



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Dyssodia tagetiflora* Lag. : CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO
METANÓLICO Y SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALMA OFELIA REYNA CAMPOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
FACULTAD DE CIENCIAS. UNAM

DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Dyssodia tagetiflora* Lag. : CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO
METANÓLICO Y SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALMA OFELIA REYNA CAMPOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
FACULTAD DE CIENCIAS. UNAM

DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

JUNIO, 2018

Lic. Ivonne Ramírez Wance
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de abril de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **REYNA CAMPOS ALMA OFELIA**, con número de cuenta 308155268, con la tesis titulada "***Dyssodia tagetiflora* Lag.: Caracterización química del extracto metanólico y sus propiedades biológicas**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES**:

Presidente: DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO
Vocal: DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES
Secretario: DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
Suplente: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO
Suplente: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de junio de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c. c. p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM)

Al CONACYT por la beca recibida No. CVU: 742885

Al Proyecto PAPIIT IN218616

A mi directora de tesis

Dra. Ana María García Bores

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Patricia Guevara Fefer

Dr. José Guillermo Avila Acevedo

AGRADECIMIENTOS

Al jurado:

Dra. Gabriela Barcenas Morales

Dra. Diana Barrera Oviedo

Dra. Silvia Aguilar Rodriguez

Dr. Ignacio Peñaloza Castro

Dr. José Guillermo Avila Acevedo

Índice

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 6 |
| 2.1 Familia Asteraceae | 6 |
| 2.1.2 Química de la familia Astereaceae | 6 |
| 2.2 Tribu Tageteae | 7 |
| 2.2.1 Química de la Tribu Tageteae | 8 |
| 2.3 Género <i>Dyssodia</i> | 8 |
| 2.3.1 Morfología del género <i>Dyssodia</i> | 9 |
| 2.3.2 Química del género <i>Dyssodia</i> | 9 |
| 2.4 <i>Dyssodia tagetiflora</i> Lag. clasificación taxonómica | 10 |
| 2.4.1 Morfología de <i>Dyssodia tagetiflora</i> | 10 |
| 2.5 Poliacetilenos | 11 |
| 2.5.1 Tiofenos | 13 |
| 2.6 Terpenos | 14 |
| 2.7 Flavonoides | 15 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 17 |
| 4. PREGUNTA CIENTÍFICA | 18 |
| 5. HIPÓTESIS | 18 |
| 5.1 Composición química | 18 |
| 5.2 Antioxidantes | 18 |
| 5.3 Citotoxicidad | 18 |
| 5.4 Citoprotección | 18 |
| 6. OBJETIVOS | 19 |
| 6.1 Objetivo general | 19 |
| 6. 2 Objetivos particulares | 19 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODO | 20 |
| 7.1 Material vegetal | 20 |
| 7.2 Obtención de los extractos de <i>D. tagetiflora</i> | 20 |
| 7.3 Pruebas preliminares | 20 |
| 7.3.1 Actividad antioxidante cualitativa | 20 |
| 7.3.2 Tamizaje fitoquímico del EMDT | 20 |

| | |
|---|----|
| 7.4 Estudio químico del EMDT | 22 |
| 7.4.1 Separación del EMDT | 22 |
| 7.4.2 Análisis espectroscópico de los compuestos aislados del EMDT | 24 |
| 7.4.3 Cuantificación por HPLC de los compuestos aislados del EMDT | 24 |
| 7.4.4 Cuantificación de fenoles totales del EMDT | 25 |
| 7.4.5 Actividad antioxidante cuantitativa | 25 |
| 7.5 Pruebas biológicas | 26 |
| 7.5.1 Efecto genotóxico y citotóxico del EMDT en raíces de <i>V. faba</i> var. Minor . | 26 |
| 7.5.2 Efecto citoprotector del EMDT en raíces de <i>V. faba</i> var. Minor | 27 |
| 7.5.3 Efecto del EMDT sobre la viabilidad celular de la línea de queratinocitos inmortalizados (HaCat) | 27 |
| 8. RESULTADOS | 29 |
| 8.1 Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>D. tagetiflora</i> | 29 |
| 8.2 Pruebas preliminares | 29 |
| 8.2.1 Actividad antioxidante cualitativa de los extractos de <i>D. tagetiflora</i> | 29 |
| 8.2.2 Tamizaje fitoquímico del EMDT | 30 |
| 8.3 Estudio químico del EMDT | 31 |
| 8.3.1 Compuestos aislados del EMDT | 31 |
| 8.3.2 Cuantificación por HPLC de los compuestos aislados del EMDT | 33 |
| 8.3.3 Cuantificación de fenoles totales del EMDT | 35 |
| 8.3.4 Actividad antioxidante cuantitativa | 35 |
| 8.4 Pruebas biológicas | 37 |
| 8.4.1 Efecto genotóxico y citotóxico del EMDT en raíces de <i>V. faba</i> var. Minor . | 37 |
| 8.4.2 Efecto citoprotector del EMDT en raíces de <i>V. faba</i> var. Minor | 37 |
| 8.4.3 Efecto del EMDT en la viabilidad celular de HaCat | 38 |
| 9. DISCUSIÓN | 39 |
| 10. CONCLUSIONES | 46 |
| 11. REFERENCIAS | 47 |
| 12. APÉNDICES | 58 |
| Apéndice 1. | 58 |
| Apéndice 2. | 60 |

RESUMEN

La búsqueda de metabolitos secundarios con propiedades biológicas ha incrementado en los últimos años debido entre otras cosas, al aumento de enfermedades crónico degenerativas. El 80 % de los productos naturales conocidos actualmente derivan de plantas, sin embargo, este porcentaje representa solo el 10% del total de metabolitos secundarios que podrían contener. México es el 4° país con mayor riqueza de plantas a nivel mundial y el 2° en endemismos de especies vegetales. La familia Asteraceae es el grupo de plantas más representativo del país en cuanto a número de especies. El éxito evolutivo de dicho grupo se atribuye, en parte, a la gran variedad de productos naturales que sintetiza. Lo anterior ha sido motivo de estudio acerca de la composición química de algunos miembros de la familia, pero aún queda un gran número de especies por estudiar al respecto, como aquellas que pertenecen a la tribu Tageteae específicamente *Dyssodia tagetiflora*, endémica de México. El presente trabajo está enfocado en el aislamiento e identificación de los principales compuestos del extracto metanólico de *D. tagetiflora* (EMDT) y en evaluar sus propiedades antioxidantes, citotóxicas y citoprotectoras. El fraccionamiento del EMDT se llevó a cabo mediante diferentes técnicas cromatográficas, aislando los cuatro compuestos siguientes: hiperósido, avicularina, acetato de avicularina y quercetina, estos fueron analizados por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C y ^1H . La cuantificación de dichos compuestos en el EMDT se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) por sus siglas en inglés) siendo el de mayor concentración el hiperósido y el de menor, la quercetina. El EMDT, el hiperósido y la quercetina presentan efecto antioxidante frente al radical DPPH*. El EMDT es citoprotector previene la formación de micronúcleos inducidos por H_2O_2 en células de raíces de *V. faba*. Además, no presenta efectos genotóxicos e induce la mitosis en este modelo, tampoco presenta efectos citotóxicos sobre la línea celular HaCat. Finalmente, basado en los resultados del presente trabajo, el EMDT podría representar una fuente de compuestos quimiopreventivo.

ABSTRACT

Recently, research on biological properties of secondary metabolites has increased, because among other things, to the rise in the incidence of chronic degenerative diseases. So far plants are the main source of natural products, 80% of these compounds are vegetal origin. However, this percentage represents only 10 % of the total of secondary metabolites that could be contained by plants. Mexico is the country with the fourth largest floristic richness at the world and the second by its endemic plant species. The Asteraceae family is the most representative in Mexico by its largest number species. The evolutive success of this family is due in part of to its wide array of natural products. These has been reason for studying the chemical composition of some species of this family, but still a large number of species to study about. As those belonging to the tribe Tageteae genus *Dyssodia* sepecifically *Dyssodia tagetiflora*, endemic to Mexico. The aim of the presented study was to isolate and identify the main compounds of the methanolic extract of *D. tagetiflora* and evaluate its antioxidant, cytoprotective and cytotoxic properties. The fractionation of the EMDT was carried out by different chromatographic techniques, were isolated four compounds: hyperoside, avicularin, avicularin acetate and quercetin. They were analyzed by ¹³C and ¹H nuclear resonance magnetic (NMR). These compounds were quantified in the EMDT by high performance liquid chromatography (HPLC), the hiperoside with the greater concentration and the quercetin with the lowest. The EMDT, hyperoside and quercetin had antioxidant properties against DPPH[·] radical. The EMDT is cytoprotective, prevents the formation of micronucleus induced by H₂O₂ on roots cells from *Vicia faba*. In addition, it does not present genotoxic effects in the same model. And it was no cytotoxic effect for human cell line HaCat. Finally, according to these results the EMDT could represents a source of chemopreventive agents.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles por lo que han desarrollado diversas estrategias para sobrevivir a esta condición, como la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios también llamados productos naturales (Siracusa y Ruberto 2014). Del total de productos naturales conocidos aproximadamente el 80% son de origen vegetal (Zhong, 2010).

La amplia variedad de productos naturales sintetizados por las plantas depende de los diferentes factores bióticos y abióticos a los que se encuentran expuestas (Verma y Shukla, 2015). Por lo tanto, la capacidad de las plantas para colonizar nuevos territorios o sobrevivir a los cambios que se presenten en el lugar en el que se encuentran estará sujeta, entre otras cosas, a su capacidad para sintetizar metabolitos secundarios que puedan actuar en la defensa contra herbívoros y patógenos, así como atrayentes de polinizadores, hormonas, compuestos de señalización molecular, de reserva de precursores del metabolismo primario, entre otras; de tal forma que permitan su adaptación a las nuevas condiciones ambientales (Pettinati et al., 2012).

La variedad estructural de estos compuestos está dada por modificaciones químicas a una estructura básica. Dicha variabilidad genera diferentes perfiles metabólicos entre especies, organismos de una población e incluso en los diferentes órganos de una planta, lo cual se considera como parte de su estrategia adaptativa (Sepulveda et al., 2003).

Gran parte de los productos naturales sintetizados por las plantas poseen propiedades biológicas, que son aprovechadas por el hombre en la generación de insecticidas, pesticidas, hormonas de crecimiento de plantas, conservadores de alimentos, cosméticos y fármacos (Talapatra y Talapatra, 2015). Aproximadamente una cuarta parte del total de fármacos existentes derivan directa o indirectamente de plantas (Zhong, 2010).

Actualmente, el interés en el estudio de productos naturales sintetizados por las plantas con fines quimiopreventivos ha aumentado, debido al incremento de

enfermedades crónico degenerativas. Sin embargo, se estima que solo el 10 % de los compuestos que podrían existir en plantas han sido identificados y de una pequeña fracción ha sido evaluada su bioactividad (Zhon, 2010; Nikapitiya, 2012). Por lo tanto, las plantas siguen representando una alternativa en la búsqueda de productos naturales bioactivos.

Los productos naturales con propiedades antioxidantes son de suma importancia debido a que funcionan como agentes quimiopreventivos o coadyuvan en el tratamiento de distintas enfermedades (Shaidi y Zhong, 2015). En los organismos, los radicales libres se generan de forma natural como consecuencia del metabolismo aeróbico o de la exposición a factores externos como la contaminación ambiental, la radiación, el consumo de drogas, los solventes industriales, entre otros. Cuando los niveles de radicales libres exceden la capacidad de la célula para controlarlos se llega a un estado denominado estrés oxidativo, es decir, un desbalance entre los compuestos oxidantes y la producción de defensas antioxidantes (Ray et al., 2012), lo que conlleva daños celulares con el posterior desarrollo de patologías degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson y arterioesclerosis, entre otras (Benedí et al., 2004).

Los compuestos antioxidantes originados del metabolismo secundario de plantas pueden prevenir los daños generados por los radicales libres, actuando a través de diferentes mecanismos, como: quelando metales de transición pro-oxidantes, reduciendo radicales libres, descomponiendo peróxidos y reprimiendo la activación de enzimas oxidativas (Pisoichi y Pop, 2015). Por lo anterior, la atención de diversos estudios se ha enfocado en el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios derivados de plantas con propiedades antioxidantes (Rajendran et al., 2014).

México es una fuente atractiva de productos naturales con propiedades bioactivas, como antioxidantes, pues es el 4° país con mayor número de especies vegetales en el planeta, y el 2° en especies endémicas (Villaseñor, 2016).

La familia Asteraceae o Compositeae es el grupo de plantas con mayor número de especies en México, siendo nuestro país el centro de diversificación (Villareal et al., 2008). El éxito evolutivo de las compuestas se atribuye en gran parte a la elevada variedad de sustancias químicas que sintetizan (Bakar et al., 2015). Debido a lo anterior, varias especies de la familia como: el ajeno, (*Artemisia ludoviciana* spp. *Mexicana*), zoapatle (*Montanoa tomentosa*) y árnica (*Heterotheca inuloides*), entre otras, son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para tratar distintos padecimientos (Heinrich, 1998). Varias de estas especies han sido motivo de investigación en cuanto a sus propiedades biológicas, encontrando por mencionar algunas, propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, citotóxicas y antioxidantes (Rodríguez et al., 2017; Lopes et al., 2008), y en cuanto a su composición química para tratar de elucidar los compuestos responsables de dichas propiedades (Besada et al., 2015).

A pesar de la diversidad de las asteráceas y de su potencial como fuente de compuestos bioactivos un gran número de especies aún no han sido estudiadas desde este punto de vista, sobre todo aquellas que no tienen un antecedente de uso medicinal, pero que si sintetizan una amplia variedad de productos naturales que podrían presentar propiedades biológicas.

La familia Asterácea esta subdividida en tribus, una de ellas es Tageteae, que incluye 216 especies distribuidas entre 16 a 23 géneros, algunas especies son cultivadas como plantas de ornato, otras son de uso ceremonial o medicinal (Loockerman et al., 2003). *Dyssodia* es uno de los géneros que componen a la tribu, algunas de sus especies son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades de riñón, vejiga, estómago, problemas de sudoración excesiva y de ansiedad. Además, las hojas de *D. papposa* son utilizadas para aliviar el dolor de cabeza (Shemluc, 1982) y la infusión de la parte aérea de *D. micropoides* es conocida en México por sus propiedades hipoglucemiantes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Algunas especies de *Dyssodia* han sido investigadas en cuanto a sus propiedades bioactivas. Guitierrez-Lugo y colaboradores en 1996 mencionaron, que el extracto

clorofórmico de *D. papposa* presentó propiedades citotóxicas sobre *Artemia salina* y sobre las líneas celulares de cáncer de colón (HT-29), pulmón (A-549) y mama (MCF-7). Además, el extracto metanólico de *D. papposa* presentó actividad antimicrobiana sobre *Trichophytum mentagrophytes*, hongo causante de dermatofitosis. También, el extracto metanol-cloroformo de *D. pinnata* presenta propiedades antiespasmolíticas en íleon extraído de ratón (Rojas et al., 1999).

Los estudios acerca de la composición química de las especies de *Dyssodia* son escasos, entre los que se encuentran: tiofenos, acetilenos y poliacetilentiofenos, identificados en *D. porophylloides*, *D. anthemidifolia*, *D. pentachaeta*, *D. tenuiloba*, *D. papposa*, *D. acerosa* y *D. dicipiens* (Bohlmann et al., 1976; Bohlmann y Zdero 1979; Downum y Towers, 1985); un policétido y un éster de tiofeno identificados en las raíces de *D. tagetoides*, *D. papposa* y *D. acerosa* (Perez-Amador et al., 2004) y monoterpenos identificados en *D. dicipiens* y *D. acerosa* (Bohlmann y Zdero 1979; Tellez, R. et al., 1997).

D. tagetiflora, pertenece al género *Dyssodia*, como una especie endémica de México, es una de las especies que no presentan antecedentes de uso medicinal, y que hasta el momento no ha sido estudiada en cuanto a los productos naturales que la componen y a sus propiedades bioactivas.

En síntesis, la necesidad por obtener nuevos compuestos con propiedades quimiopreventivas va en aumento y los productos naturales derivados de las plantas representan una alternativa por la amplia diversidad de estructuras químicas que muestran. Con este fin y con antelación a la realización de la presente investigación se llevó a cabo un trabajo de campo con el objetivo de buscar plantas de México que pudieran presentar dichas cualidades encontrando a *D. tagetiflora* como una opción de estudio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Familia Asteraceae

La familia Astereaceae es una de la más grandes dentro de las angiospermas, constituye el 8 % de la flora mundial, cosmopolita excepto en la Antártida. Su éxito evolutivo se atribuye principalmente a la morfología de sus inflorescencias, su plasticidad para adaptarse en diferentes condiciones ambientales, su amplia distribución, el número de cromosomas y a los productos naturales que sintetiza (Jansen et al., 1991; Panero y Funk, 2008).

La sistemática de la familia ha sido estudiada durante los últimos 150 años, sin embargo, aún existen discordancias con respecto a las relaciones taxonómicas interfamilia. Se estima que existen entre 23 y 30 mil especies de asteráceas subdivididas en 12-35 tribus, con características fitoquímicas particulares en cada una (Jansen et al., 1991; Alvarenga et al., 2001; Panero y Funk., 2008; Funk et al., 2009; Kenny et al., 2014; Henrich, 1998).

2.1.2 Química de la familia Astereaceae

Los productos naturales que se han encontrado en la familia Asteraceae presentan una amplia variedad. Se ha considerado que el éxito evolutivo de las compuestas se debe en parte a su alta diversidad química que funciona como mecanismo de defensa (Jansen et al., 1991; Anderberg et al., 2007). Hasta 1990 se estimaba que cerca de 5000 asteráceas habían sido estudiadas en cuanto a su composición química, identificando 7000 compuestos (Zdero y Bohlmann 1990). Los principales grupos encontrados son: poliacetilenos y sus derivados, siendo el más común tridecapentaineno, aunque ausente en *Cichorieae*, *Asteraea* y *Anthemideae*; lactonas sesquiterpénicas, formando parte del látex y la cavidad subcuticular de los vellos glandulares, presentes en casi todas las tribus principalmente como guaianólidos y germacranólidos, y finalmente inulinas tipo fructanos almacenados en vacuolas. Otros constituyentes químicos de las compuestas son: cumarinas concentradas en ciertas tribus; labdanos clerodanos y sus derivados, timol y sus derivados, abietanos y flavonoides ampliamente distribuidos en toda la familia

(Seaman, 1982; Bohlmann, 1990; Zdero y Bohlmann 1990; Alvarenga et al., 2001; Anderberg et al., 2007).

2.2 Tribu Tageteae

Tageteae, cuenta con 16 géneros y 170 especies en México (Villareal et al., 2008), nuestro país podría ser el origen de la tribu de acuerdo con estudios de filogenia molecular, las zonas altas del país son el centro de diversificación de la misma (Loockerman et al., 2003; Anderberg et al., 2007).

Diferentes hipótesis con respecto a las relaciones taxonómicas intertribales en la subfamilia Asteroideae han sido publicadas, basadas principalmente en características morfológicas, químicas y secuencias de ADN (Pelser y Watson, 2009). La posición taxonómica de Tageteae en dicha subfamilia ha generado desacuerdos entre los taxónomos (Loockerman et al., 2003). En 1977 Strother separó a la tribu en dos subtribus, por un lado, Pectidinae con el género *Pectis* y por otro *Tagetinae* con los géneros restantes. Dicha clasificación se basó en las características morfológicas compartidas por las especies de *Pectis*. Robinson (1981) colocó a Tageteae como subtribu de Heliantheae y a Tagetinae como sinonimia de Pectinidae. Finalmente, Panero y Funk 2002 reconocieron a Tageteae como tribu de Asterideae basado en el análisis filogenético del ADN de cloroplastos de 120 géneros (Baldwin, 2009).

Otro problema taxonómico lo representa la circunscripción y la relación de los géneros dentro de la tribu. Algunos están bien definidos como *Pectis* con 75 especies, *Tagetes* con 55 especies y *Porophyllum* con 28 especies; los géneros restantes se conforman por pocas especies o son monotípicos. Varias especies fueron incluidas en un principio en *Dyssodia*, sin embargo, en 1986 Strother dividió a *Dyssodia* en siete géneros. El debate sobre las relaciones taxonómicas dentro de la tribu continúa presente. Hasta 2003 había 23 géneros publicados en la tribu Tageteae sin relaciones filogenéticas precisas (Loockerman et al., 2003). Este grupo incluye especies ornamentales y de uso ceremonial (Villarreal et al., 2008).

2.2.1 Química de la Tribu Tageteae

Los principales grupos de productos naturales presentes en la tribu Tageteae son flavonoides, poliacetilenos y monoterpenos (Calabria et al., 2009). La tribu es considerada monofilética por la presencia de glándulas oleíferas, constituidas por aceites esenciales, principalmente por monoterpenos, en las hojas y filarios del involucre (Anderberg et al., 2007; Villareal et al., 2008). Los poliacetilenos se encuentran en tallos, raíces y en menor medida en flores. Del tridecapentaineno, poliacetileno característico de las asteráceas, derivan los tiofenos presentes en varios géneros de la tribu (Anderberg et al., 2007). Con respecto a los flavonoides que constituyen a Tageteae, pocas especies contienen flavonas, pero todas las especies estudiadas acumulan flavonoles principalmente quercetagenina y sus derivados glicosilados. El género *Tagetes* es el más estudiado de la tribu en cuanto a flavonoides (Bohm y Stuessy, 2001).

Cabe resaltar que las lactonas sesquiterpenas, un grupo característico de la subfamilia Asterideae, están ausentes en Tageteae (Simpson, 2009).

2.3 Género *Dyssodia*

En un inicio Strother (1877) consideraba que *Dyssodia* estaba constituida por 32 especies, sin embargo, en 1986 el mismo autor reconsideró la circunscripción de las especies que formaban dicho grupo, basándose en nuevas observaciones morfológicas y en el número de cromosomas dentro del género con relación a Tageteae, concluyendo que varias especies pertenecientes a *Dyssodia* presentaban mayor relación con otros géneros de Tageteae que entre ellas mismas. Dicho análisis resultó en la división de *Dyssodia* en siete géneros segregados (*Adenophyllum*, *Boeberastrum*, *Boeberodides*, *Comaclinium*, *Dysodiopsis*, *Dyssodia* y *Thymophylla*), reduciendo el número de especies que se estimaba en un inicio. Posteriormente, estudios filogenéticos confirmaron que *Dyssodia* es polifilético y que los géneros segregados deben ser reconocidos (Loockerman et al., 2003).

Actualmente, se estima que *Dyssodia* cuenta con entre 4 y 5 especies todas presentes en México, sin embargo, algunas se distribuyen desde el sur de Canadá hasta Guatemala (Villarreal et al., 2008).

2.3.1 Morfología del género *Dyssodia*

Las especies del género *Dyssodia* se caracterizan por presentar la morfología siguiente: son hierbas anuales o perenes con hojas basales opuestas y las superiores distalmente alternas y pinatífidas con lóbulos lineares u oblanceolados, el margen dentado con glándulas oleíferas submarginales o dispersas en la lámina. Las inflorescencias son terminales solitarias o en racimos abiertos, los pedúnculos bracteados, pueden o no presentar calículas, presentan involucros cilíndricos o hemisféricos con filarias dimórficas de 1 a 3 seriadas con glándulas oleíferas, los receptáculos pueden ser planos a cónicos. Las flores son liguladas amarillas o naranjas, las flores del disco son amarillo-naranja en ocasiones con puntas color púrpura, las anteras son ovales o lanceoladas, los aquenios son obpiramidales u obcónicos negros, glabros moderadamente pubescentes. Vilano contiene de 15 a 20 escuámulas de varias longitudes compuestas de 5-10 cerdas barbeladas (Villarreal et al., 2008).

2.3.2 Química del género *Dyssodia*

Actualmente es limitada la información disponible acerca de la composición química del género *Dyssodia*, debido a la escasez de estudios al respecto, por lo anterior no es posible mencionar un patrón químico particular. Sin embargo, los compuestos que han sido reportados para el género van de acuerdo con aquellos característicos de la tribu a la que pertenece este grupo. Se han identificado principalmente compuestos de tipo poliacetilenos y tiofenos (Bholmann y Zdero 1976; Downum y Towers 1985; Iyengar et al., 1987; Téllez et al., 1997), monoterpenos como componentes principales de los aceites esenciales (Bholmann y Zdero 1979; Téllez et al., 1997) y flavonoides de tipo flavonoles, además derivados glicosilados de quercetina y quercetagenina se reportaron en *D. pinnata* y *D. papposa* (Bohm y Stuessy, 2001).

2.4 *Dyssodia tagetiflora* Lag. clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnolipsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Tageteae

Género: *Dyssodia*

Especie: *Dyssodia tagetiflora*

Dyssodia tagetiflora (**Figura 1**) es comúnmente llamada “Tzacarata”, crece en zonas abiertas y perturbadas, como en las orillas de carreteras. Forma parte de la vegetación secundaria del bosque tropical caducifolio, de bosque *Pinnus-Quercus*, y la transición del bosque de *Quercus* con bosque tropical caducifolio. Crece a alturas de 1600 a 2200 msnm, y florece de mayo a diciembre (Villarreal et al., 2008).

Esta especie es endémica de México, se distribuye en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Ciudad de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villareal et al., 2008).

2.4.1 Morfología de *Dyssodia tagetiflora*

Las plantas de esta especie son herbáceas perennes de 40 a 90 cm de altura, los tallos son erectos ramificados en la parte superior y estrigosos. Las hojas son opuestas a alternas de 3 a 5 cm de alto pinnatisectas en 11 a 17 lóbulos lineares a oblanceolados con margen entero a dentado, la pubescencia esparcida, numerosas glándulas oleíferas. Las cabezuelas se encuentran en pedúnculos de 5 a 10 cm de largo, bracteoladas ensanchadas en la parte terminal, el cálculo tiene de 6 a 7 bractéolas caliculares de 5 a 9 mm de largo lineares, el ápice es agudo con glándulas oleíferas, el involucro es turbinado a campanulado de 7 a 10 mm de alto, 8 filarias oblanceoladas purpúreas con glándulas lineares receptáculo plano a

convexo flores liguladas de 5 a 8, con 6 a 8 mm de longitud, amarillas a anaranjadas. De 40 a 60 flores del disco, amarillas, con corolas cilíndricas de 4 a 6 cm de largo, lóbulos ovados triangulares papilosos, los aquenios de 3 a 4 mm de largo obpiramidales estriados, negros, vilanos con 12 a 20 escuámulas ordenados en dos hileras, divididas en 5 a 10 cerdas usualmente purpuras (Villarreal et al., 2008).



Figura 1. *Dyssodia tagetiflora* Lag.

2.5 Poliacetilenos

Los poliacetilenos son un grupo de compuestos caracterizados por uno o más enlaces triples $C\equiv C$. Se conocen aproximadamente 2000 estructuras diferentes de las cuales 1100 fueron aisladas de la familia Asteraceae, generalmente son poliacetilenos de 10, 13, 14 y 17 átomos de carbono, algunos de estos compuestos se encuentran en forma de glicósidos, entre otras variantes. Estos se localizan principalmente en raíces, aunque también están presentes en hojas y tallos. Varios compuestos de este tipo son conocidos por sus propiedades biológicas entre las que destacan: citotoxicidad, efecto antiinflamatorio, antibacterial y antifúngico (Negri, 2015).

La biosíntesis de los poliacetilenos se explica sobre la generación de los enlaces acetilénicos mediante los modelos siguientes: mecanismo de deshidrogenación oxidativa y reacción de eliminación de un enol carboxilato. Ambos, pueden utilizar tres intermediarios diferentes, ácidos crepenínico, ácido esteárico y ácido tárlico, estos a su vez derivan de los ácidos grasos linoleico, oleico y estearílico respectivamente (**Figura 2**) (Minto y Blacklock 2008; Negri 2015).

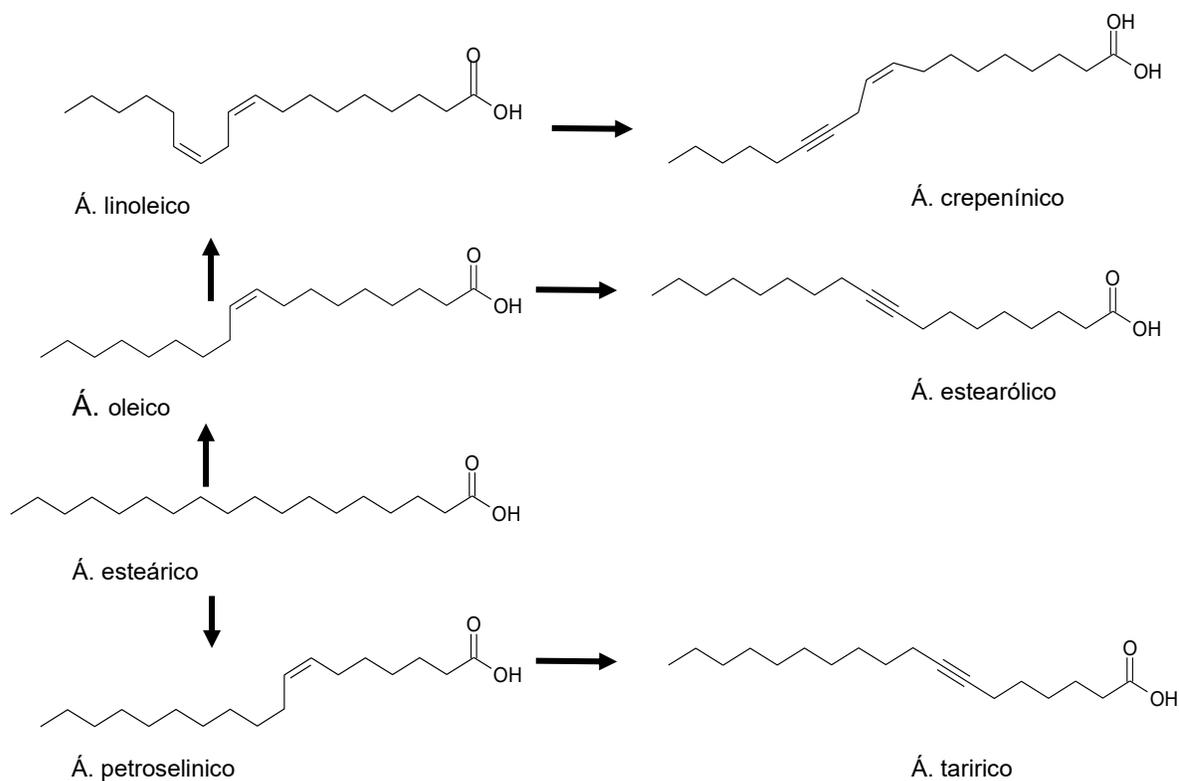


Figura 2. Precursores biosintéticos de los poliacetilenos.

Los precursores monoacetilados son sometidos a reacciones de insaturación regularmente por enzimas desaturasas y acetilasas con el fin de generar triples enlaces, reacciones de oxidación que acortan la cadena del poliacetileno o adiciona grupos funcionales, y reacciones de descarboxilación que generan poliacetilenos con número impar de carbonos (Negri, 2015).

2.5.1 Tiofenos

Los tiofenos son compuestos derivados de los poliacetilenos que se caracterizan por la presencia de uno o más heterociclos con átomos de azufre (S). La variación estructural en este grupo está dada por el número de anillos y por el grado de insaturación en la cadena de carbonos. La síntesis de tiofenos es generada por la adición de un átomo de S a una molécula de acetileno, los donadores de dicho átomo parecen ser los grupos tiol de la cisteína o el glutatión, el compuesto acetileno precursor es el tridecapentaineno (Arroo et al., 1997).

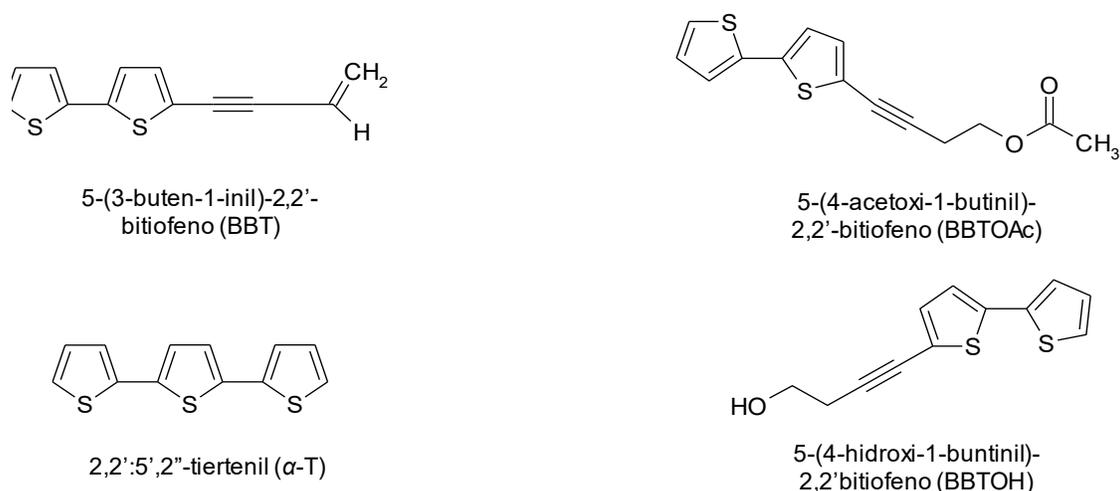


Figura 3. Tiofenos más abundantes en el género *Tagetes*.

Los tiofenos se encuentran principalmente en hongos y en plantas de la familia Asteraceae (Minto y Blacklock, 2008). Dichos compuestos se acumulan generalmente en raíces, aunque también se encuentran en hojas y flores, se ha reportado que funcionan como agentes neamaticidas, fungicidas, citotóxicos y alelopáticos (Maroti et al., 2010). El género *Tagetes* es uno de los principales sintetizadores de este grupo de compuestos con más de 150 tiofenos reportados (Minto y Blacklock, 2008). Cuatro tiofenos relacionados biosintéticamente están presentes de manera abundante en *Tagetes*, estos son: 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitiofeno (BBT), 5-(4-hidroxi-1-buntinil)-2,2'bitiofeno (BBTOH), 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno (BBTOAc) y 2,2':5',2''-tierfenil (α -T) (**Figura 3**) (Maroti et al., 2010).

2.6 Terpenos

Los terpenos son un grupo de productos naturales con una amplia diversidad estructural, todos derivados de una molécula base el isopreno, un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, producto de la descomposición térmica de los terpenos, aunque no está involucrado en la síntesis de éstos. La unidad monomérica que forma este grupo de productos naturales es el bifosfato de isopentenilo o su isómero el dimetil-alil-bifosfato (**Figura 4**). La variedad química de estos metabolitos secundarios se debe al número unidades monoméricas y a la forma en la que se unen, además de los grupos funcionales que se presentes en la molécula (Dewick, 2009).

Las rutas biosintéticas por las cuales se generan los terpenos son dos, la ruta del ácido mevalónico y la del 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato. En la primera vía, tres unidades de acetil coenzima A se unen para formar ácido mevalónico, el cual sufre dos fosforilaciones y una descarboxilación generando las moléculas precursoras de terpenos, el bifosfato de isopentenilo y su isómero, formas activas del isopreno; esta vía se lleva a cabo en el citoplasma y en algunos casos en el retículo endoplásmico, produciendo principalmente sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos. En la segunda ruta, están involucrados el ácido pirúvico y el gliceraldehído-3-fosfato, la unión de ambos forman la 5-fosfo-1-desoxi-D-xilulosa, molécula precursora del 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato intermediario en la síntesis de bifosfato de isopentenilo, esta vía se lleva a cabo en los cloroplastos y genera principalmente monoterpenos, diterpenos y carotenoides (Dewick, 2009).

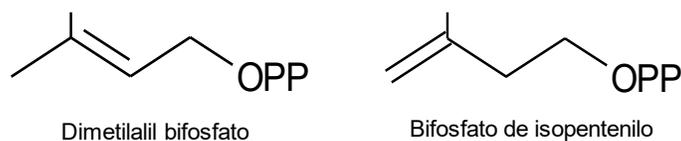


Figura 4. Moléculas precursoras de los terpenos.

Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno (**Figura 5**) que lo conforman en: hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos

(15C), diterpenos (20C), sesterpenos (25C), triterpenos (30C) y tetraterpenos (40C) (Dewick, 2009).

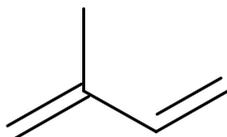


Figura 5. Isopreno, molécula de 5 carbonos.

Los terpenos son los productos naturales que más producen las plantas y en ciertos casos el grupo más grande de compuestos especie-específico. Cumplen diferentes funciones como defensa contra herbívoros, actuando directamente como agentes tóxicos o repelentes e indirectamente atrayendo depredadores o parásitos de dichos herbívoros, además atraen agentes polinizadores y mutualistas (Pichersky y Raguso, 2016).

2.7 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos sintetizados a través de las dos vías metabólicas siguientes: la vía del ácido shikímico y la del ácido mevalónico, de las que se derivan el p-cumaril-CoA y el malonil-CoA, respectivamente. La síntesis de flavonoides comienza con la unión de 3 moléculas de malonil-CoA y una de p-cumaril CoA, generando inicialmente un policétido, este puede sufrir dos reacciones distintas por las enzimas chalcona-sintetasa o estilbeno-sintetasa, obteniendo como producto chalconas o estilbenos, respectivamente. Las chalconas son los precursores de una amplia variedad de flavonoides (Dewick, 2009).

Los diferentes grupos de flavonoides comparten el mismo esqueleto base constituido por dos anillos aromáticos, el anillo A y el B conectados por un heterociclo de 3 carbonos, conocido como anillo C (**Figura 6**). Los flavonoides se dividen en diferentes grupos de acuerdo a las variaciones estructurales al anillo C. Las flavononas, flavonas y flavonoles difieren en su estructura por la presencia o ausencia de un doble enlace entre el C2 y C3, así como por la presencia de un grupo hidroxilo en el C3 solo en flavonoles, estos tres grupos presentan el anillo B

unido al C2, las isoflavonas se distinguen porque el anillo B está unido al C3. El grupo carbonilo en la posición C4 es característico de casi todos los grupos de flavonoides con excepciones, como las antocianinas que presentan un sistema conjugado de dobles enlaces. La variación dentro de los diferentes grupos de flavonoides está dada por modificaciones en los sustituyentes, incluyen hidroxilaciones, metoxilaciones, acetilaciones, prenilaciones y glicosilaciones (Bohm y Stuessy, 2001).

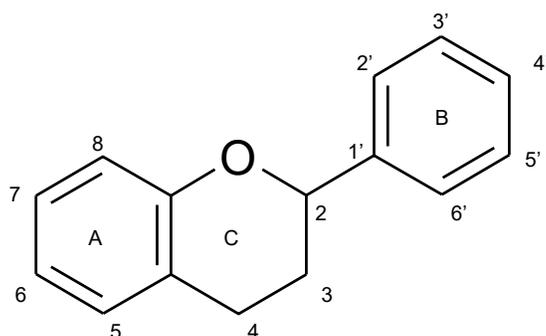


Figura 6. Estructura base de los flavonoides.

Los flavonoides se distribuyen ubicuamente en plantas. En la familia Asteraceae es más común encontrar flavonoides de tipo flavonoles y flavonas, principalmente luteolina en 139 de los 410 géneros; apigenina en 118; kaempferol en 114; y quercetina en 212; así como sus derivados glicosídicos (Bohm y Stuessy, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

La necesidad por estudiar nuevos compuestos con propiedades quimiopreventivas o que coadyuven en el tratamiento de diversas patologías va en aumento debido al incremento de enfermedades crónico degenerativas (Zhon, 2010); una alternativa a lo anterior, ha sido la búsqueda de productos naturales derivados de plantas con propiedades bioactivas. La familia Asteraceae es el grupo de plantas con mayor número de especies en México, su éxito evolutivo se atribuye entre otras cosas a la amplia variedad de metabolitos secundarios que sintetiza (Villareal et al., 2008; Bakar et al., 2015); por esta razón varias especies de esta familia han sido motivo de estudio con respecto a su composición química y propiedades biológicas, sin embargo, a causa de la extensión de la familia aún faltan especies por estudiar (Heinrich, 1998). México es el centro de diversificación de esta familia, así como de una de sus tribus, la tribu Tageteae, a ésta pertenece el género *Dyssodia* conformado por siete especies, todas presentes en el país, con algunas endémicas como *D. tagetiflora* ésta carece de estudios con respecto a su composición química y propiedades biológicas, aunque podría ser una fuente de compuestos quimiopreventivos de acuerdo con la composición química características de la tribu (Villareal et al., 2008; Calabria et al., 2009).

4. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Cuáles son los principales compuestos bioactivos presentes en el extracto metanólico de *D. taetiflora*?

5. HIPÓTESIS

5.1 Composición química

D. taetiflora contendrá poliacetilenos, flavonoides de tipo flavonoles y sus derivados glicosilados, de acuerdo con los compuestos característicos de la tribu Tagetae.

5.2 Antioxidantes

D. taetiflora biosintetiza flavonoides, así el extracto metanólico tiene propiedades antioxidantes debido a que los flavonoides son conocidos, entre otras cosas, por esta actividad biológica.

5.3 Citotoxicidad

D. taetiflora contiene poliacetilenos, el extracto metanólico tendrá propiedades citotóxicas, ya que los poliacetilenos son considerados compuestos tóxicos.

5.4 Citoprotección

D. taetiflora presentará efecto citoprotector frente al daño inducido por H₂O₂ en diferentes modelos biológicos, debido a sus propiedades antioxidantes.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Aislar e identificar los principales compuestos bioactivos del extracto metanólico de las partes aéreas de *D. tagetiflora*.

6.2 Objetivos particulares

- Aislar de forma biodirigida los metabolitos secundarios del extracto metanólico de las partes aéreas de *D. tagetiflora*.
- Caracterizar los principales componentes del extracto metanólico de las partes aéreas de *D. tagetiflora*.
- Evaluar las propiedades antioxidantes del extracto metanólico de las partes aéreas de *D. tagetiflora* y de su principal componente químico.
- Evaluar la actividad citotóxica y genotóxica del extracto metanólico de las partes aéreas de *D. tagetiflora* sobre raíces de *V. faba*.
- Evaluar la actividad citoprotectora del extracto metanólico de las partes aéreas de *D. tagetiflora* sobre raíces de *V. faba*.
- Evaluar el efecto del extracto metanólico de las partes aéreas de *D. tagetiflora* en la viabilidad de la línea celular HaCat.

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Material vegetal

La parte aérea de *D. tagetiflora* se colectó en el cerro del Toro, municipio de Acámbaro, Estado de Guanajuato, México (**Apéndice 1**) a 1884 msnm, en octubre de 2015. Fue identificada y registrada (20417) en el herbario IZTA de la FES-Iztacala UNAM.

7.2 Obtención de los extractos de *D. tagetiflora*

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente y a la sombra; 1 kg de éste se maceró en hexano, diclorometano y metanol sucesivamente. Los extractos obtenidos se filtraron y se concentraron por destilación a presión reducida para obtener los sólidos totales. El extracto metanólico de *D. tagetiflora* será denominado EMDT.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{extracto obtenido (gr)} \times 100}{\text{mv (gr)}}$$

Dónde: mv= peso seco del material vegetal utilizado para la obtención del extracto

7.3 Pruebas preliminares

7.3.1 Actividad antioxidante cualitativa

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos de *D. tagetiflora* se determinó de manera cualitativa. En una placa cromatográfica de gel de sílice se colocó una muestra de cada extracto, enseguida se impregnó con una solución metanólica del radical difenil-picril-hidrazilo (DPPH*) y se dejó secar por 1 minuto. La prueba se consideró positiva si el sitio donde se colocó la muestra viraba de color violeta a amarillo.

7.3.2 Tamizaje fitoquímico del EMDT

Con el fin de determinar cualitativamente los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en el EMDT se llevaron a cabo reacciones coloridas, estas

se basan en la reacción específica de cada grupo de metabolito secundario con determinados reactivos generando productos coloreados que indican la presencia del grupo en cuestión.

7.3.2.1 Fenoles

Cloruro férrico (FeCl_3): Se preparó una solución de FeCl_3 y se agregaron tres gotas a 1 mL del EMDT en solución metanólica (1 mg/mL). Sí la reacción genera una coloración verde o azul, la prueba es considerada positiva para fenoles (Wagner y Blatt., 2001).

7.3.2.2 Flavonoides

Ácido sulfúrico (H_2SO_4): Se agregaron tres gotas de H_2SO_4 al EMDT en solución metanólica (1 mg/mL). La prueba es positiva sí se presenta una coloración amarillo-rojo o naranja (Domínguez, 1979).

7.3.2.3 Terpenos

Vainillina: El EMDT se sometió a cromatografía en placa fina (CPF) usando como eluyente una mezcla de solventes (hexano-acetato de etilo) en una proporción 8:2. La placa se reveló con una solución de vainillina/ H_2SO_4 . La prueba resulta positiva sí en la cromatoplaça se generan bandas con una coloración morada o rosada (Wagner y Blatt, 2001).

7.3.2.4 Lactonas sesquiterpénicas

Baljet: Se preparó una mezcla de la solución A (0.01 gr de ácido pícrico ($\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}(\text{NO})_3$) en 1 mL de etanol) y la solución B (0.2 gr de hidróxido de sodio (NaOH) en 2 mL de agua). Tres gotas de dicha mezcla fueron agregadas al EMDT en solución metanólica (1 mg/mL). Sí la reacción genera una coloración roja o anaranjada, indica la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Domínguez, 1979).

7.3.2.5 Saponinas

Prueba de espuma: El EMDT se disolvió en agua destilada (1 mg/mL) y se llevó a agitación. La espuma que se formó y persistió por al menos 1 minuto se consideró como indicativo de la presencia de saponinas en el EMDT (Domínguez, 1979).

7.3.2.6 Alcaloides

Dragendorff: Se agregaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff al EMDT en solución metanólica (1 mg/mL). Sí la reacción presentó un precipitado con coloración naranja-rojiza, la prueba se consideró positiva (Wagner y Bladt, 2001).

Mayer: Se agregaron 3 gotas del reactivo de Mayer al EMDT en solución metanólica (1 mg/mL). Sí la reacción generó un precipitado blanco, se consideró positiva (Coy et al., 2014).

7.3.2.7 Glicósidos

Molish: Tres gotas de una solución de α naftol en alcohol, se adicionaron al EMDT en solución metanólica (1 mg/mL), se agitó y enseguida se añadieron unas gotas de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo muestra. La reacción se consideró positiva, sí generó un anillo violeta (Domínguez, 1979).

7.4 Estudio químico del EMDT

7.4.1 Separación del EMDT

La caracterización química del EMDT se realizó por cromatografía en columna abierta (CC) de sílica gel 60 (Merk G) y cromatografía en columna rápida o flash (CCF) de sílica gel [40-63 μm (230-400 mesh)]. Las fracciones resultantes se analizaron por CPF en cromatoplasmas de aluminio con sílica gel (60 F₂₅₄) observadas bajo luz UV (254 y 366) y reveladas con una mezcla de H_2SO_4 -sulfato cérico y una solución metanólica del radical DPPH^{*}, esta última con el fin de realizar un fraccionamiento biodirigido, separando únicamente las fracciones con propiedades antioxidantes.

El extracto metanólico de *D. tagetiflora* (77 g) se separó por CC, se eluyó con una mezcla de solventes orgánicos en distinta proporción, iniciando con acetato de etilo (AcOEt) y finalizando con metanol (MeOH). Se obtuvieron 237 alícuotas (**Tabla 1**) agrupadas en 4 fracciones (A-D) de acuerdo a su patrón cromatográfico en CPF. De la fracción A se obtuvo el compuesto 1 (1360 mg).

Tabla 1. Separación del extracto metanólico de *D. tagetiflora* (77 g) por cromatografía en columna abierta.

| Eluyente | Proporción (%) | Alícuotas | Alícuotas reunidas | Fracciones | Compuesto |
|------------|----------------|-----------|--------------------|------------|---------------------------|
| AcOEt | 100 | 1-47 | 1-5 | A | ¹ (1360 mg) |
| AcOEt/MeOH | 95:5 | 48-72 | | | |
| AcOEt/MeOH | 9:1 | 73-125 | 6-159 | B | |
| AcOEt/MeOH | 8:2 | 121-146 | | | |
| AcOEt/MeOH | 7:3 | 142-185 | 160-199 | C | |
| AcOEt/MeOH | 6:4 | 186-238 | 200-237 | D | |

Acetato de etilo (AcOEt); Metanol (MeOH).

La fracción B presentó mayor rendimiento (29.8 %), además mostró actividad antioxidante en la prueba cualitativa. Por lo tanto, 23 g de dicha fracción se sometieron a separación por CCF siguiendo las condiciones reportadas por Fair y Kormos, (2008), se eluyó con una mezcla de hexano/AcOEt comenzando con una proporción 3:1 y finalizando con 1:1 v/v, obteniendo 122 alícuotas reunidas en 13 fracciones (B1-B13) (**Tabla 2**). De la fracción B9 se aisló el compuesto 2 (250 mg), y de la fracción B13 el compuesto 3 (40 mg) ambos se obtuvieron con un sistema de elución hexano/AcOEt (3:1).

Tabla 2. Separación de la fracción 2B (23 g) por cromatografía en columna flash.

| Eluyente | Proporción (%) | Alícuotas | Alícuotas reunidas | Fracciones | Compuesto |
|--------------|----------------|-----------|--------------------|------------|------------|
| Hexano/AcOEt | 3:1 | 1-43 | 4 | B1 | |
| | | | 5-7 | B2 | |
| | | | 8-9 | B3 | |
| | | | 10-16 | B4 | |
| | | | 17-20 | B5 | |
| | | | 21-40 | B6 | |
| Hexano/AcOEt | 2:1 | 44-69 | 41-59 | B7 | |
| Hexano/AcOEt | 6:4 | 70-79 | 60-79 | B8 | |
| Hexano/AcOEt | 1:1 | 80-122 | 80-100 | B9 | 2 (250 mg) |
| | | | 101-102 | B10 | |
| | | | 103-108 | B11 | |
| | | | 109-113 | B12 | |
| | | | 114-122 | B13 | 3 (40 mg) |

Acetato de etilo (AcOEt).

7.4.2 Análisis espectroscópico de los compuestos aislados del EMDT

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C de los compuestos aislados del EMDT se obtuvieron en espectrómetros Varian Inova de 500 y 125 MHz respectivamente, utilizando CD_3OD como solvente, y TMS como estándar interno (**Apéndice 2**).

7.4.3 Cuantificación por HPLC de los compuestos aislados del EMDT

Los compuestos aislados fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución HPLC, se llevó a cabo en un equipo Agilent 1200 con detector UV. Se utilizó una columna en fase reversa Allphere ODS-1 C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm), el análisis se realizó de acuerdo con lo reportado por Blunder y colaboradores en 2017 para flavonoides glicosilados. Como fase móvil se empleó un gradiente lineal con 0.1% ácido fórmico (CH_2O_2) en agua (v/v) (A), 0.1% CH_2O_2 en acetonitrilo

(C₂H₃N) (v/v) (B) y 0.1% CH₂O₂ en metanol (CH₃OH) (v/v) (C), iniciando con 95% de la solución A, 2% de la solución B, y 3% de la solución C. Se terminó a los 40 minutos con 43% de la solución B y 57% de la solución C, con un flujo de 1.2 mL/min y un volumen de inyección de 30 µL del EMDT en solución metanólica (1 mg/mL). Los compuestos aislados del EMDT (hiperósido, avicularina y acetato de avicularina) se utilizaron como estándar.

7.4.4 Cuantificación de fenoles totales del EMDT

El contenido de fenoles totales del EMDT se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Sinlgeton et al., 1999). Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (10-60 µg/mL). La mezcla de reacción se preparó con 100 µL de EMDT, 900 µL de agua destilada y 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se incubó por 5 minutos y se agregaron 1.5 mL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) (20%). Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 750nm. Los resultados muestran el promedio de tres repeticiones y se expresan en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (GAE/g extracto).

7.4.5 Actividad antioxidante cuantitativa

El método del radical DPPH[•] (López y Denicola, 2013) se utilizó para determinar las propiedades antioxidantes del EMDT. Se preparó una mezcla con 50 µL del EMDT (10-60 µg/mL) y 150 µL de solución metanólica de DPPH[•] (250 µM), se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm. Como control positivo se utilizó ácido gálico (1-10 µg/mL). Los resultados se expresan como concentración eficaz media (CE₅₀), es decir, la concentración necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% la concentración inicial del DPPH[•], y como porcentaje de decoloración obtenido a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de decoloración} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Dónde: Abs_{control} = absorbancia del DPPH[•] en metanol y Abs_{muestra} = absorbancia de las muestras extracto/DPPH[•] en metanol.

7.5 Pruebas biológicas

7.5.1 Efecto genotóxico y citotóxico del EMDT en raíces de *V. faba* var. Minor

El ensayo de genotoxicidad y citotoxicidad del EMDT se realizó de acuerdo con lo descrito por Ma et al., 1995. Semillas de *V. faba* se colocaron en agua desionizada por 24 horas, con el fin de reblandecer la testa. Posteriormente, fueron puestas a germinar entre dos capas de algodón previamente humedecido, por un período de entre 5 y 7 días, después del cual se seleccionaron aquellas cuyas raíces medían entre 2-3 cm de largo, cuatro semillas fueron utilizadas por tratamiento, las semillas seleccionadas continuaron con su crecimiento en cajas Petri con 50 mL de EMDT (200 µg/mL) por 24, 48 y 72 horas, utilizándose agua como control negativo e ifosfamida (5 µg/mL) como control positivo.

Pasado el tiempo de exposición se cortaron las raíces, y se fijaron en ácido acético-etanol por 24 horas, después cada raíz fue hidrolizada con HCl (1 N) a 55 °C por 3 minutos, posteriormente, se lavaron 3 veces en agua destilada con el fin de remover el HCl, y se almacenaron en ácido acético-etanol a 4 °C, para su posterior uso. De cada raíz se cortaron 5 mm por arriba de la cofia (zona meristemática), y se maceraron en un portaobjetos posteriormente se tiñó con orceína al 1%, finalmente la muestra fue observada bajo el microscopio con el objetivo de 40X, 400 aumento real.

Para evaluar el efecto citotóxico del EMDT se midió el porcentaje de índice mitótico (IM), contando 1000 células por cada laminilla y utilizando la siguiente formula:

$$\text{Índice mitótico (IM) total} = (\text{Número de células en división}/1000) \times 100$$

Con respecto al efecto genotóxico se midió el porcentaje de micronúcleos (MCN), para lo cual se contaron 1000 células por cada laminilla y se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Micronúcleos (MCN)} = (\text{Número de células en interfase con MCN}/1000) \times 100$$

7.5.2 Efecto citoprotector del EMDT en raíces de *V. faba* var. Minor

El estudio de las propiedades citoprotectoras del EMDT se realizó de manera análoga al ensayo de citotoxicidad, con las siguientes excepciones (Askin y Aslantürk, 2006): las raíces fueron expuestas a un pretratamiento con EMDT (200 µg/mL) por 24 horas, enseguida se colocaron en H₂O₂ (400 µM) por 48 horas. Se utilizó H₂O₂ (400 µM) como control positivo.

7.5.3 Efecto del EMDT sobre la viabilidad celular de la línea de queratinocitos inmortalizados (HaCat)

La línea celular HaCat fue proporcionada por el laboratorio de Genómica Funcional de la Unidad de Biomedicina en la FES-Iztacala UNAM. Se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y una solución compuesta por 1000 U de penicilina, 1000 µg/mL estreptomina, y anfotericina (25 µg/mL en 85% de solución salina) a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

El efecto del EMDT se evaluó midiendo la viabilidad celular de HaCat (Ramon, 2006). Para llevar a cabo los ensayos, las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos (1x10⁵ células/pozo) después de cinco horas el medio de cultivo fue removido. Enseguida 100 µL de DMEM complementado con SBF al 2% se adicionaron a cada pozo y se incubaron por 24 horas. Posteriormente, el medio se reemplazó con diferentes concentraciones de EMDT (1, 10, 100, 1000 y 10,000 µg/mL) en DMEM complementado con SBF al 2% por 24 horas. La viabilidad celular se determinó por el método de reducción de la sal 3-(4,5,-dimetiazol-2-il) bromo difeniltetrazolio (MTT), pasado el tiempo de exposición de las células al EMDT el medio fue retirado y se agregaron 0.5 mg/mL de MTT, después de cuatro horas los cristales de formazan que se formaron se disolvieron en DMSO durante 10 minutos. La absorbancia se midió en un lector de placas EPOCH (biotec) a 540 nm.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{DO}_{\text{células tratadas}} / \text{DO}_{\text{células sin tratamiento}}) \times 100$$

DO= densidad óptica.

7.6 Análisis estadístico

Los ensayos de actividad antioxidante y las pruebas biológicas se realizaron por triplicado. La CE_{50} se calculó por regresión lineal. Las medias de los grupos control y las medias de los diferentes tratamientos fueron analizadas por ANOVA de un factor seguido de la prueba de Tukey, usando el programa Minitab 16.

8. RESULTADOS

8.1 Rendimiento de los extractos obtenidos de *D. tagetiflora*

Los extractos de diferente polaridad se obtuvieron a partir de 1 Kg (peso seco) de la parte aérea de *D. tagetiflora*. El extracto metanólico presentó el mayor rendimiento, es decir, contiene mayor cantidad de sólidos, seguido del diclorometanólico, finalmente el hexánico (**Tabla 3**).

Tabla 3 Rendimiento de los extractos obtenidos de la parte aérea de *D. tagetiflora*.

| Extracto | Rendimiento (%) |
|-------------------|-----------------|
| Metanólico | 13.4 |
| Diclorometanólico | 0.5 |
| Hexánico | 0.4 |

8.2 Pruebas preliminares

8.2.1 Actividad antioxidante cualitativa de los extractos de *D. tagetiflora*

Los tres extractos obtenidos de la parte aérea de *D. tagetiflora* tienen propiedades antioxidantes debido que los espacios donde se colocaron las muestras de extractos cambiaron de color violeta a amarillo (**Figura 7**). Esto indica que los tres extractos son capaces de neutralizar al radical DPPH[•], sin embargo, visualmente destaca la actividad del EMDT. Por lo tanto, considerando la mayor actividad antioxidante y el mejor rendimiento, se seleccionó al EMDT para aislar sus principales compuestos y evaluar sus propiedades biológicas.

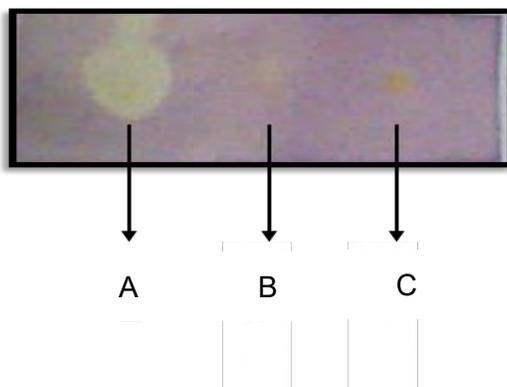


Figura 7. Extractos metanólico (A), diclorometanólico (B) y hexánico (C) en una cromatoplaaca revelada con solución metanólica de DPPH*.

8.2.2 Tamizaje fitoquímico del EMDT

Las pruebas cualitativas de los principales grupos de metabolitos secundarios en el EMDT muestran resultados positivos para los grupos de fenoles, flavonoides, terpenos, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos (**Tabla 4**). Con respecto al grupo de alcaloides los resultados no son consistentes debido a que la prueba de Mayer resultó positiva, no así la prueba de Dragendorff.

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico preliminar del extracto metanólico de *D. tagetiflora*.

| Fitoquímicos | Resultado |
|---------------------------|-----------|
| Fenoles | + |
| Flavonoides | + |
| Terpenos | + |
| Lactonas sesquiterpénicas | + |
| Glicósidos | + |
| Alcaloides (Mayer) | + |
| Alcaloides (Dragendorff) | - |

(+) indica que la prueba es positiva para el grupo correspondiente.

(-) indica que la prueba es negativa para el grupo correspondiente.

8.3 Estudio químico del EMDT

8.3.1 Compuestos aislados del EMDT

Del proceso de separación del EMDT se aislaron tres compuestos con estructura básica de flavonoide en su forma glicosilada y su aglicona (**Figura 8**), estos son los siguientes:

Compuesto 1. Se aisló de la fracción A como un polvo verde claro (**Tabla 1**). Con punto de fusión 235-237 °C. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (**Tabla 5**) mostraron señales características para el hiperósido, un glicósido que se compone del flavonoide quercetina enlazado por el carbono 3 a una molécula de galactosa (Sae Kwang et al., 2013).

Compuesto 2. Se aisló de la fracción B9 como un polvo amarillo claro (**Tabla 2**). Con punto de fusión 245-246 °C. Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C (**Tabla 5**) indican que dicho compuesto se trata de avicularina, un glicósido compuesto por quercetina unida por el carbono 3 a un anillo de arabinofuranosa (Marzouk et al., 2007).

Compuesto 3. Se aisló de la fracción B13 como un polvo amarillo (**Tabla 2**). Con punto de fusión 240-241 °C. Las señales mostradas por el análisis de RMN de ^1H y ^{13}C (**Tabla 5**) coinciden con las de la avicularina, sin embargo, dos señales en la RMN ^{13}C (175.2 ppm y 20.5 ppm) y una señal simple en 1.92 ppm en RMN de ^1H indican la presencia de un grupo carbonilo y un metilo en la molécula, por lo cual podría tratarse de la avicularina acetilada, un glicósido compuesto por quercetina unida por el carbono 3 a un anillo acetilado de arabinofuranosa.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C para el hiperósido, avicularina y acetato de avicularina aislados del extracto metanólico de *D. tagetiflora*.

| Posición | Hiperósido | | Avicularina | | Acetato de avicularina | |
|-----------------|------------|---|-------------|--|------------------------|--|
| | C | H | C | H | C | H |
| 2 | 150.0 | | 159.5 | | 158.5 | |
| 3 | 135.1 | | 134.9 | | 134.9 | |
| 4 | 178.2 | | 179.8 | | 179.7 | |
| 5 | 158.9 | | 163.0 | | 163.1 | |
| 6 | 100.4 | 6.19 <i>d</i> | 99.8 | 6.86 <i>d</i> | 99.8 | 6.18 <i>d</i> |
| 7 | 166.4 | | 166.0 | | 166.0 | |
| 8 | 95.2 | 6.39 <i>d</i> | 94.7 | 6.88 <i>d</i> | 94.7 | 6.37 <i>d</i> |
| 9 | 150.8 | | 158.5 | | 159.7 | |
| 10 | 105.9 | | 105.6 | | 105.6 | |
| 1' | 122.8 | | 122.9 | | 123.0 | |
| 2' | 116.5 | 7.82 <i>d</i> | 116.4 | 7.50 <i>d</i> | 116.3 | 7.46 <i>d</i> |
| 3' | 145.9 | | 146.3 | | 146.3 | |
| 4' | 146.5 | | 149.8 | | 149.8 | |
| 5' | 118.2 | 6.85 <i>d</i> | 116.8 | 6.87 <i>d</i> | 116.8 | 6.88 <i>dd</i> |
| 6' | 123.4 | 7.58 <i>dd</i> | 123.1 | 7.46 <i>dd</i> | 123.1 | 7.40 <i>dd</i> |
| 1'' | 103.8 | 5.15 <i>d</i> | 109.5 | 5.45 <i>sl</i> | 109.7 | 5.40 <i>d</i> |
| 2'' | 73.6 | 3.62 <i>dd</i> | 83.3 | 4.31 <i>dd</i> | 83.6 | 3.89 <i>dd</i> |
| 3'' | 75.6 | 3.46 <i>dd</i> | 78.7 | 3.87 <i>m</i> | 79.3 | 3.77 <i>dd</i> |
| 4'' | 70.5 | 3.79 <i>br d</i> | 88.0 | 3.50 <i>m</i> | 84.2 | 3.84 <i>dd</i> |
| 5'' | 77.6 | 3.55 <i>dd</i> | 62.63 | ax: 3.48 <i>dd</i> eq: 3.46 <i>dd</i> | 64.9 | ax: 4.08 <i>d</i> eq: 4.05 <i>d</i> |
| 6'' | 62.4 | ax:3.84 <i>dd</i> eq: 3.79 <i>dd</i> | | | | |
| OH | | 12.1 <i>s</i> | | | | |
| C=O | | | | | 172.5 | |
| CH ₃ | | | | | 20.5 | 1.92 <i>s</i> |

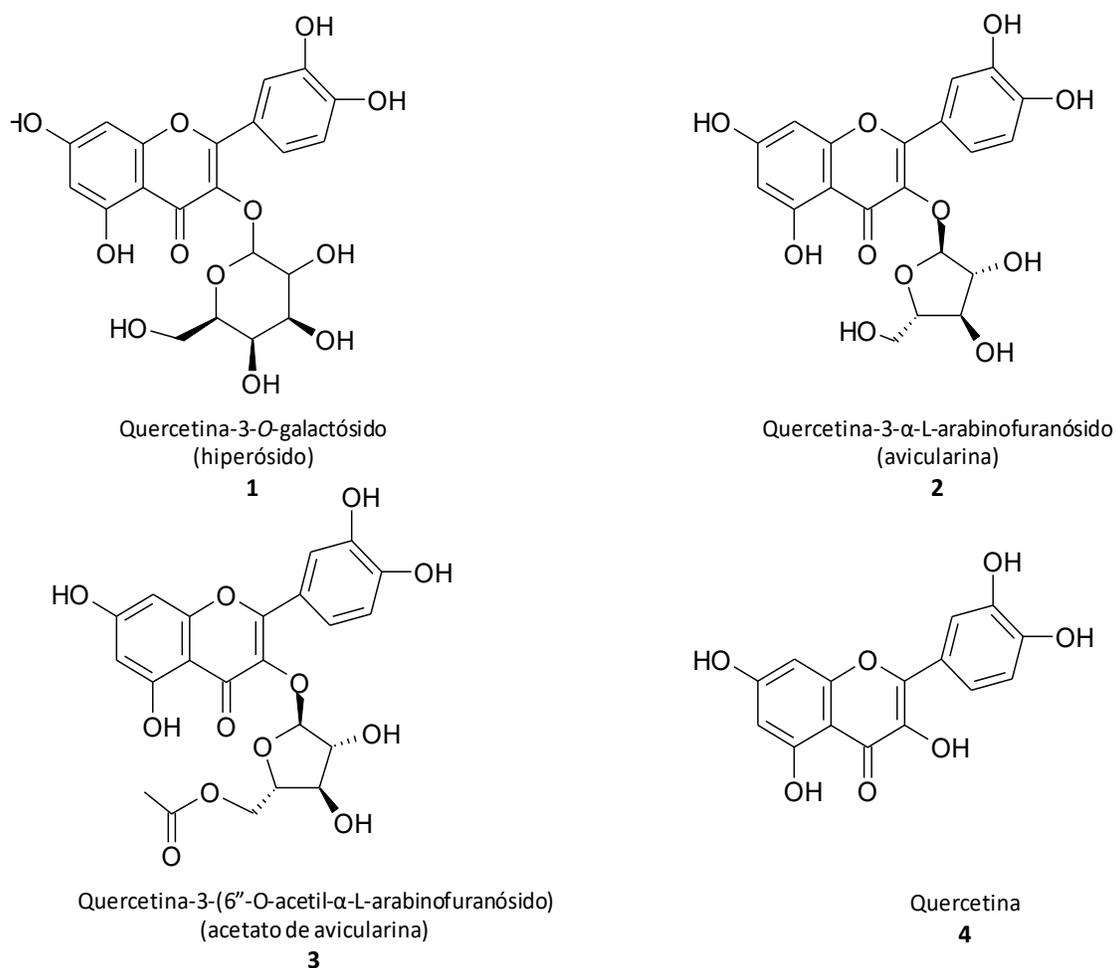


Figura 8. Compuestos identificados en el extracto metanólico de *D. tagetiflora*.

8.3.2 Cuantificación por HPLC de los compuestos aislados del EMDT

El perfil cromatográfico del EMDT obtenido a partir del análisis por HPLC (**Figura 9**) muestra los picos característicos para cada uno de los compuestos aislados, los cuales se identificaron de acuerdo a los tiempos de retención y al espectro de absorción en la región UV detectados a 254 nm.

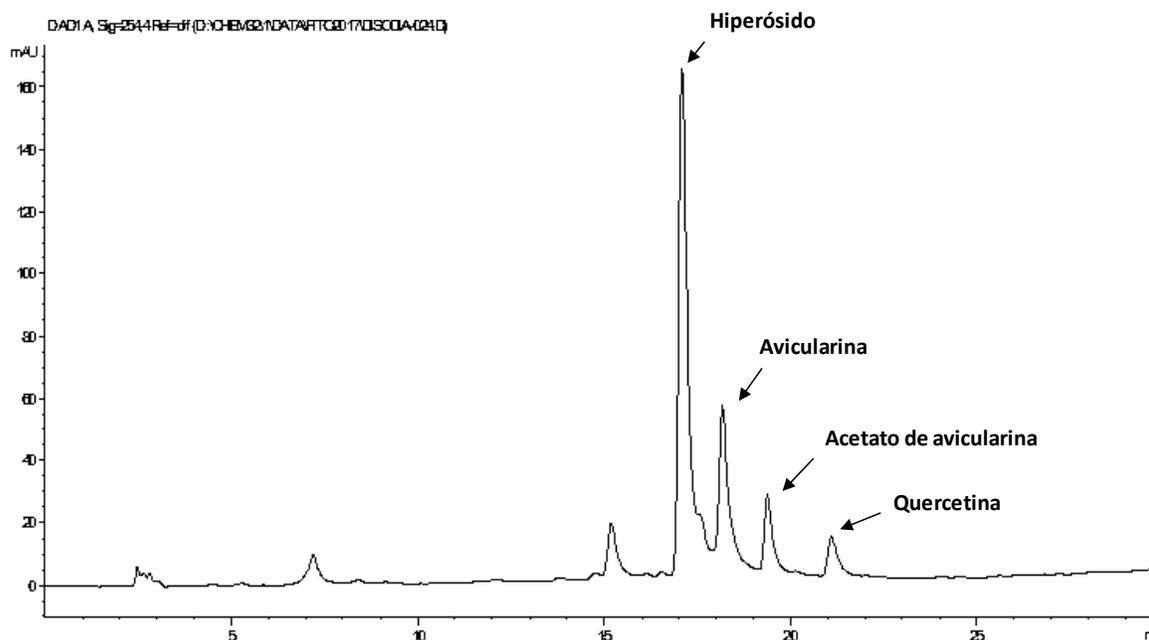


Figura 9. Cromatograma del extracto metanólico de *D. tagetiflora* por HPLC.

El análisis por HPLC del EMDT mostró que el hiperósido se encuentra en mayor concentración (57.83 $\mu\text{g/g}$), seguido de la avicularina (26.03 $\mu\text{g/g}$) y del acetato de avicularina (26.03 $\mu\text{g/g}$). Además, se identificó la presencia de quercetina, siendo esta el compuesto con menor concentración (10.03 $\mu\text{g/g}$) en el EMDT con respecto a los anteriores (**Tabla 6**).

Tabla 6. Contenido de compuestos aislados del extracto metanólico de *D. tagetiflora*.

| Compuesto | Tiempo de retención | Concentración ($\mu\text{g/g}$ de extracto) | % |
|------------------------|---------------------|--|------|
| Hiperósido | 17.206 | 57.83 | 5.7 |
| Avicularina | 19.181 | 26.03 | 2.6 |
| Acetato de avicularina | 19.402 | 10.66 | 1.06 |
| Quercetina | 21.097 | 10.03 | 1.00 |

(%) Porcentaje de cada compuesto por gramo de extracto.

8.3.3 Cuantificación de fenoles totales del EMDT

El contenido de fenoles totales del EMDT se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu. De acuerdo con la curva patrón generada con el ácido gálico (**Figura 10**) el EMDT presentó 260 GAE/g de extracto.

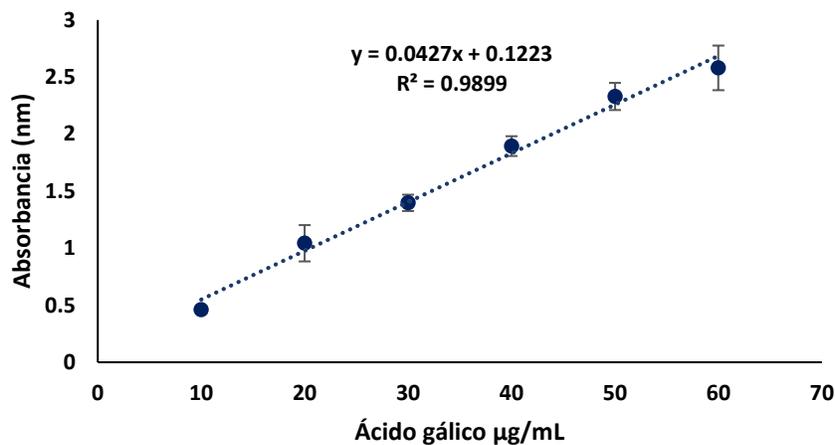


Figura 10. Curva patrón de ácido gálico para cuantificar fenoles. Promedio de 3 repeticiones \pm D.S.

8.3.4 Actividad antioxidante cuantitativa

La capacidad antioxidante del EMDT, del hiperósido y de la quercetina se determinó midiendo el porcentaje de decoloración del radical DPPH[•] (**Figura 11**) y obteniendo el valor de CE₅₀ (**Figura 4**), ambos muestran la capacidad del EMDT, del hiperósido, la quercetina y del control (ácido gálico) para decolorar el DPPH[•], todas las muestras evaluadas presentan efecto antioxidante.

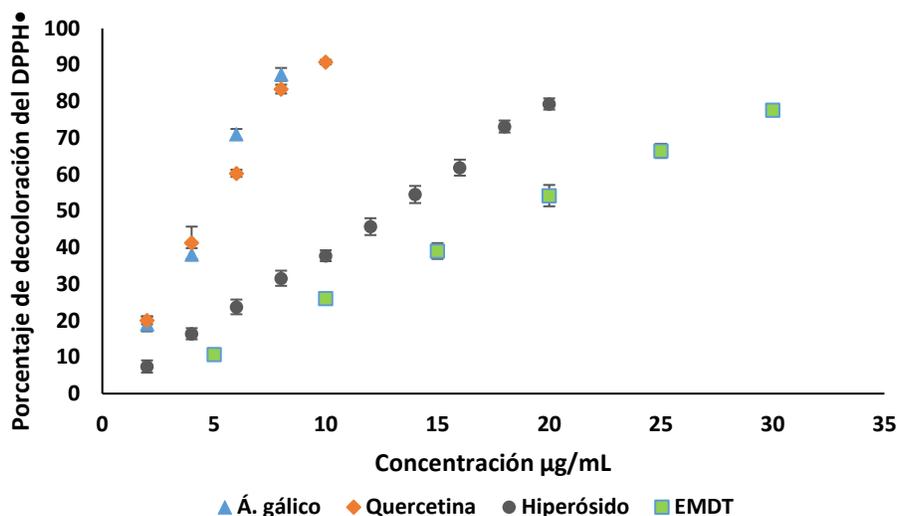


Figura 11. Porcentaje de decoloración del radical DPPH[•] por parte del EMDT, hiperósido, quercetina y ácido gálico. Promedio de 8 repeticiones en 3 experimentos independientes \pm D.S.

De acuerdo con la CE_{50} de cada muestra evaluada, el ácido gálico presentó el mayor efecto antioxidante (CE_{50} de 4.6 $\mu\text{g/mL}$), seguido de los compuestos quercetina (CE_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$) e hiperósido (CE_{50} de 12.7 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente. El EMDT mostró una CE_{50} de 19.09 $\mu\text{g/mL}$. Este último y el hiperósido presentaron diferencias significativas con respecto al ácido gálico (**Tabla 7**).

Tabla 7. Concentración eficaz media (CE_{50}) del extracto metanólico de *D. tagetiflora*, el hiperósido, la quercetina y el ácido gálico para neutralizar el radical DPPH[•].

| SUSTANCIA | CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------|--------------------------------|
| EMDT | 19.0 \pm 0.9 ^a |
| Hiperósido | 12.7 \pm 0.3 ^b |
| Quercetina | 5.0 \pm 0.1 ^c |
| Ácido gálico | 4.6 \pm 0.13 ^c |

Extracto metanólico de *D. tagetiflora* (EMDT). La media de 8 repeticiones en 3 experimentos diferentes \pm D.S. Letras indican las diferencias significativas, medias que no comparten letra son significativamente diferentes $p > 0.05$.

Cabe mencionar que de no se evaluó la actividad antioxidante de la avicularina y su acetato debido al bajo rendimiento que presentaron.

8.4 Pruebas biológicas

8.4.1 Efecto genotóxico y citotóxico del EMDT en raíces de *V. faba* var. Minor

El EMDT no es genotóxico e induce la división celular en raíces de *V. faba* expuestas 48 horas al extracto. No existen diferencias significativas entre los valores de MCN para el EMDT (0.15 ± 0.058) y el control negativo (agua) (0.0 ± 0.0) indicando que el extracto no es genotóxico. Sin embargo, aumenta el IM con respecto al control negativo (27.02 ± 9.66), es decir, induce la división celular (**Tabla 8**).

Tabla 8. Efecto genotóxico y citotóxico del extracto metanólico de *D. tagetiflora* en células de raíz de *V. faba*.

| Tratamientos | MCN(%) | IM (%) |
|-----------------------|-----------------|--------------------|
| H ₂ O | 0.0 ± 0.0 | 27.02 ± 9.66^a |
| Agua/Glicerina (1:10) | 0.13 ± 0.95 | 26.53 ± 3.20^a |
| EMDT (200 µg/mL) | 0.15 ± 0.05 | 38.95 ± 6.88^b |

Extracto metanólico de *D. tagetiflora* (EMDT). Porcentaje de micronúcleos (MCN) e índice mitótico (IM). La media de 4 repeticiones con 1000 células en cada una \pm D.S. Letras indican diferencias significativas, medias que no comparten letra son significativamente diferentes $p > 0.05$.

8.4.2 Efecto citoprotector del EMDT en raíces de *V. faba* var. Minor

El efecto citoprotector del EMDT se evaluó en el modelo de raíces de *V. faba*. El daño celular se indujo con H₂O₂. El EMDT presentó efecto citoprotector, debido a que mostró una disminución significativa en la frecuencia de MCN cuando fue aplicado como pretratamiento, en comparación con el H₂O₂ (**Tabla 9 y Figura 12**).

Tabla 9. Efecto citoprotector del extracto metanólico de *D. tagetiflora* en células de raíz de *V. faba* expuestas a H₂O₂.

| Tratamientos | MCN (%) | IM (%) |
|--|-------------------|------------------|
| H ₂ O | 0.0 ± 0.0^a | 27.02 ± 9.66 |
| Agua/Glicerina (1:10) | 0.13 ± 0.95^a | 26.53 ± 3.20 |
| H ₂ O ₂ (400 µM) | 1.35 ± 0.17^b | 23.32 ± 2.72 |
| EMDT (200 µg/mL)/ H ₂ O ₂ (400 µM) | 0.90 ± 0.08^c | 27.85 ± 1.11 |

Extracto metanólico de *D. tagetiflora* (EMDT). Porcentaje de micronúcleos (MCN) e índice mitótico (IM). La media de 4 repeticiones con 1000 células en cada una \pm D.S. Letras indican diferencias significativas, medias que no comparten letra son significativamente diferentes $p > 0.05$.

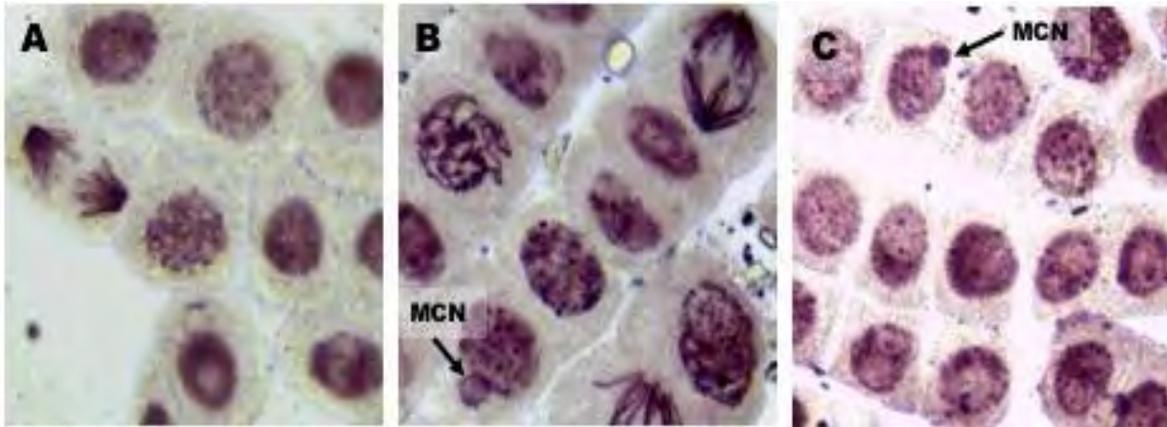


Figura 12. Fotografías representativas del ensayo de MCN (micronúcleos).

Células de *V. faba* tratadas con EMDT (A), H₂O₂ (B) y pretratamiento con EMDT y H₂O₂ (C). Las flechas negras señalan los MCN.

8.4.3 Efecto del EMDT en la viabilidad celular de HaCat

El efecto del EMDT en la viabilidad celular de la línea HaCat se evaluó con el ensayo de MTT determinando el porcentaje de viabilidad de las células. El EMDT induce la división celular de forma dependiente de la concentración, siendo significativo en concentraciones mayores a 1000 µg/mL (**Figura 13**).

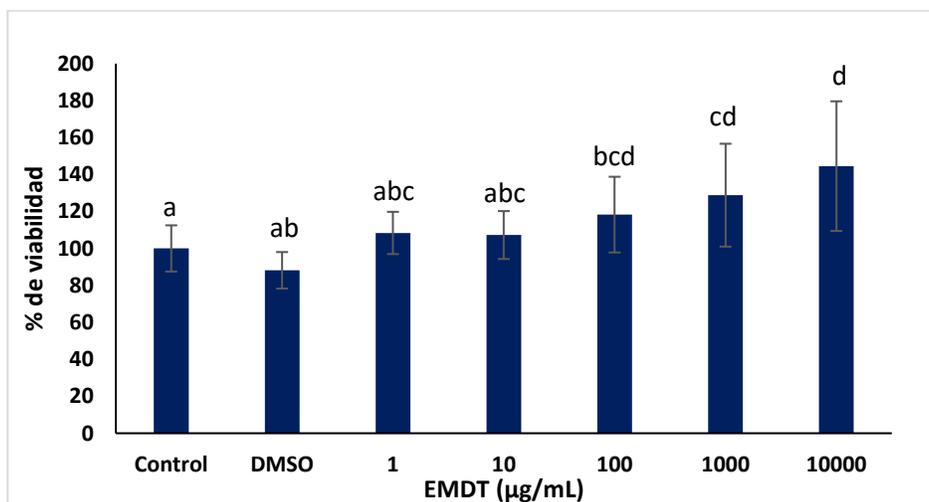


Figura 13. Efecto del extracto metanólico de *D. tagetiflora* sobre la viabilidad celular de HaCat.

Media de 3 repeticiones independientes ± D.S. Medias que no comparten letra son significativamente diferentes * $p > 0.05$.

9. DISCUSIÓN

Las plantas sintetizan un amplio conjunto de metabolitos secundarios con propiedades bioactivas. Farmacológicamente, los productos naturales representan una fuente potencial de agentes quimiopreventivos, por lo tanto, es necesario realizar estudios bioprospectivos de los metabolitos secundarios de las plantas. En los últimos años se ha incrementado el número de investigaciones al respecto, se estima que estas representan solo una pequeña proporción considerando el total de especies vegetales en el mundo. El presente estudio contribuye a ampliar el conocimiento de los metabolitos secundarios con propiedades bioactivas de la flora de México, en específico de *D. tagetiflora*, especie endémica del país.

De acuerdo con los rendimientos de los extractos obtenidos a partir de la parte aérea de *D. tagetiflora*, el EMDT presentó mayor cantidad de sólidos totales a partir de 1 Kg de la planta; esto indica que dicha especie se compone principalmente de compuestos polares. Además, cualitativamente el EMDT parece tener mejores propiedades antioxidantes en comparación con los dos extractos restantes (diclorometanólico y hexánico), aunque, los otros dos extractos también presentan dicha actividad. Lo que podría indicar la presencia de compuestos antioxidantes de baja, mediana y alta polaridad o la probable incidencia de uno o más compuestos antioxidantes en los tres extractos. Se ha demostrado que diversas especies vegetales contienen productos naturales que tienen la habilidad de reducir el estrés oxidativo, debido a que actúan como agentes antioxidantes, tal es el caso de *Tagetes patula* y *Tagetes erecta* (Martin-Puzon y Rivera, 2015; Yasheshwar et al., 2017).

Tomando en cuenta que el EMDT parece tener mejores propiedades antioxidantes aunado a su rendimiento, en este trabajo se decidió continuar estudiando únicamente el EMDT, ya que los intereses del presente estudio se enfocan principalmente a la búsqueda de plantas y sus metabolitos secundarios bioactivos.

Los productos naturales de las plantas de acuerdo a las rutas biosintéticas por las cuales son generados generalmente se clasifican en los tres grupos siguientes: fenoles, terpenos y alcaloides (Bourgaud et al., 2001). Las pruebas cualitativas de

los grupos de metabolitos secundarios en el EMDT muestran que éste presenta al menos dos grupos, siendo fenoles y terpenos.

La síntesis de metabolitos secundarios en plantas está regulada por diferentes factores incluyendo genéticos y evolutivos, así como las condiciones de crecimiento (clima, fotoperiodo, temperatura y luz), y las variaciones fisiológicas, entre otros (Asgari et al., 2017). En el reino Plantae se han identificado casi 100,000 metabolitos secundarios, algunos de estos se encuentran limitados a ciertos grupos taxonómicos. *D. tagetiflora* pertenece a la familia Asteraceae, la cual se caracteriza por presentar flavonoides en todas sus tribus (Maldonado, 2006) la máxima expresión de diversificación de este grupo de compuestos se encuentra en las tribus Anthemideae, Helenieae, Eupatorieae y Heliantheae, de acuerdo con la clasificación se considera dentro de ésta última a Tageteae, tribu a la que pertenece *D. tagetiflora* (Emerenciano, 2001). Diferentes especies de compuestas contienen lactonas sequiterpénicas en grandes concentraciones (Juárez et al., 2010), sin embargo, en la tribu Tageteae no se han reportado este tipo de compuestos (Anderberg et al., 2007; Simpson, 2009), aunque en el presente trabajo la prueba resulto positiva para este tipo de metabolitos, aunque no se descarta un resultado falso positivo. En cuanto a los alcaloides parecen no estar presentes en el EMDT de acuerdo con la prueba de Mayer, sin embargo, la de Dragendorff indica que el EMDT si contiene alcaloides, lo cual podría deberse a un falso positivo.

D. tagetiflora es una herbácea que crece en zonas que han sido perturbadas por el hombre, por lo cual podría estar sometida a constantes factores que generan un estado de estrés. Los fenoles en general han sido propuestos como indicadores de dicho estado en plantas, debido a que su concentración se eleva cuando estas se encuentran sometidas a algún tipo de estrés (Cartaya y Reynaldo, 2001). El contenido de fenoles totales del EMDT presentó 260 GAE/g de extracto, esto indica que el 26 % del extracto son compuestos fenólicos; dicha concentración es superior a la del romero (*Rosmarinus officinalis* 132.04 GAE/g de extracto) aunque menor a la del té verde (*Camellia sinensis* 387.25 GAE/g de extracto), ambos son utilizados

como extractos de referencia por sus propiedades antioxidantes debido a su contenido de compuestos fenólicos (Parejo, 2005).

Los compuestos aislados del EMDT, en el presente trabajo, son glicósidos derivados de la quercetina (**Figura 8**), un compuesto de tipo flavonol. Los flavonoles son un grupo comúnmente aislado en la familia Asteraceae, principalmente kaemferol, quercetina y los derivados glicosilados de ambos (Bohm y Stuessy, 2001).

La síntesis de flavonoides, especialmente la quercetina, se encuentra asociada con la respuesta de las plantas a la radiación ultravioleta (UV) (Verdaguer et al., 2017). La concentración de quercetina y sus derivados se relacionan linealmente con la intensidad de radiación UV en *Arabidopsis thaliana* (Gotz et al., 2010; Morales et al., 2010). *D. tagetiflora* fue colectada en la meseta del cerro del Toro, Guanajuato, a 1854 msnm, en lugares abiertos con mayor exposición a la radiación UV.

En el presente trabajo se encontró que *D. tagetiflora* contiene menor cantidad de quercetina comparado con sus derivados glicosilados (**Tabla 6**), similar a las especies del género *Tagetes*, en el cual se encuentran principalmente flavonoles y sus derivados glicosilados (Xu et al., 2012). Cabe mencionar que en plantas la quercetina se encuentra principalmente en su forma glicosilada, es decir, uno o más grupos hidroxilo son reemplazados por un azúcar, siendo la *O*-glicosilación en el carbono 3 el tipo de glicosilación más común en las asteráceas (Bohm y Stuessy, 2001). A éste carbono pueden unirse diferentes tipos de monosacáridos, entre ellos la galactosa y la arabinofuranosa, para formar dos tipos de glicósidos llamadas comúnmente hiperósido y avicularina, respectivamente. Dichos compuestos fueron aislados de *D. tagetiflora*, además del acetato de avicularina.

El hiperósido fue aislado por primera vez de *Hipericum perforatum* (Hierba de San Juan) aunque también se ha encontrado en especies de la familia Asteraceae como en *Artemisia capillaris* (Injin) (Yang et al., 2013). La concentración de hiperósido y avicularina, también se relaciona proporcionalmente con la exposición a la radiación UV de algunas plantas (Morales et al., 2010; Zhang et al., 2017; Nenadis et al., 2015). Además, la síntesis de hiperósido en dos especies del género *Hypericum* y

en *Calluna vulgaris* se correlaciona positivamente con la altitud de la localidad en la que crecen (Camas et al., 2014; Monshein et al., 2010). *D. tagetiflora* crece entre los 1600-2200 msnm. Se ha propuesto que la radiación UV podría ser la causa de la síntesis de compuestos antioxidantes en plantas que crecen en alturas elevadas (Camas et al., 2014).

Por otra parte, tres de los compuestos aislados del EMDT han sido motivo de estudio por diferentes investigadores con respecto a sus propiedades biológicas, en el caso de la quercetina destacan sus propiedades anti-cancerígenas, anti-inflamatorias, cardioprotectoras, neuroprotectoras, efecto anti-obesidad y antioxidantes (Gupta et al., 2016; Wang et al., 2016). Con respecto al hiperósido, presenta diferentes propiedades biológicas que incluyen actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antidepresivo, antibacterial, antiviral e inhibe el crecimiento de *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolítica* (Liu et al., 2005; Yang et al., 2013). Finalmente, la avicularina ha sido estudiada por sus propiedades fototóxicas, anticarcinogénicas, antioxidantes, hepatoprotectoras en el modelo generado por nitrofurano y cardioprotectoras contra el daño inducido por estrés oxidativo (Marzouk et al., 2007; Re-Bon et al., 2005; Kim et al., 2011; Imatomi et al., 2013). En lo que se refiere al acetato de avicularina no se encontraron estudios que mencionen sus propiedades bioactivas.

Cabe recalcar que los compuestos aislados en el presente trabajo se tratan de estructuras básicas de un flavonol. El metabolismo de este tipo de flavonoides se activa principalmente cuando se presentan cambios en la homeostasis REDOX de la célula, por lo que condiciones de estrés podrían inactivar enzimas antioxidantes y a su vez activar la biosíntesis de dichos compuestos (Agati et al., 2012). Se ha propuesto que los flavonoles son el principal grupo de flavonoides que actúan como agentes antioxidantes en las plantas (Monshein et al., 2010).

En el presente estudio el EMDT y dos de sus compuestos, quercetina e hiperósido, presentaron actividad antioxidante. Ambos compuestos se encuentran orto-di-hidroxilados en el anillo B, por lo cual son más efectivos que los mono-hidroxilados formando complejos con los iones de Fe y Cu, para inhibir la reacción de Fentón y

la posterior generación de radicales libres. Este tipo de metabolitos tienen la habilidad de donar electrones o átomos de hidrógeno, neutralizando los radicales libres (Agati et al., 2012), como el radical DPPH^{*}, lo que explica sus propiedades antioxidantes.

La quercetina presentó mayor potencial antioxidante con respecto al hiperósido, probablemente por la diferencia estructural que hay entre éstos; es decir, la quercetina presenta un grupo hidroxilo (OH) en el carbono 3 (3-OH), en el hiperósido éste OH está unido a una molécula de galactosa (**Figura 8**). La actividad antioxidante de los flavonoles se debe en gran medida al OH presente en el carbono 3. Además, los flavonoles con un 3-OH, presentan una estructura plana, configuración sp², esto permite que se genere conjugación y por lo tanto deslocalización electrónica lo que proporciona estabilidad al radical flavonoide. El cambio del 3-OH por la galactosa en el hiperósido anula la coplanaridad y por lo tanto compromete su actividad antioxidante (Heim et al., 2002).

Debido al bajo rendimiento que presentaron los compuestos avicularina y su acetato no fue posible estudiar sus propiedades antioxidantes. Los compuestos evaluados presentaron valores de CE₅₀ menores en comparación con el EMDT (**Figura 7**), sin embargo, se debe tomar en cuenta que el EMDT está constituido por una mezcla de diferentes compuestos y no todos presentan propiedades antioxidantes. De acuerdo con los parámetros de concentración para antioxidantes utilizados en alimentos publicados por la Food and Drug Administration (FDA), el EMDT podría ser utilizado como antioxidante natural debido a su potencial como tal.

Por otra parte, un agente causal de estrés oxidativo es el H₂O₂, una especie reactiva de oxígeno, que genera daño al organismo principalmente por su capacidad de reaccionar con iones metálicos de transición (Fe²⁺ y Cu¹⁺) generando el radical libre hidroxilo (OH^{*}) (Halliwell, 2006). Se ha propuesto que los flavonoles presentes en vacuolas neutralizan el H₂O₂ en una reacción catalizada por peroxidasas. Estudios en hojas de *Schefflera arboricola* y de *V. faba* han mostrado que los glicósidos de quercetina actúan de esta manera (Takahama, 1988; Yamasaki et al., 1997; Gould y Lister, 2006). El EMDT presentó propiedades citoprotectoras, previniendo la

formación de micronúcleos generados por H₂O₂ en células de *V. faba* (**Tabla 9**). El flavonol glicosilado más abundante en el EMDT fue el hiperósido. Este compuesto posee efecto citoprotector frente al estrés oxidativo. Además de sus propiedades para neutralizar radicales libres y quelar metales de transición, se ha reportado que protege a las células hepáticas (L02) y epiteliales (HLE-B3) del daño inducido por H₂O₂ regulando positivamente la expresión del gen antioxidante hemo-oxigenasa 1 (OH-1), es decir, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes (Hai-Yang et al., 2011; Park et al., 2016). También protege a los fibroblastos de pulmón del H₂O₂ a través de la neutralización de especies reactivas de oxígeno (Piao et al., 2008). Con respecto a la avicularina, presenta propiedades hepatoprotectoras y cardioprotectoras sobre hepatocitos (HepG2) y cardiomiocitos (H9c2) respectivamente, frente al daño inducido por estrés oxidativo (Kim et al., 2011). Se ha reportado que la quercetina presenta propiedades citoprotectoras sobre el daño inducido por luz UV-A en queratinocitos humanos, induciendo la expresión de genes antioxidantes (Kimura et al., 2009).

Finalmente, los micronúcleos generados por el EMDT en raíces de *V. faba* no presentan diferencia significativa con respecto a los generados por el control negativo (agua) (**Tabla 8**), esto muestra que el EMDT no es genotóxico, lo que podría indicar que los compuestos presentes en el EMDT no generan daño al ADN. Dicho extracto también aumenta significativamente el índice mitótico (**Figura 8**) en raíces de *V. faba*. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos sobre el EMDT en la viabilidad celular de keratinocitos (HaCat), en los cuales se observa que el EMDT no presenta efectos citotóxicos, sin embargo, a concentraciones a partir de 1000 µg/mL aumenta significativamente la viabilidad celular (**Figura 13**). Esto va de acuerdo con los efectos citoprotectores reportados para los compuestos aislados en el EMDT. Además, Yang y colaboradores en 2016 reportaron que el hiperósido incrementa significativamente la viabilidad de melanocitos humanos en forma dependiente de la concentración. Por lo tanto, el EMDT podría ser una alternativa en la búsqueda de metabolitos secundarios con propiedades quimioprotectoras.

D. tagetiflora se compone principalmente por compuestos de tipo polar tales como glucósidos, fenoles, y terpenos. Los compuestos aislados del EMDT, son todos flavonoles derivados de quercetina, en mayor concentración hiperósido, seguido de avicularina, acetato de avicularina y quercetina. El EMDT mostró actividad antioxidante y citoprotectora esta última preveniendo la formación de micronucleos inducida por H₂O₂ en raíces de *V. faba*. Ambas propiedades se deben posiblemente a los compuestos aislados mencionados anteriormente. El EMDT no mostró genotoxicidad e induce la división celular en raíces de *V. faba*. Además, el EMDT no es citotóxico sobre la línea celular HaCat. Finalmente, basado en las propiedades biológicas que mostró el EMDT se podría considerar a éste como una fuente de compuestos quimioprotectores.

10. CONCLUSIONES

- La parte aérea de *D. tagetiflora* está compuesta principalmente de compuestos polares.
- Todos los extractos de diferente polaridad mostraron propiedades antioxidantes de forma cualitativa.
- El extracto metanólico de *D. tagetiflora* presenta glucósidos, fenoles y terpenos.
- Los principales compuestos polares de la parte aérea de *D. tagetiflora* son hiperósido seguido de avicularina, acetato de avicularina y quercetina.
- El extracto metanólico de *D. tagetiflora* contiene un 26% de compuestos fenólicos.
- El potencial antioxidante cuantitativo de las muestras evaluadas fue quercetina>hiperósido>extracto metanólico de *D. tagetiflora*.
- El extracto metanólico de *D. tagetiflora* no es genotóxico, además presenta efecto citoprotector frente al daño inducido por H₂O₂ en raíces de *V. faba*.
- El extracto metanólico de *D. tagetiflora* no es tóxico sobre la línea celular HaCat.
- El extracto metanólico de *D. tagetiflora* induce la división celular en células de *V. faba* y en la línea celular HaCat.

11. REFERENCIAS

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. y Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidant in plants: Location and functional significance. *Plant Science*. 196:67-76
- Asgari, L., Ghorbanpour, M. y Nikabadi, S. 2017. Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 145:377-390.
- Askin, Ç. y Aslantürk, Ö. 2006. Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. *Biología Bratislava*. 61(6):693-297.
- Alvarenga, S. A. V., Ferreira, M. J. P., Emerenciano, V. P., y Cabrol-Bass, D. 2001. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: Characterization of tribes by principal component analyses. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 56:27-37.
- Anderberg, A. A., Baldwin, B. G., Bayer, R. G., Breitwieser, J., Jeffrey, C., Dillon, M. O., Eldenäs, P., Funk, V., García-Jacas, N., Hind, D. J. N., Karis, P. O., Lack, H. W., Nesom, G., Norendenstam, B., Oberprieler, CH., Panero, J. L., Puttock, C., Robinson H., Stuessy, T. F., Susanna, A., Urtubey, E., Vogt, R., Ward, J. y Watson, L. E. Compositae. In: The families and genera of vascular plants. Kadereit, J. W. y Jeffrey, J. 2007. Springer Berlin Heidelberg New York.
- Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99:325-358.
- Arroo, R. R. J., Jacobs, J. J. M. R., Van Gestel, J. A. M., Kenkel, H., Jannink, W., Croes, A. F. y Wullems, G. J. 1997. Regulation of tiophene biosynthesis by sulphate in roots of marigolds. *New Phytology*. 135:175-181.

- Bakar, F., Bahadir, O., Ergene, B., Nebioglu, S. y Saltan, G. 2015. Antioxidant activity and phytochemical screening of some Asteraceae plants. *Turkish Journal Pharmaceutical Sciences*. 12(2):123-132.
- Baldwin, G. B. Heliantheae alliance. In: Systematic evolution and biogeography of Compositae. Funk, A. V., Susanna, A., Stuessy, F. T. y Bayer, J. R. 2009. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria.
- Behnam, A. L., Mansour, G. y Shahab, N. 2017. Heavy metals in contaminated environment: destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 145:377-390.
- Benedí, J., Arroyo, R., Romero, C., Aragón, S. y Villar, A. 2004. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Life Science*. 75:1263-1276.
- Besada, M. F., Barreira, C. M. y Oliveira, P. P. 2015. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential application: A review. *Industrial Crops and Products*. 76:604-615.
- Blunder, M., Orthaber, A., Bauer, R., Bucar, F. y Kunert, O. 2017. Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments. *Food Chemistry*. 218:600-609.
- Bohlmann, F. 1990. Chemistry of the Heliantheae (Compositae). *Plant System Evolution*. 4:67-75.
- Bohlmann, F., Zdero, C. y Grenz, M. 1976. Inhaltsstoffe einiger Gattungen der Tribus Helanieae und Senecioneae. *Phytochemistry*. 15:1309-1310.
- Bohlmann, F. y Zdero, C. 1979. Über Dimere Terpenketone aus *Tagetes gracilis*. *Phytochemistry*. 18:341-343.
- Bohm, A. B. y Stuessy, F. T. 2001. Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae). Springer-Verlag Wien New York. 837 p.

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. y Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161:839-851.
- Calabria, M. L., Emerenciano, P. V., Scotti, T. M. y Mabry, J. T. En: Systematic evolution and biogeography of Compositae. Funk, A. V., Susanna, A., Stuessy, F. T. y Bayer, J. R. 2009. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria.
- Camas, N., Radusiene, J. y Ivanauskas, L. 2014. Altitudinal in the content of bioactive substances in *Hypericum orientale* and *Hypericum pallens*. *Acta Physiological Plant*. 36:675-686.
- Caroch, M. y Ferreira, C. F. 2013. A review an antioxidants pro-oxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds screening, and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51:15-25.
- Cartaya, O. y Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22(2):5-14.
- Coy, C., Parra, J. y Cuca, L. 2014. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (rutaceae). *Revista Elementos*. 4:31-39.
- Dominguez, X. 1979. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. 219 p.
- Downum, K. R. y Towers, G. H. N. 1985. Analysis of thiophenes in the Tageteae (Asteraceae) by HPLC. *Journal Natural Products*. 46:98-103.
- Dewick, M. P. 2009. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. 3rd ed. John Wiley and Sons. United Kingdom. 539 p.
- Emerenciano, V. P., Militao, J. S. L. T., Campos, C. C., Romoff, P., Kaplan, M. C A., Zambon, M. y Brant, A. J. C. 2001. Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Asteraceae*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 29:947-957.
- Fair, J.D. y Kormos, C.M. 2008. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. *Journal of Chromatography*. 1211:49–54.
- Funk, A. V., Susanna, A., Stuessy, F. T. y Robinson, H. Classification of Compositae En: Chapter 11: Systematic evolution and biogeography of

Compositae. Funk, A. V., Susanna, A., Stuessy, F. T. y Bayer, J. R. 2009. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria.

- Gotz, M., Albert, A., Stich, S., Heller, W., Scherbs, H., Krins, A., Langebartels, C., Seidlitz, K. y Ernts, D. 2010. PAR modulation of the UV-dependent levels of flavonoids metabolites in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. leaf rosettes: cumulative effects after a whole vegetative growth period. *Protoplasma*. 243:95-103.
- Gould, S. y Lister, C. 2006. Flavonoid functions in plants. En: Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. Andersen M. y Markham, R. Taylor & Francis. New York.
- Gupta, A., Birhman K., Raheja I., Kumar S. y Kumar K. 2016. Quercetin: A wonder bioflavonoid with therapeutic potential in disease management. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 6(3):248-252.
- Guitierrez-Lugo, M. T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramírez-Gama, R. M., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extract from Mexican Medicinal Plants. *Phytomedicine*. 2:341-347.
- Hai-Yan, X., Yao, L., Jian-Hong, C., Feng-Jun, S., Hui-Qing, S. y Pei-Yuan, X. 2011. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap1-Nrf2-ARE signalling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 410:759-765.
- Harborne, B. y Baxter, H. 1993. Phytochemical dictionary. A-Handbook of bioactive compounds from plants. London Washington, DC. Taylor & Francis, pp. 543.
- Heim, E., Tagliaferro, R. y Bobilya, D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:572-584.
- Heinrich, M. 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38:539-565.
- Imatomi, M., Novaes, P., Matos, P., Gualtieri, C. J., Molinillo, M. G., Lacrete, R., Varela, M. y Macías, A. 2013. Phytotoxic effect bioactive compounds

isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*. 46:29-35.

- INEGI. Marco geoestadístico municipal. 2005. http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/11/11002.pdf. Visto 20 de enero de 2017.
- Iyengar, S., Arnason, T., Philogene, R., Morand, P., Werstiuk, N. y Timminst, G. 1987. Toxicokinetics of the phototoxic allelochemical α -terthienyl in three herbivorous lepidoptera. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 29:1-9.
- Jansen, K. R., Michaels, J. H. y Palmer, D. J. 1991. Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast DNA restriction site mapping. *Systematic Botany*. 16:98-115
- Juárez, B., Jasso, Y., Aguirre, J. y Jasso, I. 2010. Efecto de polvos de asteráceas sobre el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Motsh). *Polibotánica*. 30:123-135.
- Kim, M., Kang, K., Jho, H., Jung, J. Y., Nho, C., Um, B. H. y Pan, C. H. 2011. Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lespedeza cuneate* against oxidative stress induced by tert-butyl hyperoxide. *Phytotherapy Research*. 25:1011-1017.
- Kimura, S., Warabi, E., Yanagawa, T., Ma, D., Itoh, Y., Ishii, Y., Kawachi, Y. y Ishii, T. 2009. Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochemical Biophysical Research Communication*. 387(1):109-14.
- Kenny O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M. y Brunton, N. P. 2014. Investigating the potential of under-utilised plants from Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*. 161:79-86
- Liu Z., Tao X., Zhang C., Lu Y. y Wei D. 2005. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-O-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 59:481-490.

- Loockerman, J. D., Turner, L. B. y Jansen, K. R. 2003. Phylogenetic relationships within the Tageteae (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and Chloroplast ndhF Gene Sequences. *Systematic Botany*. 28:191-207.
- Lopes, D., Alvian, S. D., Alviano, S. C. y Kolodziejczyk, P. P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 69:1732-1738.
- López, A. y Denicola, A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chemical Acta*. 763:1-10.
- Ma, T.H., Xu, Z., y Xu, C., McCornell, H., Ravabo, E.V., Arreola, G.A. y Zhang, H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*. 334:185–195.
- Maldonado, R. 2006. Estudio Fitoquímico de *Roldana lineolata*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 106 p.
- Mapes, C. y Basurto F. 2016. Biodiversity and Edible Plants of Mexico. En: Ethnobotany of Mexico, Ethnobiology. New York. Springer.
- Maroti, I., Maroti, M., Piccaglia, R., Nastri, A., Grandi, S. y Dinelli, G. 2010. Thiophene occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as source of biocidal substances. *Journal Sciences Food Agricultural*. 90:1210-1217.
- Martin-Puzon y Rivera, W. 2015. Scavenging activity and bioactive secondary metabolites from various extracts of *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. (Molluginaceae), roots, stems and leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5(9):711-715.
- Marzouk, M. S., Soliman, F. M., Shehata, I. A., Rabee, M. y Fawzy, G. A. 2007. Flavonoids and biological activities of *Jussiaea repens*. *Natural Product Research*. 21:5, 436-443.
- Minto, E. R. y Blacklock, J. B. 2008. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. *Progress in Lipid Research*. 47:233-306.

- Monshein, M., Iglesias, J., Kunert, O. y Bucar, F. 2010. Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L) Hull) and its altitudinal alteration. *Phytochemistry Reviews*. 9:205-215.
- Morales, L. O., Tegelberg, R., Brosché, M., Keinänen, M., Lindfors, A. y Aphalo P. J. 2010. Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiology*. 30:923-934.
- Negri, R. 2015. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia*. 106: 92-109.
- Nenadis, N., Lloren, L., Koufogianni, A., Díaz, L., Font, J., Gonzalez, J. A. y Verdaguer, D. 2015. Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 153:435-444.
- Nikapitiya, C. 2012. Bioactive secondary metabolites from marine microbes for drug discovery. *Advances in Food and Nutrition Research*. 65:363-387.
- Panero, L. J. y Funk, V. A. 2002. Toward a phylogenetic subfamilia classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 115:909-922.
- Panero, L. J. y Funk, V.A. 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 47:757-782
- Park, J. Y., Piao, M. J., Oh, M. C., Fernando, P. M., Kang, K. A., Ryu, Y. S., Junq, U., Kim, I. G. y Hyun, J. W. 2016. Hyperoside induce endogenous antioxidant system to alleviate oxidative stress. *Journal Cancer Prevention*. 21(1):41-47.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M., Jiménez, M. y Codina, C. 2003. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*. 73(13):1667-1681.

- Pelsler, B. P. y Watson, E. L. Chapter 33: Introduction to Asteroideae. En: Systematic evolution and biogeography of Compositae. Funk, A. V., Susanna, A., Stuessy, F. T. y Bayer, J. R. 2009. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria.
- Pérez-Amador, Herrera, M., Muñoz, V., Vives, J. y García, F. 2004. Phototoxic compounds in 3 *Dyssodia* species (*Asteraceae*). *International Journal of Experimental Botany*. 115-117.
- Petinatti, P. D., Petinatti P. S., Niehues, M. y Peoperine, L. N. 2012. Exogenous influence on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science Technology*. 176:215-216.
- Piao, M., Kang, A., Zhang, R., Ko, O., Wang, H., You, J., Kim, S. H., Kim, S. J., Kang, S. y Won, H. 2008. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1780:1448-1457.
- Pichersky, E. y Raguso, A. R. 2016. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytology*. Review.
- Pisochi, M. A. y Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97:55-74.
- Rajendran, P., Nandukumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Nesamony, E., Lakshminarasiah, U., Gopas, J. y Nishigaki, I. 2014. Antioxidants and human diseases. *Clinical Chimica Acta*. 436:332-347.
- Ramón, G. E. 2006. Técnicas básicas de cultivo de células y tejidos animales. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Morfología. Lab de Citopatología Ambiental. México.
- Ray, D., Huang, B.W. Y y Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*. 24:981-990.
- Robinson, H. 1981. A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (*Asteraceae*). Smithsonian Institute Press. Washington.
- Rodríguez, C., Egas, V., Linares, E., Bye, R., Hernandez, T., Espinosa, G., y Delgado, G. 2017. Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. *Asteraceae*:

- Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 195:39-63.
- Rojas, A., Bah, M., Rojas, I., Serrano, V. y Pacheco, S. 1999. Spasmolytic activity of some plants used by Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*. 6(5):367-371.
 - Sae-Kwang, K., Tae, H. K., Sangkyu, L., Seong, M. K. y Jong-Sup, B. 2013. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isohamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. *Food and Chemical Toxicology*. 53:197-204.
 - Seaman, F. 1982. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the *Asteraceae*. *The Botanical Review*. 48(2):121-594.
 - Sepulveda, J., Porta, D. y Rocha, S. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):355-363.
 - Simpson, B. B. Economic importance of Compositae. En: *Systematic evolution and biogeography of Compositae*. Funk, A. V., Susanna, A., Stuessy, F. T. y Bayer, J. R. 2009. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria.
 - Singleton, L.V., Orthofer, R. y Lamuela, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152-178.
 - Siracusa, L. y Ruberto, G. 2014. Plant polyphenol profiles as a tool for traceability and valuable support to biodiversity. En: R. Ros Watson. 2014. *Polyphenols in plants*, 1st ed. [online] University of Arizona, Tucson, AZ, USA.: Academic Press, pp.15-33.
 - Shaidi, F. y Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 17:757-1200.
 - Shemluck, M. 1982. Medicinal and other uses of the Compositae by Indians in the United States and Canada. *Journal of Ethnopharmacology*. 5:303-358.
 - Strother, J. L. 1977. Tageteae-systematic review. En: Heywood, V. H., Harbone, J. B. y Turner, B. L. (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*, vol. 2. Academic Press, London.

- Strother, J L. 1986. Renovation of *Dyssodia* (Compositae: Tageteae). *Contribution to Botany*. 11:371-378.
- Takahama, U. 1988. Oxidation of flavonols by hydrogen peroxide in epidermal and guard cell of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiology*. 29(3):433-438
- Talapatra, S. K. y Talapatra, B. 2015. Introduction: Enzymes. Cofactors/Coenzymes. Primary and Secondary Metabolites. Natural products and their Functions. Plant Chemical Ecology. Biosynthesis. Metabolic Pathways. En: Chemistry of Plant Natural Products. Berlin Heide Iberg. Springer.
- Tellez, R. M., Estell, E. R., Fredrickson, L. E. y Havstad, M. K. 1997. Essential oil of *Dyssodia acerosa* DC. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 45:3276-3278.
- Verdaguer, D., Jansen, A. K., Llorens, L. y Morales, O. 2017. UV-A radiation effects on higher plants: exploring the known unknown. *Plant Science*. 255:72-81.
- Verma, N. y Shukla, S. 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2:105-113.
- Villarreal, A., Villaseñor, J. y Medina, L. 2008. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 57 p.
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(3):559-902.
- Wagner, H. y Bladt, S. 2001. Plant Drug Analysis. 2 ed. Berlin Heidelberg. New York. Springer. 385 p.
- Wang W., Sun C., Mao L., Ma P, Liu F, Yang J, y Gao Y. 2016. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 56:21-38.
- Xu, LW., Chen, J., Qi, H. y Shi, YP. 2012, Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*. 4(2):103-117.

- Yamasaki, H., Sakihama, Y. y Ikehara, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology*. 115:1405-1412.
- Yang, B., Yang, Q., Yang, X., Yan, H. y Lu, Q. 2016. Hyperoside protects human primary melanocytes against H₂O₂-induced oxidative damage. *Molecular Medicine Reports*. 13:4613-4619.
- Yang J., Qian D., Guo J., Jiang S., Shang E., Duan J. y Xu J. 2013. Identification of the major metabolites of hyperoside produced by the human intestinal bacteria using the ultra performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Ethnopharmacology*. 147:174-179.
- Yasheshwar, Umar, S., Sharma, M., Khan, W. y Ahmad, S. 2016. Variation in ornamental traits, physiological responses of *Tagetes erecta* L. and *T. patula* L. in relation to antioxidant and metabolic profile under deficit irrigation strategies. *Scientia Horticulturae*. 214:200-208.
- Zdero, C. y Boholmann, F. 1990. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Plant Systematics and Evolution*. 171:1-14.
- Zhong J. J. 2010. Plant secondary metabolites. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. 6:3883-3819.
- Zhang, H., Wu, Z., Suo, Y., Wang, J., Zheng, L. y Wang, Y. 2017 Gene expression and flavonol biosynthesis are induced by ultraviolet-B and salt stresses in *Reaumuria trigyna*. *Biologia Plantarum*. 61(2):246-254.

12. APÉNDICES

Apéndice 1. Área de colecta (INEGI, 2005)

El municipio de Acámbaro se localiza en la región sureste del estado de Guanajuato, colinda al norte con los municipios de Salvatierra, Tarimoro y Jerécuaro, al este con los municipios de Jerécuaro y Tarandacuao, al sur con el Estado de Michoacán de Ocampo y al oeste con el municipio de Salvatierra y el Estado de Michoacán de Ocampo. Su extensión territorial representa el 2.9% de la superficie total del estado de Guanajuato (INEGI, 2005)

Se presentan dos tipos de clima en el municipio, semicálido y subhúmedo. Entre mayo y junio se alcanzan las temperaturas máximas hasta de 35°C, los meses con temperaturas más bajas son enero y febrero con un promedio de 5°C. La temperatura media anual es de 18 °C.

El municipio de Acámbaro se caracteriza por la presencia de zonas montañosas distribuidas a lo largo de todo el municipio, principalmente la Sierra de los Agustinos. Aunque también presenta cerros tales como el Cerro del Toro a 1884 metros sobre el nivel del mar. El tipo de vegetación es principalmente selva (16.3%), bosque (8.1%), pastizal (5.3%) y mezquital (0.2%). El municipio se localiza dentro de la región hidrológica del río Lerma, el cual capta un gran número de escurrimientos de las zonas montañosas. El uso de suelo es principalmente agrícola y zona urbana.

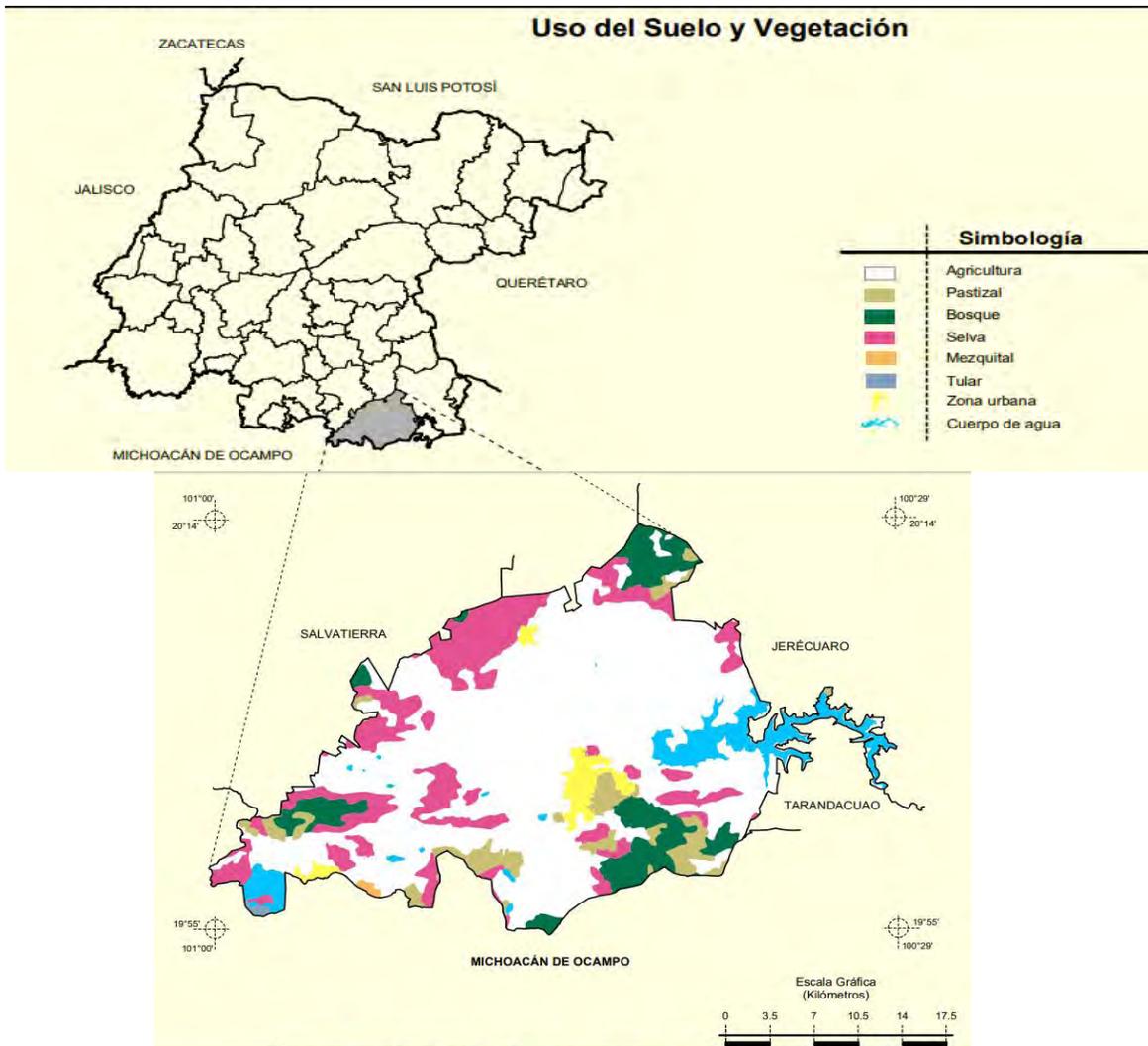
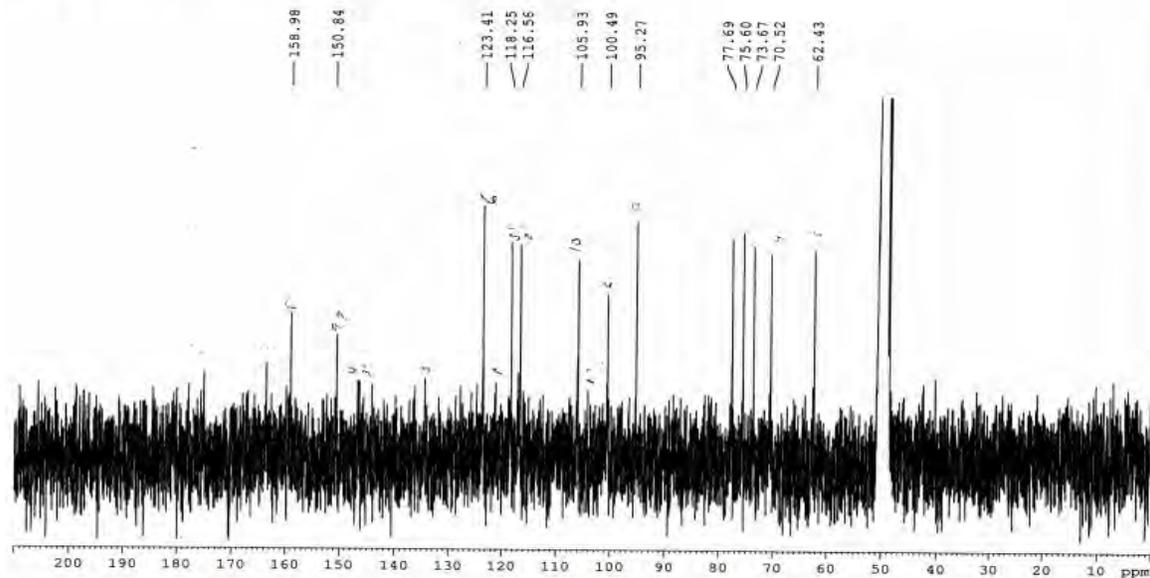


Figura 14. Uso de suelo y vegetación del Municipio de Acambaro, Guanajuato.
Tomado de INEGI. Marco Geoestadístico municipal. 2005.

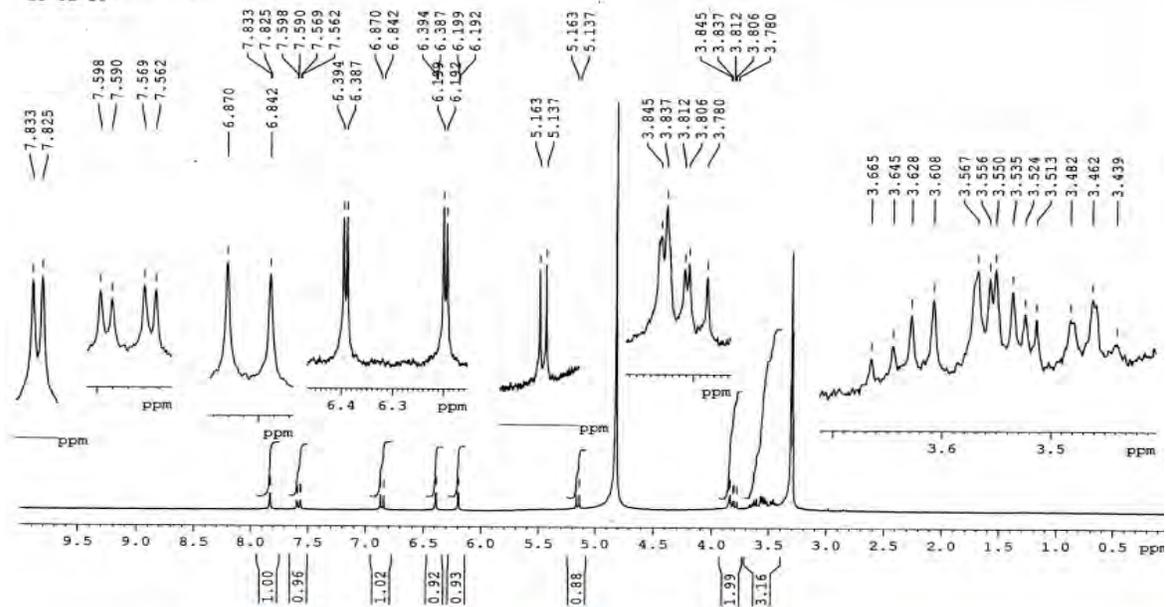
Apéndice 2. Espectros de RMN ^{13}C y ^1H de los compuestos aislados de *D. tagetiflora*.

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. A. Romo - Guillermo
 Clave : D1 10-20
 No. de Registro 228
 Disolvente: CD3OD
 Experimento: 1H
 Bruker Avance Digital 300 MHz
 23-02-16



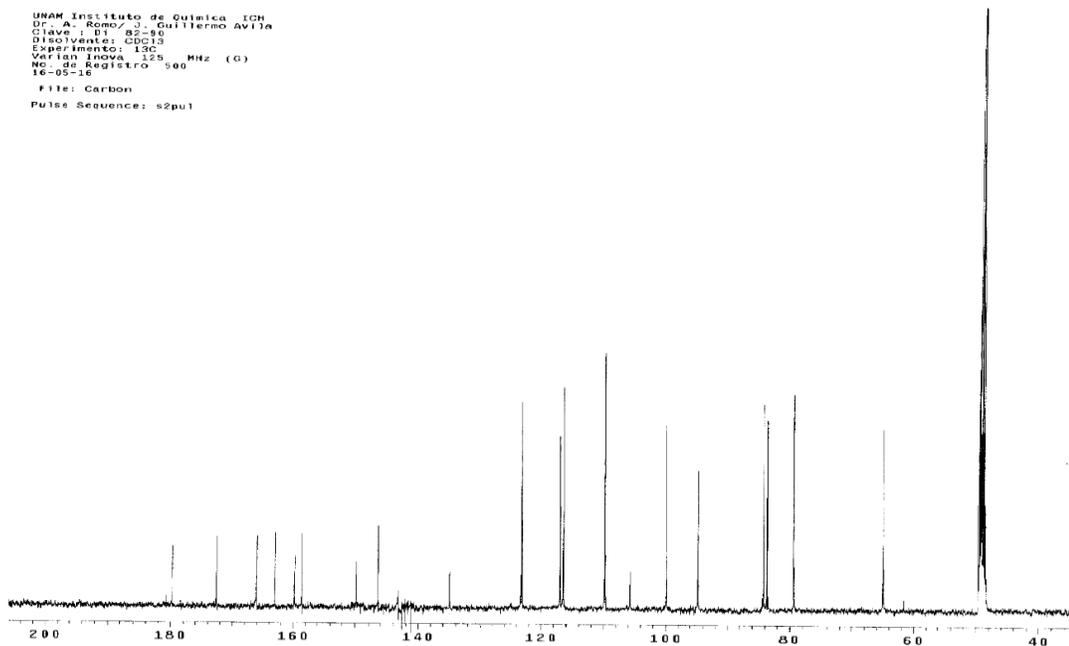
RMN ^{13}C Hiperósido.

Clave : D1 10-20
 No. de Registro 228
 Disolvente: CD3OD
 Experimento: 1H
 Bruker Avance Digital 300 MHz
 23-02-16



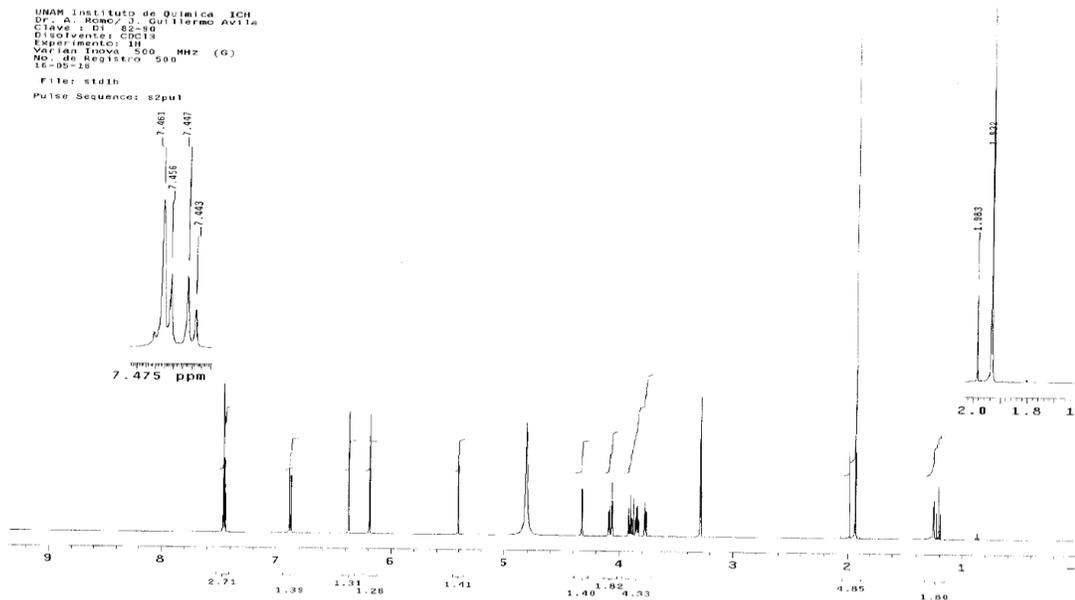
RMN ^1H Hiperósido

UNAM Instituto de Quimica ICH
 Dr. A. Romo / J. Guillermo Avila
 Clave: DI 82-90
 Disolvente: CDCl3
 Experimento: 13C
 Varian Inova 125 MHz (G)
 No. de Registro 500
 16-05-15
 File: Carbon
 Pulse Sequence: s2pu1



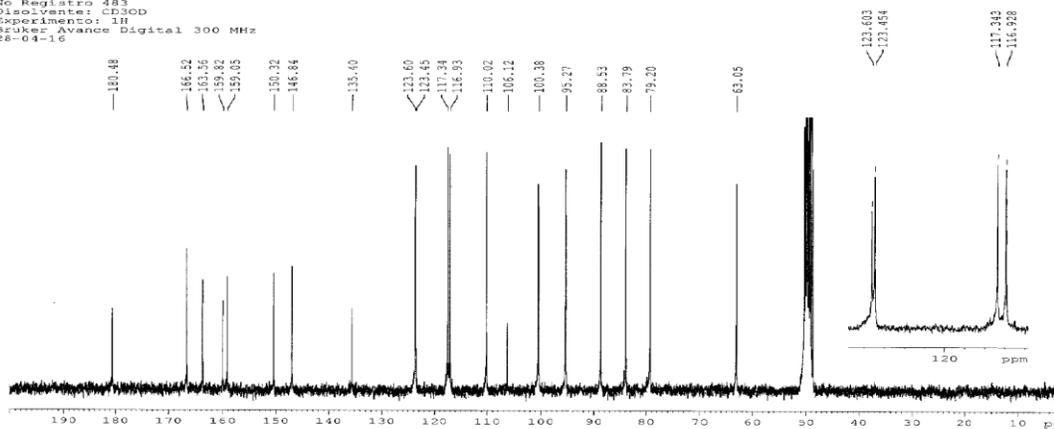
RMN ¹³C Avicularina

UNAM Instituto de Quimica ICH
 Dr. A. Romo / J. Guillermo Avila
 Clave: DI 82-90
 Disolvente: CDCl3
 Experimento: 1H
 Varian Inova 500 MHz (G)
 No. de Registro 500
 16-05-15
 File: st01h
 Pulse Sequence: s2pu1



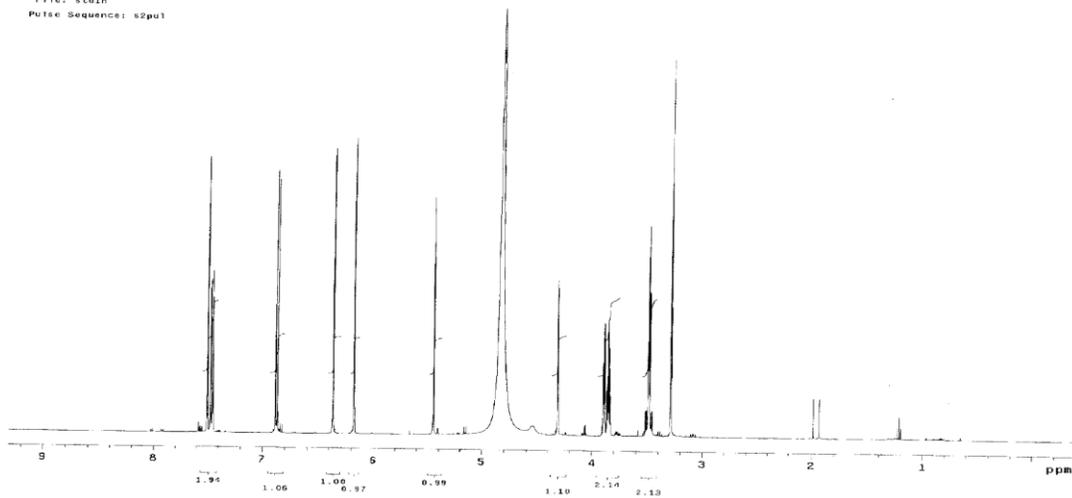
RMN ¹H Avicularina

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. A. Romo
 Clave : DI 114
 No Registro 883
 Disolvente: CD3OD
 Experimento: 1H
 Bruker Avance Digital 300 MHz
 28-04-16



RMN ^{13}C Acetato de Avicularina

UNAM Instituto de Quimica ICH
 Dr. A. Romo, J. Guillermo Avila
 Clave : DI 114
 Disolvente: CD3OD
 Experimento: 1H
 Varian Inova 500 MHz (G)
 No. de Registro 502
 16-01-16
 File: std1h
 Pulse Sequence: s2pul



RMN ^1H Acetato de Avicularina