): $0.0065 \% \pm 0.00057 \%$

Se lleva a cabo el mismo tratamiento para la obtención del porcentaje de campferol en cenicilla del lote 2.

Ecuación a partir de la curva de calibración de quercetina

$$y = 2973.3x + 7319.5 \longrightarrow x = \frac{y-7319.5}{2973.3}$$

$$\mu g \text{ quercetina} = \frac{3824.4 - 7319.5}{2973.3}$$

$$\mu g \text{ quercetina} = 0.9287 \longrightarrow \mu g \text{ quercetina} / \mu l = 0.4644$$

Concentración de la muestra: 10 mg/ml

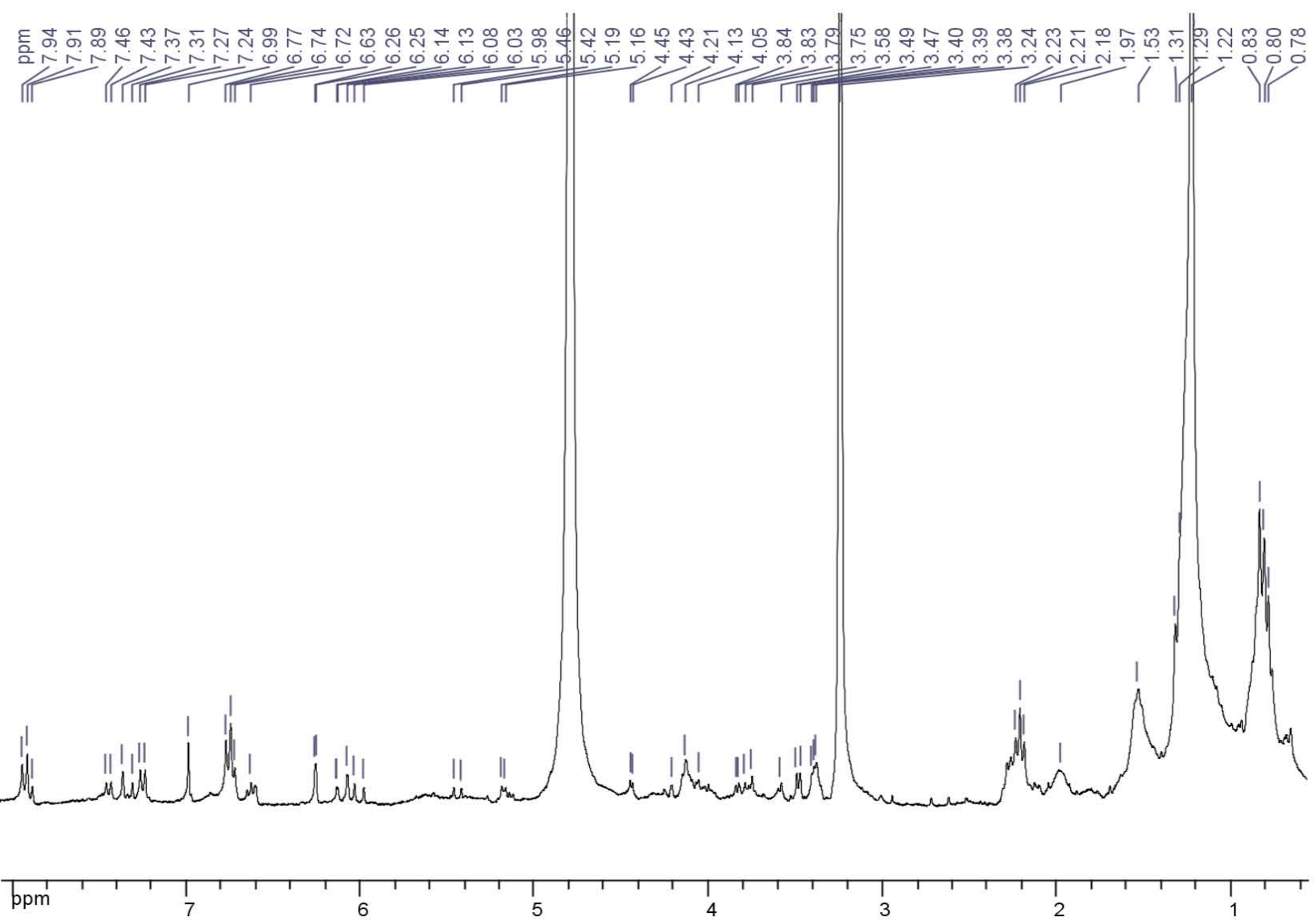
Porcentaje de quercetina en 10 mg de extracto metanólico $\frac{0.4644}{10} \times 100 = 4.64 \%$

Contenido de quercetina en extracto metanólico total $200 \text{ mg} \times 4.64\% = 9.3 \text{ mg}$

Porcentaje de quercetina en 100 g de cenicilla $\frac{0.0093g}{100g} \times 100 = 0.0093 \%$

Porcentaje de quercetina en 100 g de cenicilla (lote 1): $0.0093 \% \pm 0.00045 \%$

A4. Espectro de RMN-¹H de la fracción 4 obtenida a partir del extracto metanólico (lote 1).



A5. Espectro de RMN-¹³C de la fracción 4 obtenida a partir del extracto metanólico (lote 1).

