



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
DE ALTA RESOLUCIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE
FLAVONOIDES EN PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LAURA ADRIANA GALLEGOS RAMÍREZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ

No. Adq. 471153

No. Título _____

Clas. TS 544.924

6166a



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“APLICACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS
DE ALTA RESOLUCIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE
FLAVONOIDES EN PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS”**

TESIS INDIVIDUAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA**

LAURA ADRIANA GALLEGOS RAMÍREZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH
DIRECTOR

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA
SINODAL

M. en C. MIGUEL ÁNGEL RICO RODRÍGUEZ
SINODAL

M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ
SINODAL

RESUMEN

Los flavonoides constituyen, después de los carotenoides, la clase de metabolitos secundarios más importantes y atractivos, debido a sus propiedades antioxidantes que los convierten en excelentes agentes preventivos de numerosas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como el cáncer, la diabetes, los padecimientos cardiovasculares, el envejecimiento, etc. Por esta razón, es importante analizar su presencia en plantas medicinales y alimenticias. El objetivo de esta investigación consistió en determinar la presencia de los flavonoides más comunes en algunas plantas medicinales usadas en Querétaro y en otras zonas de la República Mexicana para el tratamiento de padecimientos relacionados con el estrés oxidativo, en particular la circulación sanguínea. Las plantas seleccionadas en base a los usos tradicionales y a la información bibliográfica etnomédica incluyeron las siguientes: *Chenopodium murale*, *Psittacanthus calyculatus*, *Prunus serotina*, *Agastache palmeri*, *Taxodium mucronatum*, *Solanum rostratum*, *Bocconia frutescens*, *Sechium edule*, *Dracocephalum moldavica* y *Magnolia grandiflora*. Como estándares, se utilizaron los flavonoides quercetina, kaempferol, catequina, hesperitina y rutina. Como método analítico, se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución y como criterio de identificación se compararon los tiempos de retención de los estándares y los de los picos correspondientes en los extractos acuosos. Los resultados indican que los flavonoides buscados se encuentran presentes en varias de las especies vegetales, siendo los más comunes la quercetina, la hesperitina y la catequina.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Estudios químicos y farmacológicos de las plantas medicinales seleccionadas	3
II.1.1 <i>Chenopodium murale</i>	3
II.1.2 <i>Psittacanthus calyculatus</i>	4
II.1.3 <i>Prunus serotina</i>	5
II.1.4 <i>Agastache palmeri</i>	6
II.1.5 <i>Taxodium mucronatum</i>	6
II.1.6 <i>Solanum rostratum</i>	7
II.1.7 <i>Dracocephalum moldavica</i>	8
II.1.8 <i>Magnolia grandiflora</i>	9
II.1.9 <i>Sechium edule</i>	10
II.1.10 <i>Bocconia frutescens</i>	10
II.2 Actividades biológicas relevantes de algunos flavonoides comunes	11
II.2.1 Quercetina	11
II.2.2 Rutina	12
II.2.3 (+)-Catequina y hesperidina	13
II.2.4 Galato de epigallocatequina	13
II.2.5 Kaempferol	14
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS	16

IV.1 General	16
IV.2 Específicos	16
V. METODOLOGÍA	17
V.1 Materiales	17
V.1.1 Accesorios	17
V.1.2 Disolventes y reactivos para los análisis cromatográficos	17
V.1.3 Material de estudio	17
a) Flavonoides que se utilizaron como estándar	18
b) Extractos acuosos que se analizaron	18
V.2 Equipos	18
V.3. Métodos	18
V.3.1 Obtención de los extractos acuosos	18
V.3.2 Preparación de las muestras para análisis	19
V.3.2.1 Hidrólisis ácida de los extracto	19
V.3.2.2 Preparación de las muestras sólidas	19
V.3.3 Identificación de los flavonoides mediante CLAR	19
VI. RESULTADOS	21
VII. DISCUSIÓN	40
VIII. CONCLUSIONES	44
IX. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Condiciones isocráticas probadas durante el análisis de estándares	21
2	Gradiente usado durante la búsqueda de condiciones óptimas de análisis de estándares y extractos	21
3	Tiempos de retención experimentales obtenidos en las mismas condiciones analíticas para los flavonoides utilizados como estándares	41
4	Resumen del análisis de la presencia de los flavonoides investigados en las plantas	42
	Resumen del análisis de la presencia de los flavonoides investigados en las plantas (continuación)	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>C. murale</i> en un campo de cultivo	3
2	<i>P. calyculatus</i> en su etapa de floración	4
3	Fotografías de diferentes partes del capulín en diferentes estados de desarrollo	5
4	<i>A. palmeri</i> : A) Partes aéreas, B) Flor	6
5	Fotografías de <i>T. mucronatum</i>	7
6	Diferentes aspectos de <i>S. rostratum</i>	8
7	Partes aéreas de <i>D. moldavica</i>	8
8	Diferentes partes de <i>M. grandiflora</i>	9
9	Estructuras de los compuestos fenólicos aislados de <i>M. grandiflora</i>	9
10	Tallos, hojas y frutos del chayote	10
11	Fotografías de <i>B. frutescens</i> : A) Planta entera, B) Vista de acercamiento de flores y hojas	11
12	Estructuras de los flavonoides utilizados como estándares y de otros más comunes en las plantas medicinales y alimenticias	14
13	Cromatograma correspondiente al estándar catequina	22
14	Cromatograma correspondiente al estándar hesperitina	23
15	Cromatograma correspondiente al estándar kaempferol	24
16	Cromatograma correspondiente al estándar quercetina	25
17	Cromatograma correspondiente al estándar rutina	26
18	Cromatograma del extracto acuoso de <i>A. palmeri</i>	27
19	Cromatograma del extracto acuoso hirolizado de <i>A. palmeri</i>	28
20	Cromatograma del extracto acuoso de las hojas de <i>B. frutescens</i>	29
21	Cromatograma correspondiente al extracto acuoso de <i>C.</i>	30

	<i>murale</i>	
22	Cromatograma correspondiente al extracto acuoso hidrolizado de <i>C. murale</i>	31
23	Cromatograma del extracto acuoso de <i>D. moldavica</i>	32
24	Cromatograma del extracto acuoso de <i>M. grandiflora</i>	33
25	Cromatograma del extracto acuoso de <i>P. serotina</i>	34
26	Cromatograma correspondiente al extracto acuoso de <i>P. calyculatus</i>	35
27	Cromatograma correspondiente al extracto acuoso hidrolizado de <i>P. calyculatus</i>	36
28	Cromatograma del extracto acuoso de <i>S. edule</i>	37
29	Cromatograma del extracto acuoso de <i>S. rostratum</i>	38
30	Cromatograma del extracto acuoso de <i>T. mucronatum</i>	39

I. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son compuestos fenólicos derivados de la ruta del acetato-malonato y del ácido siquímico que tienen el esqueleto básico C6-C3-C6 y que en la mayoría de los casos, tienen en su estructura química grupos hidroxilos que constituyen la característica común de los fenoles. Esos metabolitos presentes en plantas medicinales y alimenticias adquieren cada vez mayor interés entre investigadores y público en general, debido a su importancia en la prevención y en el tratamiento de enfermedades degenerativas relacionadas con el estrés oxidativo como son el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, las inflamaciones y el envejecimiento. Debido a su importancia biológica, es de mucha utilidad determinar su presencia en las fuentes de interés, ya sea para sustentar el uso medicinal o alimenticio de las mismas o para optimizar su aislamiento, caracterización estructural y la evaluación de la actividad biológica de una estructura en particular. La naturaleza y la cantidad de los flavonoides presentes en una especie vegetal dependen de varios factores, incluyendo el estado de desarrollo de la planta, el periodo de su colecta, el tipo de suelo donde crece y las condiciones climáticas en que se desarrolla. Por ello, especies de diferentes zonas geográficas pueden presentar diferentes perfiles en su contenido metabólico. De aquí la importancia de llevar a cabo el estudio del perfil de flavonoides en las especies locales. Para ello, se usan diversos métodos. Cuando se requiere de la evaluación de la actividad biológica de los flavonoides individuales, es indispensable completar el estudio fitoquímico de la especie. Sin embargo, completar ese proceso es largo y tedioso, sin contar que los efectos benéficos de las infusiones o maceraciones consumidas por la gente se deben muchas veces al conjunto de los ingredientes. Por esta razón, numerosos estudios no se enfocan hacia el aislamiento de los constituyentes individuales, sino a la caracterización y estandarización de las mezclas. Para ese propósito, el método más empleado en el estudio de flavonoides es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplada con la espectrometría de masas (EM), en la cual se emplea un método de ionización suave. La combinación de esta instrumentación analítica permite identificar con certeza los flavonoides presentes y cuantificarlos de manera óptima. Eso se logra mediante la comparación de los tiempos de

retención de los picos identificados con estándares y el estudio del patrón de fragmentación de cada pico. Cuando se carece de esta combinación instrumental, la CLAR por sí sola, aunque no da información categórica, constituye una aproximación que ha funcionado en numerosas ocasiones. Los flavonoides pueden existir en forma libre en las plantas, pero en muchas ocasiones se encuentran como agliconas formando glicósidos con diferentes azúcares. Esas formas enlazadas se metabolizan en el tracto gastrointestinal y liberan las agliconas bioactivas. A pesar de que los flavonoides libres y enlazados son termolábiles y no volátiles, esa característica es poco importante cuando se cuenta con la instrumentación combinada antes mencionada, dado que los métodos de ionización suave en la EM permiten su análisis. Sin embargo, cuando el recurso principal se limita al uso de la CLAR, es conveniente investigar tanto los flavonoides libres, como llevar a cabo hidrólisis ácidas antes de este análisis.

Otros métodos de determinación cualitativa de flavonoides aprovechan sus propiedades químicas de formar quelatos en sus hidroxilos, los cuales presentan colores particulares con ciertos metales. Sin embargo, estos métodos tienen un alcance restringido a la simple detección de la presencia de flavonoides como un conjunto y por lo tanto carecen de importancia para los objetivos de muchas investigaciones.

II ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, todas las especies consideradas en el presente protocolo se emplean en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de algún padecimiento relacionado con la circulación sanguínea, además de otros usos.

II.1 Estudios químicos y farmacológicos de las plantas medicinales seleccionadas

II.1.1 *Chenopodium murale*

Dos triglicósidos, el kaempferol-3-O-[(4-beta-D-apiofuranosil)-alfa-L-ramnopiranosido]-7-O-alfa-L-ramnopiranosido y el kaempferol-3-O-[(4-beta-D-xilopiranosil)-alfa-L-ramnopiranosido]-7-O-alfa-L-ramnopiranosido, fueron aislados del extracto etanólico de *C. murale* L. (en México: quelite de pollo) (Figura 1), junto con un diglicósido conocido, el kaempferol-3-O-beta-D-glucopiranosido-7-O-alfa-L-ramnopiranosido. La caracterización de los tres componentes se logró utilizando varios métodos espectroscópicos (Gohar y col., 2000).



Figura 1. *C. murale* en un campo de cultivo.

Mediante la técnica de “voltaje-clamp” de dos electrodos, se estudiaron los efectos del extracto cloroformo-metanólico (1:1) de *C. murale* en ovocitos de rana (*Xenopus laevis*), donde se evaluaron concentraciones de 1 a 500 $\mu\text{g/ml}$. Para el extracto, se utilizó la parte aérea de dicha planta. Dicho extracto produjo corrientes entrantes oscilatorias dependientes de las concentraciones en los huevos. El extracto activa las corrientes oscilatorias típicas de los canales de calcio dependientes de cloro generadas en la membrana de los ovocitos de *Xenopus* (Rojas y col., 2003). En otro estudio anterior, el extracto etanólico mostró una actividad citotóxica significativa sobre células cancerosas FL (Ali y col., 2001).

II.1.2 *Psittacanthus calyculatus*

P. calyculatus (DC.) G. Don, cuyo nombre vulgar más común es muérdago (Figura 2), se utiliza en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la hipertensión. En anillos de aorta de rata, concentraciones bajas del extracto etanólico de la planta (hasta 300 $\mu\text{g/ml}$) inducen una pequeña tensión adicional en los anillos precontraídos, con y sin su endotelio funcional. Sin embargo, el aumento de la tensión es levemente más grande en anillos que tienen el endotelio intacto. En concentraciones más altas (400-800 $\mu\text{g/ml}$), el extracto relaja el anillo intacto. El extracto etanólico del *P. calyculatus* induce, predominantemente, una relajación dependiente del endotelio que es mediada por la síntesis y vertido de óxido nítrico (Rodríguez-Cruz y col., 2003).



Figura 2. *P. calyculatus* en su etapa de floración.

II.1.3 *Prunus serotina*

P. serotina Ehrh. var. Capulín (capulín) (Figura 3) se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento de síntomas inflamatorios relacionados con frío, fiebre y garganta adolorida. El extracto presenta una actividad antiproliferativa en células del cáncer colorectal y causa la supresión del crecimiento de las células, así como la inducción de la apoptosis (Yamaguchi y col., 2006).



Figura 3. Fotografías de diferentes partes del capulín en diferentes estados de desarrollo.

Siete glicósidos de flavonoles han sido aislados de las hojas de esta especie. Éstos fueron caracterizados e identificados por espectroscopia de UV y de RMN. Tres de ellos fueron monósidos de la quercetina: hiperósido, avicularina y reinoutrina. Tres otros fueron biósidos de quercetina: 3-O-(6"-O-alfa-L-ramnopiranosil)-beta-D-glucopiranosido, 3-O-(2"-O-alfa-L-ramnopiranosil)-beta-D-glucopiranosido y 3-O-(6"-O-alfa-L-ramnopiranosil)-beta-D-galactopiranosido. Finalmente, se caracterizó la isorhamnetina 3-O-(6"-O-alfa-L-ramnopiranosil)-beta-D-glucopiranosido (Olszewska, 2005a). En un segundo estudio que abarcó en esta ocasión las hojas e inflorescencias de la misma especie, se identificaron nuevamente cinco flavonoides minoritarios que incluyeron xilopiranosidos y arabinopiranosidos de los mismos flavonoides anteriores, utilizando como técnicas de aislamiento y purificación las cromatografías en capa fina y de líquidos de alta resolución, empleando una fase estacionaria reversa en este último caso (Olszewska, 2005b).

II.1.4 *Agastache palmeri* (*A. mexicana*)

A. palmeri (*A. mexicana*) (HBK.) Lint et Epling (Figura 4) es una planta medicinal a la cual se atribuyen propiedades ansiolíticas; también tiene amplio uso en el tratamiento de la hipertensión. Los extractos acuosos en dosis de 3.0, 9.0 y 12.0 mg/kg de peso corporal de ratas machos Wistar no demostraron ningún efecto antidepresivo. En cambio, las ratas sufrieron más bien los efectos contrarios (anxiogénicos) (Molina-Hernandez y col., 2000). A la fecha, no existen estudios químicos de la especie, por lo que se desconoce si contiene o no flavonoides.



Figura 4. *A. palmeri*: A) Partes aéreas, B) Flor.

II.1.5 *Taxodium mucronatum*

Se estudiaron los efectos del extracto acuoso de las flores de *T. mucronatum* Tenore (Figura 5) sobre la aorta torácica de rata precontraída con noradrenalina (NA). El extracto (0.5-12 mg/ml) produjo una inhibición de la contracción de una manera dependiente de la concentración. Los resultados de dicho estudio revelan que los principios activos presentes en el extracto crudo pueden ejercer un efecto vasorelajante (Perrusquia y col., 1995). Posteriormente, se aislaron bisflavonas, la amentoflavona AMF1 y dos de sus derivados: 4'-metilamentoflavona (AMF2) y 7",4"-dimetilamentoflavona (AMF3). Esos bisflavonoides demostraron un potente poder inhibitorio de la

actividad de la catepsina B, un miembro de la superfamilia de proteasas que tienen en su estructura el aminoácido cisteína. Esas enzimas han sido implicadas en numerosas patologías, incluyendo la artritis y el cáncer. Esos resultados demuestran que las amentoflavonas representan compuestos naturales que pueden ser aprovechados como inhibidores reversibles naturales de la catepsina B y por lo tanto, como agentes útiles en la prevención y el tratamiento del cáncer (Pan y col., 2005).



Figura 5. Fotografías de *T. mucronatum*.

II.1.6 *Solanum rostratum*

El extracto cloroformo-metanólico (1:1) de *S. rostratum* Dunal (abrojo) (Figura 6) mostró la misma actividad descrita para *C. murale* en ovocitos de rana (ver punto II.1.1) (Rojas y col., 2003).

En un estudio químico posterior, se aisló el constituyente mayoritario de las partes aéreas de esta especie, el cual fue caracterizado como la metilprotodioscina, utilizando la espectroscopía de resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas de baja y alta resolución. Debido al bajo rendimiento del producto obtenido de este metabolito, no se le realizó ninguna evaluación farmacológica. Aunque se había descrito la presencia de este metabolito en especies de plantas de diversos géneros, ésta fue la segunda vez que se aisló del género *Solanum*, lo que representó una característica quimiotaxonómica adicional para este género (Bah y col., 2004).



Figura 6. Diferentes aspectos de *S. rostratum*.

En una revisión de plantas hepatotóxicas y nefrotóxicas realizada un cuarto de siglo atrás, se había advertido sobre los efectos nefrotóxicos ocurridos en muchos animales domésticos por el consumo de esta especie (Oladosu y Case, 1979).

II.1.7 *Dracocephalum moldavica*

El estudio químico convencional de *D. moldavica* L. (Figura 7) condujo al aislamiento y a la caracterización de varios metabolitos secundarios. Se identificaron varios flavonoides, entre ellos la luteolina, la apigenina, el kaempferol y la isoramnetina. Se aislaron además glicéridos y ácidos grasos de cadena larga como el oleanólico (Li y Ding, 2001; Holcapek y col., 2003; Gu y col., 2004; 2005).



Figura 7. Partes aéreas de *D. moldavica*.

II.1.8 *Magnolia grandiflora* Linneo



Figura 8. Diferentes partes de *M. grandiflora*.

Dos metabolitos fenólicos aislados de *M. grandiflora* Linneo (Figura 8), el magnolol y el honokiol (Figura 9), demostraron actividad antibacteriana, en particular contra *Propionibacterium acnes* y *Propionibacterium granulosum*, dos agentes infecciosos implicados en la formación del acné. Esos resultados ponen de manifiesto el potencial de esta especie para mitigar el acné (Park y col., 2004). El magnolol ha demostrado además un excelente efecto antiproliferativo de células vasculares, el cual se atribuye a su potencial antioxidante (Wu y col., 2005).

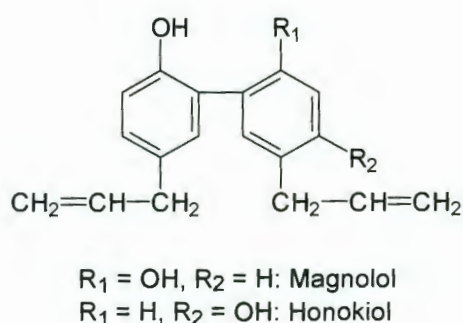


Figura 9. Estructuras de los compuestos fenólicos aislados de *M. grandiflora*.

II.1.9 *Sechium edule*

Ocho flavonoides, incluyendo tres C-glicósidos y cinco O-glicósidos de flavonas, fueron aislados de las raíces, hojas, tallos y frutos de *S. edule* Swartz (chayote) (Figura 10). Sus estructuras químicas fueron caracterizadas mediante espectroscopía MRN y cuantificados mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Las agliconas correspondieron a la apigenina y a la luteolina, mientras que los azúcares fueron glucosa, apiosa y ramnosa. Las hojas contuvieron mayor cantidad de flavonoides y los tallos menor cantidad de esos metabolitos (Siciliano y col., 2004).

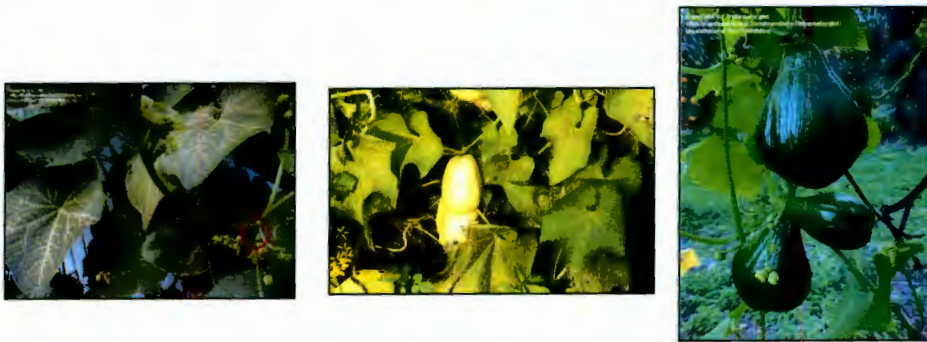


Figura 10. Tallos, hojas y frutos del chayote.

Los extractos de esta planta mostraron una actividad antimutagénica (Yen y col., 2001). También, extractos acuosos obtenidos de la pulpa y de la cáscara del chayote mostraron una actividad antihipertensiva (Gordon y col., 2000).

El consumo de chayote ha sido asociado con la hipocalcemia (aparición de bajos niveles de potasio en el suero sanguíneo) durante el embarazo (Jensen y Lai, 1986).

II.1.10 *Bocconia frutescens*

Extractos acuosos y metanólicos de *B. frutescens* L. (Figura 11) ejercen un efecto antisecretorio a nivel intestinal (secreción inducida por la toxina del cólera). Eso justifica en parte su uso tradicional para el tratamiento de diarreas (Velazquez y col., 2006). Se ha descrito la presencia de un gran número de

alcaloides en esta especie, siendo la sanguinarina uno de los más familiares (Caballero-George y col., 2003).

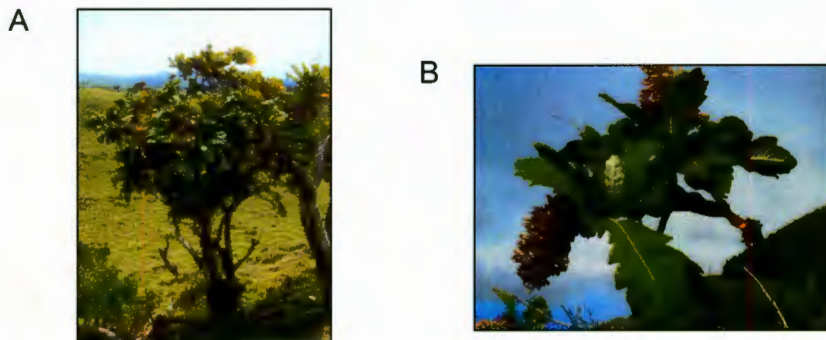


Figura 11. Fotografías de *B. frutescens*: A) Planta entera, B) Vista de acercamiento de flores y hojas.

II. 2 Actividades biológicas relevantes de algunos flavonoides comunes

II.2.1 Quercetina

La quercetina (3, 3', 4', 5,7-pentahidroxiflavona) (Figura 12) es uno de los flavonoides de interés presentes en algunos alimentos y en ciertas plantas medicinales. Su importancia radica en sus propiedades medicinales. De todos sus efectos biológicos, su actividad antioxidante parece jugar un papel determinante en la prevención de la aterosclerosis. En las plantas, la quercetina existe frecuentemente en forma de glicósido. Los glicósidos de la quercetina se absorben e hidrolizan en el intestino delgado. Después de la deglucosilación, sus metabolitos, en particular la glucosa, son transportados mediante enzimas específicas o mediante transporte pasivo. Los demás glicósidos de la quercetina se absorben preferentemente en ese sitio después de una hidrólisis por las enterobacterias. En ambos casos, la aglicona liberada (quercetina) se convierte en glucurónidos conjugados y/o sulfatos durante el proceso de su absorción. Algunos de esos metabolitos que circulan en el torrente sanguíneo actúan como secuestradores de radicales libres, los cuales se producen frecuentemente por la oxidación de los lípidos corporales, mediante la acción de la lipooxigenasa y

de la oxidasa de la xantina. La quercetina ayuda a controlar ese proceso oxidativo, inhibiendo la actividad de esas enzimas por una parte, y por otra, captando y neutralizando los radicales formados. Ejemplos clásicos de los efectos negativos de los radicales libres lo constituyen el proceso de envejecimiento (incluyendo la pérdida de memoria en las personas de edad avanzada), el cáncer, la diabetes, los padecimientos cardiovasculares, la inflamación, etc. Es poco probable que los metabolitos conjugados alcancen directamente las células blanco por causa de su bajo carácter lipofílico. Sin embargo, la quercetina puede ser liberada de nuevo de sus complejos conjugados e incorporarse en las células, gracias a la actividad de la β -glucuronidasa durante el proceso de la inflamación. Es de esta forma que los glicósidos de la quercetina dietética y sus metabolitos se acumulan por ejemplo en la aorta y ejercen sus diversas actividades biológicas en las células y en el torrente sanguíneo (Terao, 2005). Se determinó que el efecto relajante de la quercetina sobre la aorta se debe a la inhibición de la movilización de iones calcio por este metabolito (Morales y Lozoya, 1994). Por otra parte, la quercetina, al igual que la hesperidina (Figura 12), ayudan a controlar la sobreproducción de óxido nítrico (NO) en el organismo (Timoshin y col., 2005); esta molécula que tiene la configuración electrónica de un radical libre juega un papel importante en diversos procesos fisiológicos, como son la relajación de los vasos sanguíneos, la inhibición de la agregación de plaquetas y la inhibición de la proliferación de las células musculares lisas (Moncada y Higgs, 1991), tres fenómenos favorables a la circulación sanguínea. Sin embargo, la producción excesiva de NO puede generar otro potente agente oxidante, el peroxinitrilo (ONOO^-), el cual es muy dañino para las células (Beckman y col., 1994; Rubbo y col., 1996).

II.2.2 Rutina

En un estudio reciente, se comprobaron las características metabólicas y farmacológicas de la rutina (Figura 12), un glucósido dietético de la quercetina que fue administrado a ratas por vía oral para tratar la colitis (enfermedad inflamatoria del intestino) inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS). Se compararon los coeficientes de partición aparentes *in vivo* de la

rutina y su aglicona, la quercetina. La estabilidad bioquímica y química de la rutina se determinó en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal de ratas. También se determinaron los índices inflamatorios después de la administración de la rutina por vía oral y de la quercetina por vía rectal. Se observó que no sólo la administración oral de rutina, sino también que la administración rectal de quercetina mejoran notablemente la colitis inducida por TNBS. Esa observación constituye una evidencia de que la quercetina liberada de sus glicósidos como la rutina, es un compuesto con actividad terapéutica en el intestino delgado (Kim y col., 2005). En otro estudio, se comprobó que la rutina atenúa la deterioración de la memoria relacionada con el envejecimiento; se asume que esa actividad se debe a su poder antioxidante y secuestrador de radicales libres (Kishore y Manjeet, 2005).

II.2.3 (+)-Catequina y hesperidina

Los efectos potenciales de la (+)-catequina y la hesperidina (Figura 12) para inhibir la formación de criptas aberrantes en el colon fueron probados. Se demostró que la (+)-catequina, y en un grado menor la hesperidina [4'-O-metil-7-(α -L-ramnopirasil-1 \rightarrow 6- β -D-glucopiranosil) flavanona], protegen contra la formación de la cripta inducida por agentes carcinógenos. Aunque la hesperidina presentó un efecto menor, ese efecto es relativamente comparable al de la catequina y otros agentes quimiopreventivos, al considerar las dosis utilizadas. El potencial de estos flavonoides de actuar como agentes quimiopreventivos dietéticos se justifica por la buena biodisponibilidad de estos agentes en la circulación sanguínea, ya que alcanzan concentraciones de 100-600 nM después de haber consumido por ejemplo té verde y jugo de naranja, dos bebidas comunes en varios países (Franke y col., 2002).

II.2.4 Galato de epigallocatequina

Se estudiaron los efectos de un derivado de la catequina, el polifenol galato de epigallocatequina (EGCG), sobre la contracción vascular de cerdos jóvenes. La aorta torácica del cerdo se suspendió en un baño de norepinefrina (noradrenalina), un conocido agente que conduce a la contracción rápida, reproducible y estable del músculo liso vascular. Después de la contracción

máxima, se adicionó el EGCG, lo cual condujo a una contracción adicional, seguida de una relajación dependiente de la dosis. Sin embargo, la contracción y relajación se pierden en ausencia del endotelio. El pretratamiento de los vasos con el L-NAME, un inhibidor de la NO sintetasa, bloquea la relajación dependiente del EGCG sin afectar la contracción inducida por ese metabolito. Esos resultados sugieren que mientras que el efecto contráctil causado por el EGCG es dependiente de la presencia del endotelio, ese efecto es independiente de la síntesis de NO (Buxton, 2003).

II.2.5 Kaempferol

El kaempferol (Figura 12) ha sido reconocido como un excelente agente secuestrador de radicales libres como el 1,1-difenil-2-picrilhidracilo, lo que lo convierte en un potencial agente anticancerígeno (Park y col., 2006).

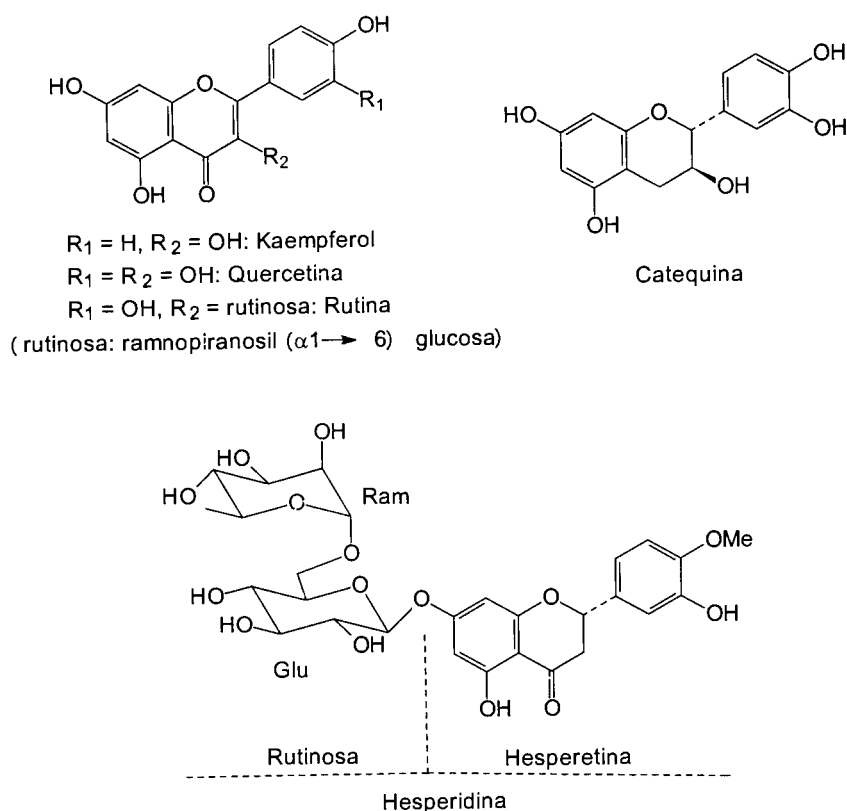


Figura 12. Estructuras de los flavonoides utilizados como estándares y de otros más comunes en las plantas medicinales y alimenticias.

III. HIPÓTESIS

Los flavonoides más comunes a los que se atribuyen las principales propiedades medicinales de las plantas seleccionadas se encuentran en los extractos acuosos de estas especies en cantidades apreciables que permiten su detección mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

IV. OBJETIVOS

IV.1 GENERAL

Determinar la presencia de flavonoides en los extractos acuosos de las especies vegetales utilizando como herramienta principal la cromatografía de líquidos de alta resolución.

IV.2 ESPECÍFICOS

- Preparar los extractos acuosos mediante digestión.
- Implementar condiciones analíticas en la cromatografía de líquidos para el análisis de cada estándar y de cada extracto seco.
- Determinar la presencia o no de los estándares de flavonoides disponibles en cada extracto.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Accesorios

- Material de vidrio: Vasos de precipitado, pipetas graduadas de 5 ml, probeta de 100 ml, matraz Erlenmeyer de 1000 ml.
- Membranas de nylon y polipropileno hidrofílico para filtración de disolventes (47 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro).
- Acrodiscos para la filtración de muestras (13 mm de diámetro y 0.2 μm de tamaño de poro).
- Jeringas micrométricas de vidrio y desechables de 100 y 150 μl para inyección de muestras.
- Jeringa de purga con capacidad de 10 ml.
- Loops (líneas de inyección) de 20 μl .
- Columnas de vidrio de diferentes tamaños para cromatografía.
- Barras magnéticas.
- Columnas de fase reversa (Symmetry C18, 5 μm , 4.6 X 250 mm; YMC ODS-AQ S5 μm , 120 Å, 4.6 X 250 mm).

V.1.2 Disolventes y reactivos para los análisis cromatográficos

- Ácido acético grado reactivo analítico al 1% en agua (J. T. Baker).
- Agua tridestilada grado HPLC.
- Acetonitrilo grado HPLC de la marca Caledon o Mallinckrodt.
- Metanol grado HPLC de la marca J. T. Baker y/o Mallinckrodt.

V.1.3 Material de estudio

a) Flavonoides que se utilizaron como estándares:

- Catequina
- Hesperitina
- Kaempferol
- Quercetina
- Rutina

b) Extractos acuosos que se analizaron

- *Agastache palmeri* ((*A. mexicana*))
- *Bocconia frutescens* (hojas)
- *Chenopodium murale*
- *Dracocephalum moldavica*
- *Magnolia grandiflora*
- *Prunus serotina*
- *Psittacanthus calyculatus*
- *Taxodium mucronatum*
- *Solanum rostratum*
- *Sechium edule*

V.2 Equipos

- Balanza analítica marca Ohaus (0.0001-250.0 g).
- Sonificador marca Cole Parmer, modelo 8892.
- Liofilizadora Labconco.
- Ultracongelador (-86 °C ULT Freezer) marca ThermoForma.
- Sistema Cromatográfico de la marca Waters equipado con una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, un detector de arreglo de diodos Waters modelo 996, un inyector manual Rheodyne 7725i o un automuestreador marca Waters modelo 717 y un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millennium³² (Waters).

V.3 Métodos

V.3.1 Obtención de los extractos acuosos

Se utilizó una cantidad aproximada de 100 g de planta fresca. El material vegetal se secó en un horno con temperatura regulada (aproximadamente a 50 °C), se fragmentó mediante un molino manual y se sometió a extracción por

triplicado mediante digestión con agua a 60 °C durante 12 horas. El extracto se liofilizó y se guardó en frascos ámbar para su posterior procesamiento.

Para la búsqueda de flavonoides en los extractos preparados, primero se inyectaron los estándares para determinar sus tiempos de retención (ver punto V.3.3). Posteriormente, se analizaron los diferentes extractos en las mismas condiciones descritas para el análisis de los estándares, preparando las muestras sólidas como se describe en el punto V.3.2.2. Debido a la disponibilidad de material, tres de los extractos (*A. palmeri*, *C. murale* y *P. calyculatus* (ver punto V.3.2.1)) fueron sometidos a hidrólisis ácida para la búsqueda de las agliconas utilizadas como estándares.

V.3.2 Preparación de las muestras para análisis

V.3.2.1 Hidrólisis ácida de los extractos

En un matraz de 100 ml, se colocaron 50 mg de extracto seco. Se agregaron 8.3 ml de etanol y 3.3 ml de agua. La mezcla se sometió a agitación en ultrasonido durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 1.3 ml de HCl concentrado y se puso a reflujo por dos horas. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un matraz aforado de 10 ml y se aforó. De esta solución, se tomaron alícuotas de 20 µl para la búsqueda de las agliconas.

V.3.2.2 Preparación de las muestras sólidas

Se pesó aproximadamente 1 mg de los diferentes estándares y cada uno de los extractos; los estándares se disolvieron en 1 ml de metanol y los extractos en 1 ml de agua. Posteriormente se filtraron con la ayuda de acrodiscos. Dicha preparación se mantuvo en viales color ámbar tapados para evitar su contacto prolongado con la luz y el aire.

V.3.3 Identificación de los flavonoides mediante CLAR

Los estándares, extractos y los productos de hidrólisis ácida se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución. Se inyectaron muestras de 20 µl de cada uno de los estándares y de los extractos. El análisis se inició con la búsqueda de mejores condiciones de resolución de los componentes de las

VI. RESULTADOS

Durante la búsqueda de condiciones analíticas, se utilizó como fase móvil el sistema formado por MeOH, H₂O y CH₃COOH en diferentes proporciones (Cuadros 1 y 2), utilizando las columnas anteriormente mencionadas (ver punto V.1).

Cuadro 1. Condiciones isocráticas probadas durante el análisis de estándares.

Sistema	Composición (%)	Flujos probados
MeOH-H ₂ O-CH ₃ COOH	10:88:2	0.7 y 0.5 ml/min
	90:8:2	
	100:0:0	

También se probaron condiciones de gradiente. Se utilizó en este caso un sistema binario (A = CH₃CN y B = HCOOH al 1% o CH₃COOH al 1%) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Gradiente usado durante la búsqueda de condiciones óptimas de análisis de estándares y extractos. En todo momento el flujo fue de 0.8 ml/min.

Tiempo (min)	%A	%B
0	10	90
15	40	60
20	40	60
22	10	90

Las Figuras 13 a 17 ilustran los cromatogramas obtenidos durante los análisis de los estándares y las Figuras 8-20, los de los extractos y sus respectivos productos de hidrólisis. El volumen de inyección para cada muestra fue de 20 µl.

Nombre de la muestra: Catequina (1.3 mg/ml)

Tiempo de corrida: 30 min

Fecha de adquisición: 21/01/05

Procesamiento: 23/08/06

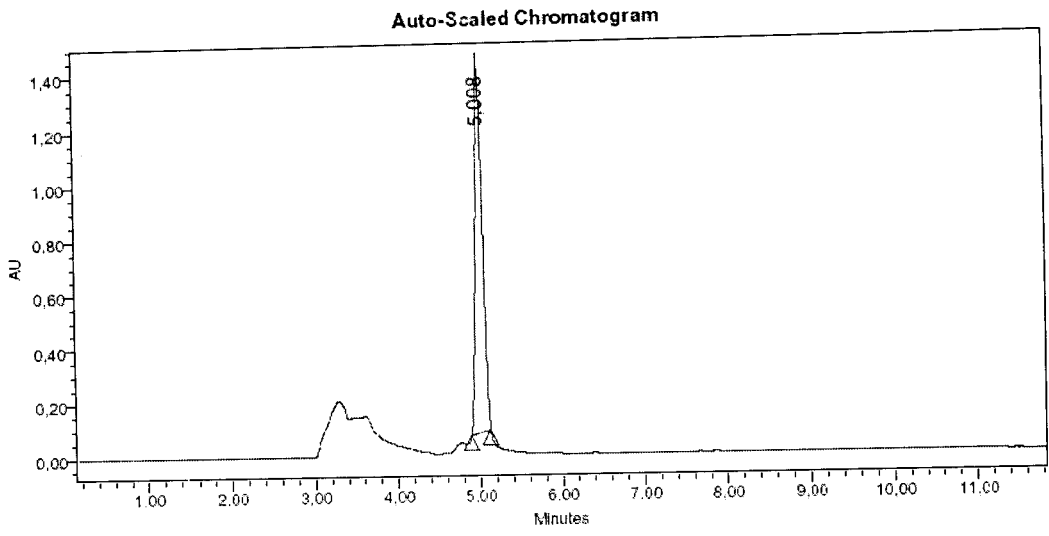


Figura 13. Cromatograma correspondiente al estándar catequina.

Nombre de la muestra: Hesperitina (1.02 mg/ml)

Tiempo de corrida: 45 min

Fecha de adquisición: 2/12/04

Procesamiento: 23/08/06

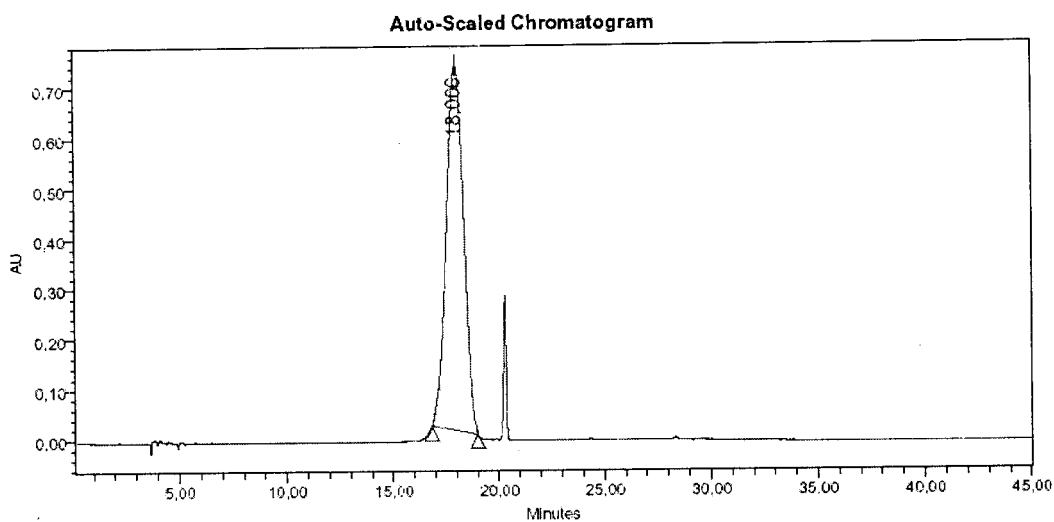


Figura 14. Cromatograma correspondiente al estándar hesperitina.

Nombre de la muestra: Kaempferol (1.2 mg/ml)

Tiempo de corrida: 35 min

Fecha de adquisición: 19/01/05

Procesamiento: 23/08/06

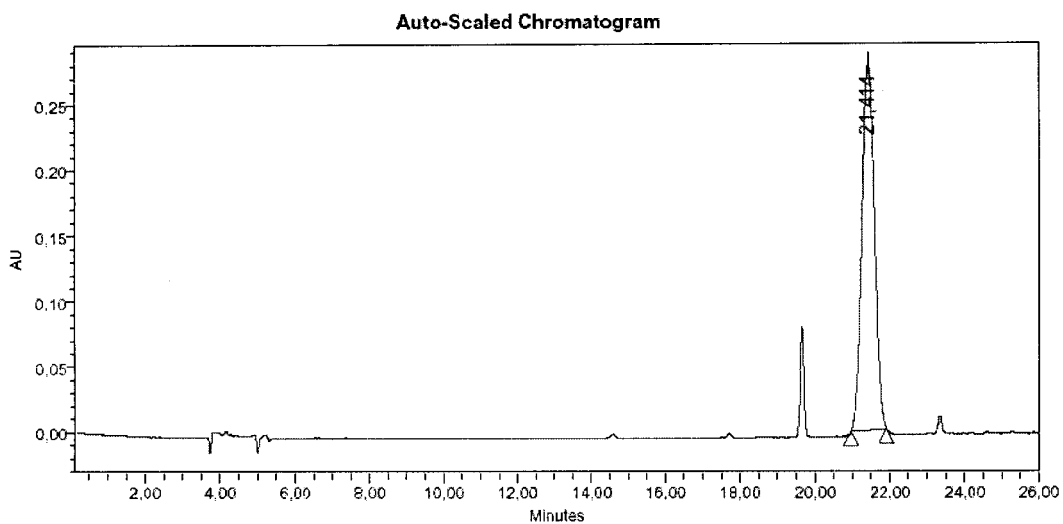


Figura 15. Cromatograma correspondiente al estándar kaempferol.

Nombre de la muestra: Quercetina (1.07 mg/ml)

Tiempo de corrida: 35 min

Fecha de adquisición: 17/03/05

Procesamiento: 23/08/06

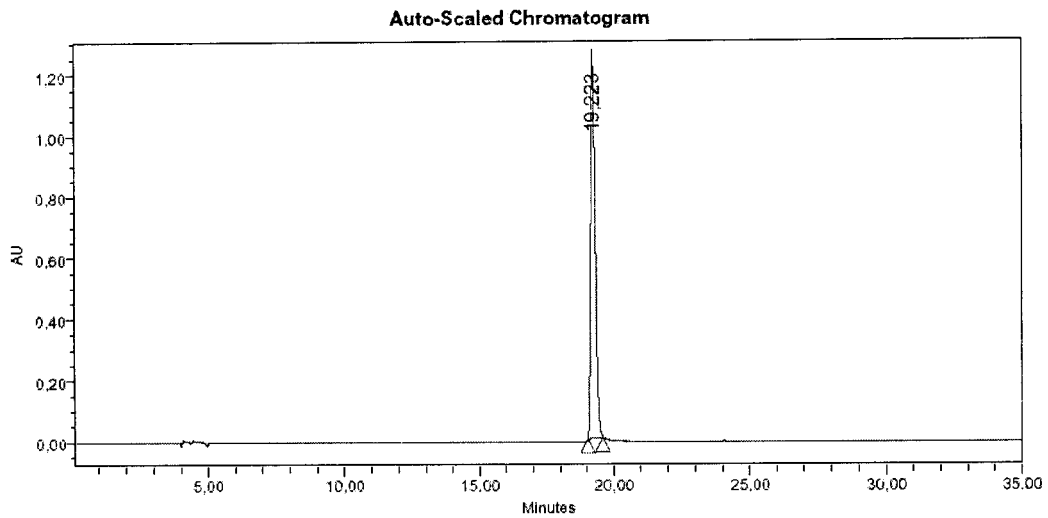


Figura 16. Cromatograma correspondiente al estándar quercetina.

Nombre de la muestra: Rutina (1.5 mg/ml)

Tiempo de corrida: 8 min

Fecha de adquisición: 2/12/04

Procesamiento: 23/08/06

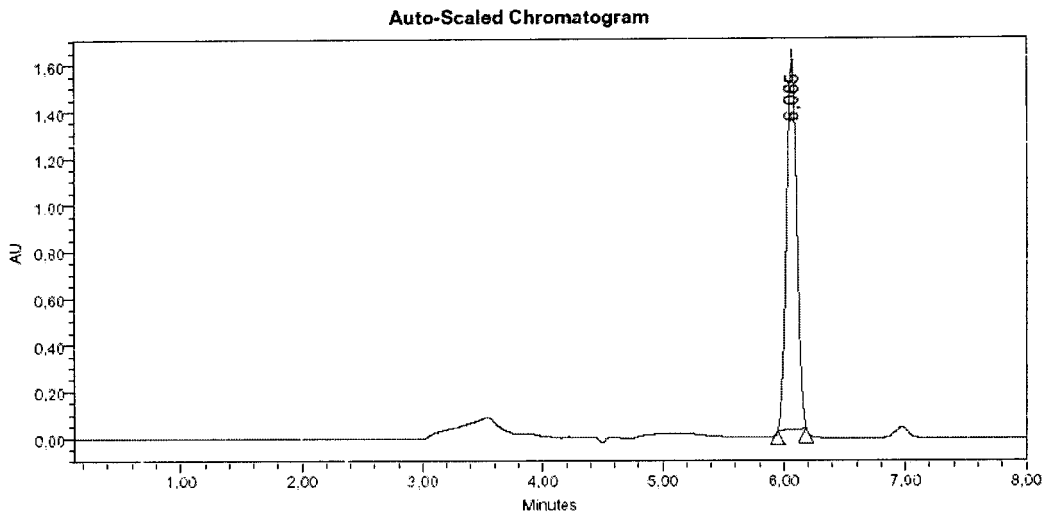


Figura 17. Cromatograma correspondiente al estándar rutina.

Nombre de la muestra: *Agastache palmeri* (A. mexicana) (1.05333 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 28/01/05

Procesamiento: 23/08/06

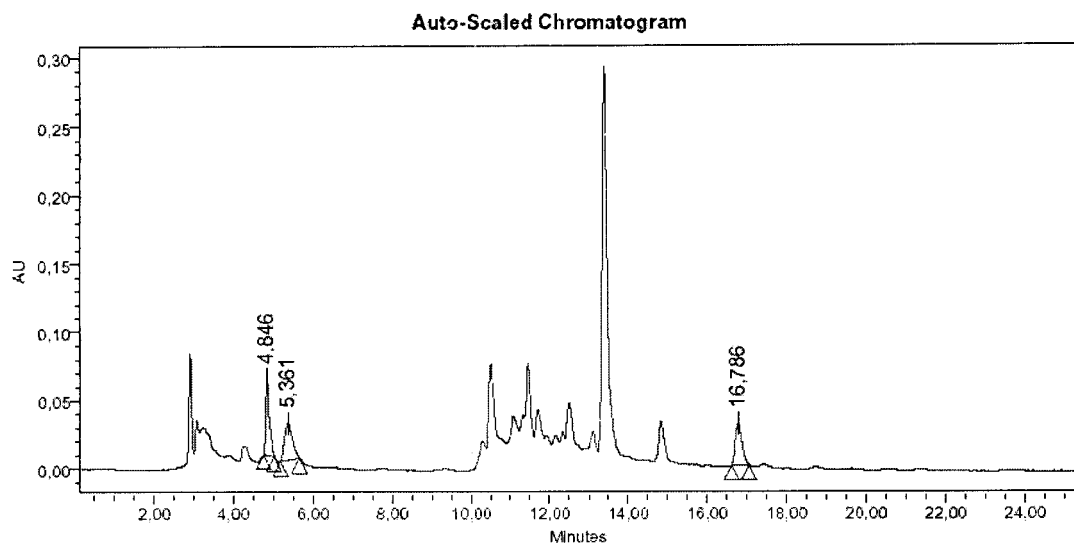


Figura 18. Cromatograma del extracto acuoso de *A. palmeri*.

Nombre de la muestra: *A. palmeri* (extracto hidrolizado)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 28/01/05

Procesamiento: 23/08/06

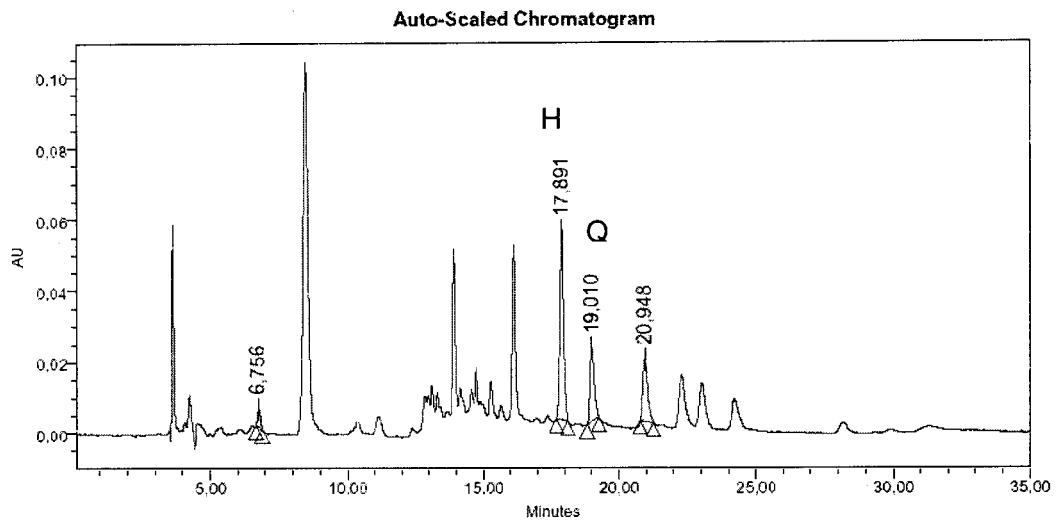


Figura 19. Cromatograma del extracto acuoso hiorlizado de *A. palmeri* (H = hesperitina, Q = quercetina).

Nombre de la muestra: *B. frutescens* (1.06 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 22/01/05

Procesamiento: 23/08/06

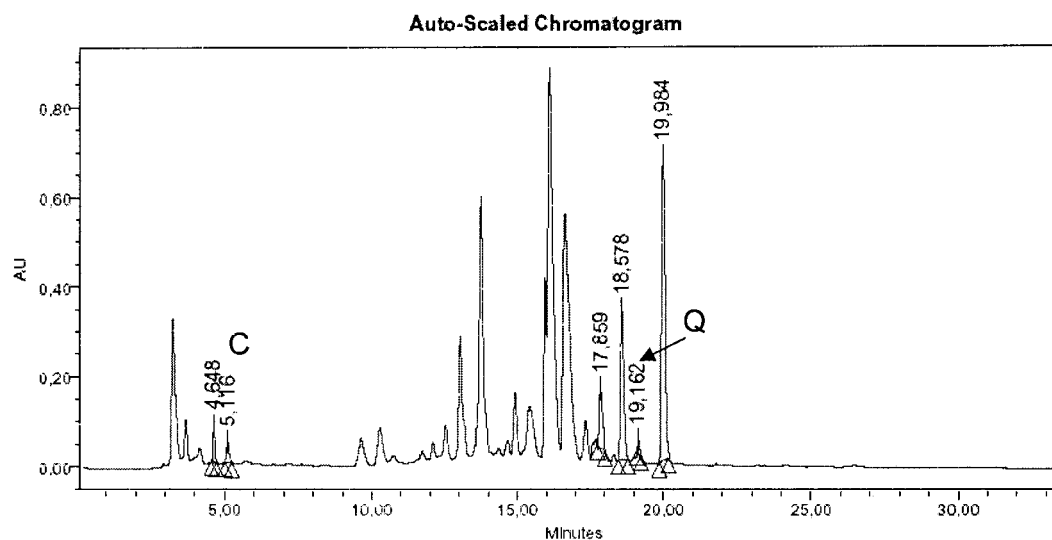


Figura 20. Cromatograma del extracto acuoso de las hojas de *B. frutescens* (C = catequina, Q = quercetina).

Nombre de la muestra: *C. murale* (1.04 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 22/01/05

Procesamiento: 23/08/06

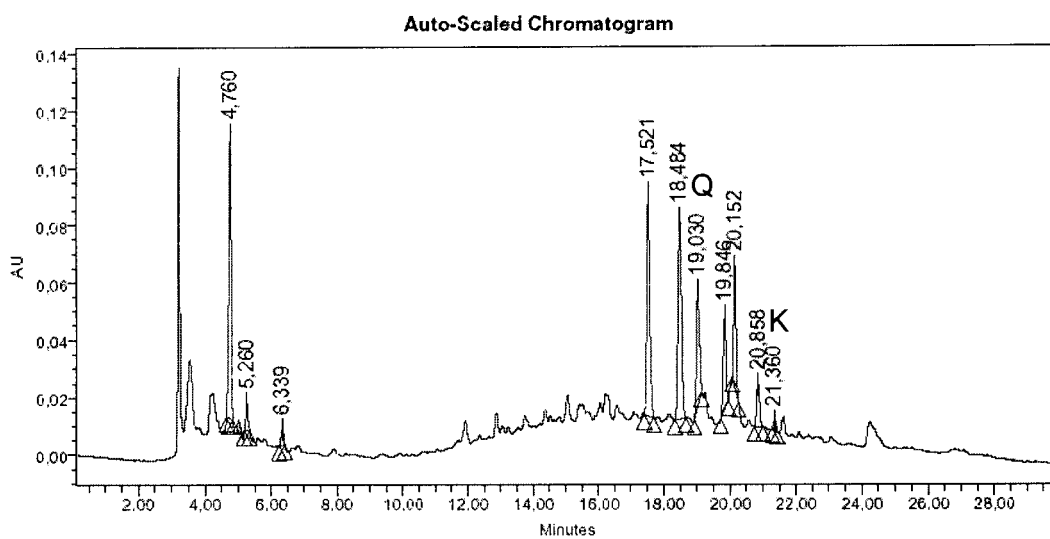


Figura 21. Cromatograma correspondiente al extracto acuoso de *C. murale* (Q = quercetina, K = kaempferol).

Nombre de la muestra: *C. murale* hidrolizado

Tiempo de corrida: 35 min

Fecha de adquisición: 22/01/05

Procesamiento: 23/08/06

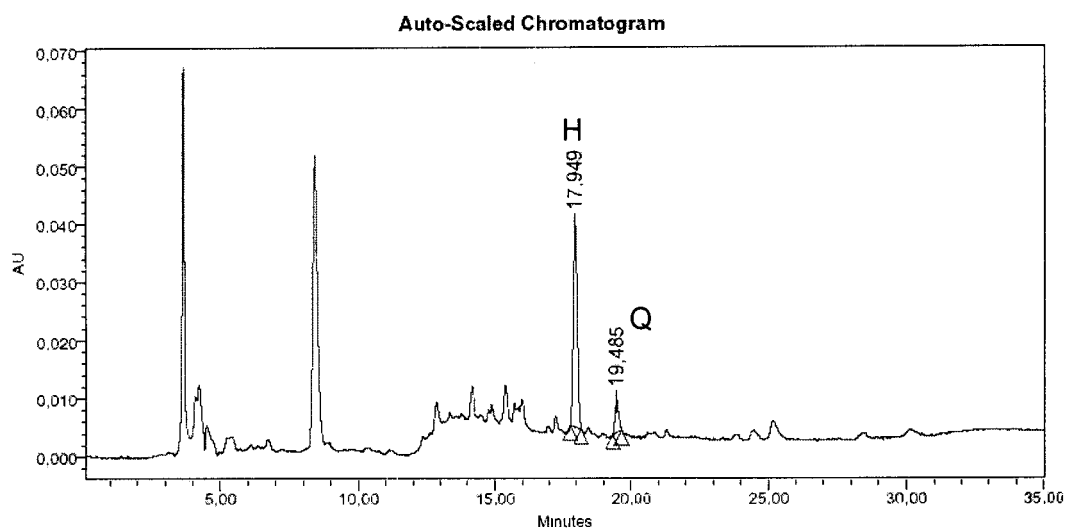


Figura 22. Cromatograma correspondiente al extracto acuoso hidrolizado de *C. murale* (H = hesperitina, Q = quercetina).

Nombre de la muestra: *D. moldavica* (1.05 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 29/01/05

Procesamiento: 23/08/06

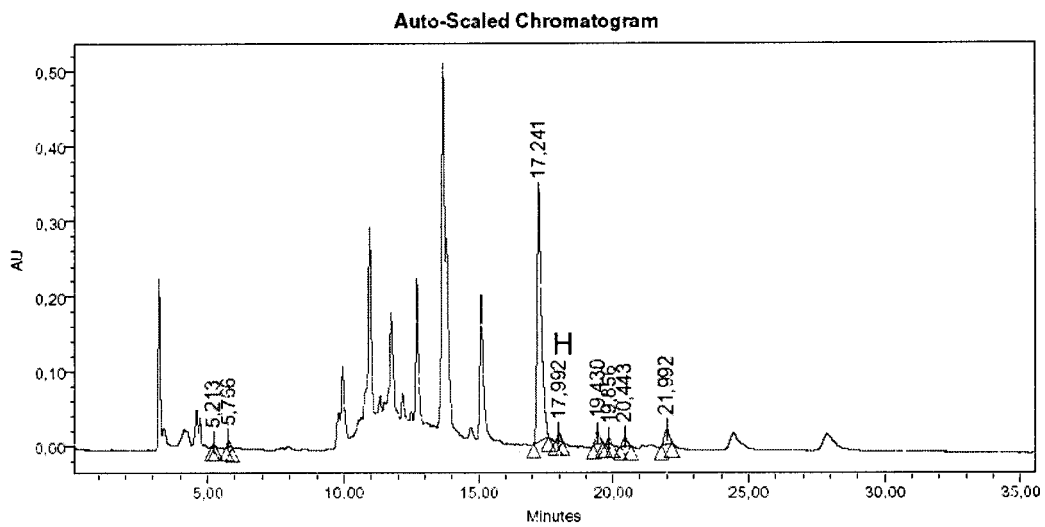


Figura 23. Cromatograma del extracto acuoso de *D. moldavica* (H = hesperitina).

Nombre de la muestra: *M. grandiflora* (1.08 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 22/01/05

Procesamiento: 23/08/06

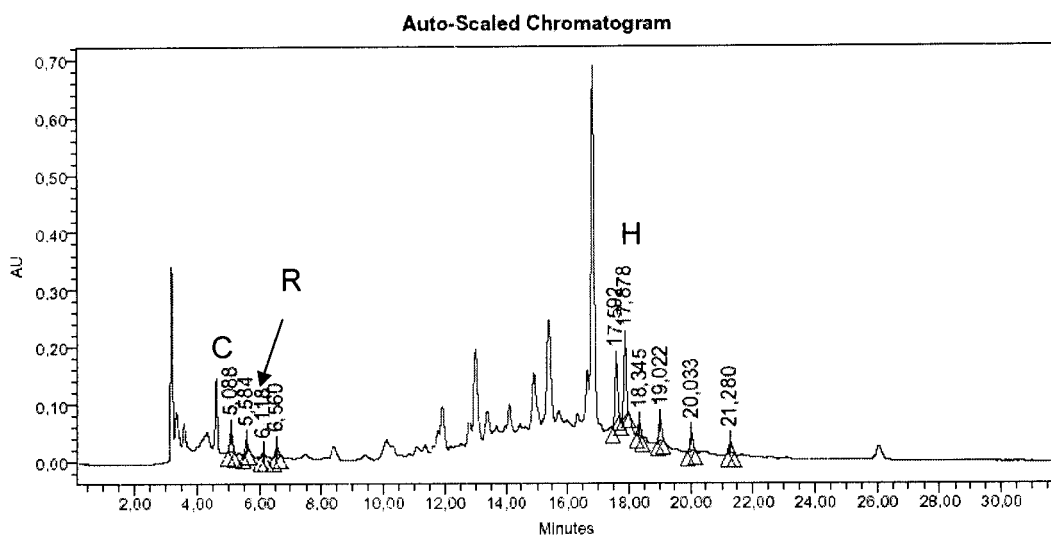


Figura 24. Cromatograma del extracto acuoso de *M. grandiflora* (C = catequina, R = rutina, H = hesperitina).

Nombre de la muestra: *P. serotina* (1.08 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 29/01/05

Procesamiento: 23/08/06

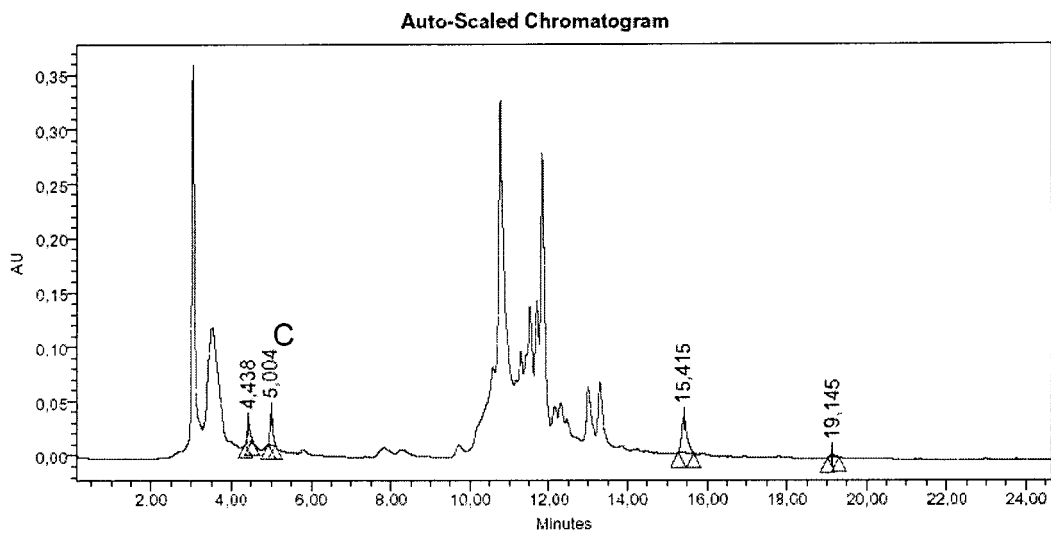


Figura 25. Cromatograma del extracto acuoso de *P. serotina* (C = catequina).

Nombre de la muestra: *P. calyculatus* (1.06 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 22/01/05

Procesamiento: 23/08/06

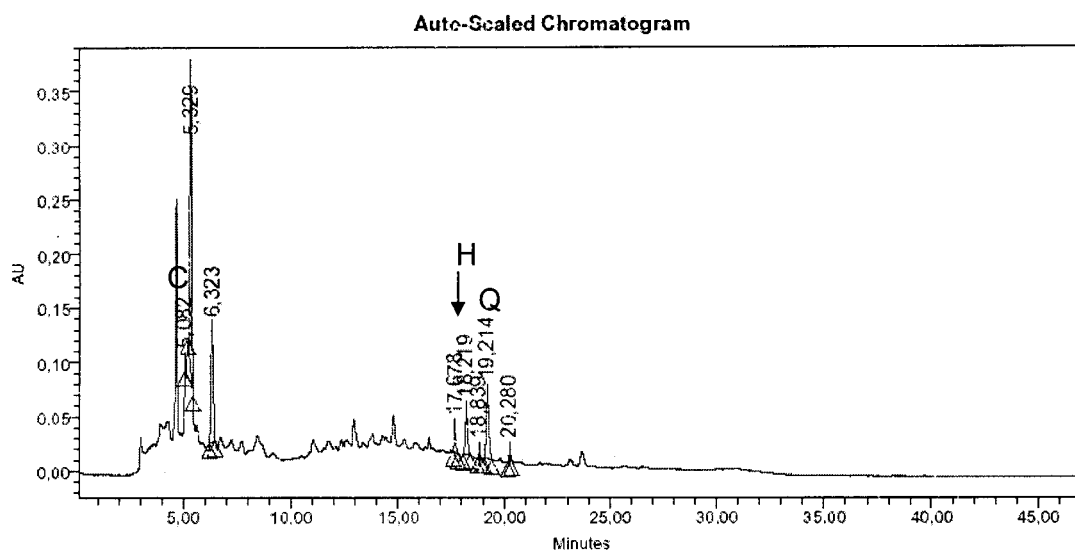


Figura 26. Cromatograma correspondiente al extracto acuoso de *P. calyculatus* (C = catequina, H = hesperitina, Q = quercetina).

Nombre de la muestra: *P. calyculatus* (Extracto hidrolizado)

Tiempo de corrida: 35 min

Fecha de adquisición: 17/03/05

Procesamiento: 23/08/06

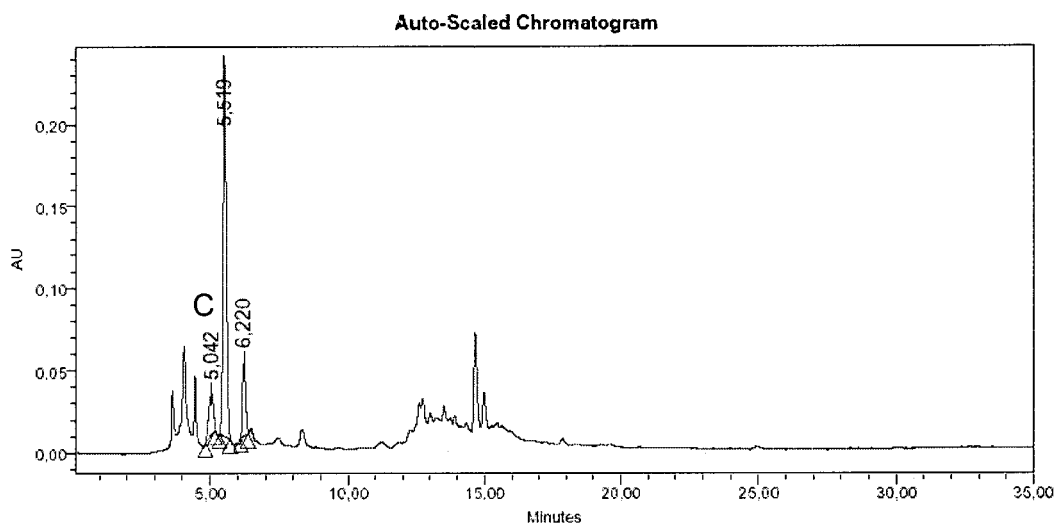


Figura 27. Cromatograma correspondiente al extracto acuoso hidrolizado de *P. calyculatus* (C = catequina).

Nombre de la muestra: *S. edule* (1.05 mg/ml)

Tiempo de corrida: 100 min

Fecha de adquisición: 29/01/05

Procesamiento: 23/08/06

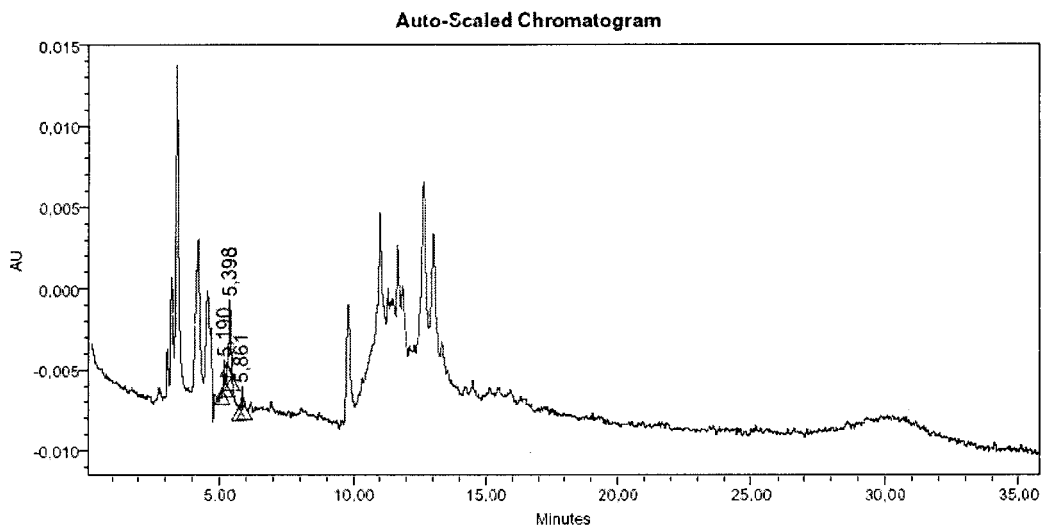


Figura 28. Cromatograma del extracto acuoso de *S. edule*.

Nombre de la muestra: *S. rostratum* (1.08 mg/ml)

Tiempo de corrida: 35 min

Fecha de adquisición: 24/02/05

Procesamiento: 23/08/06

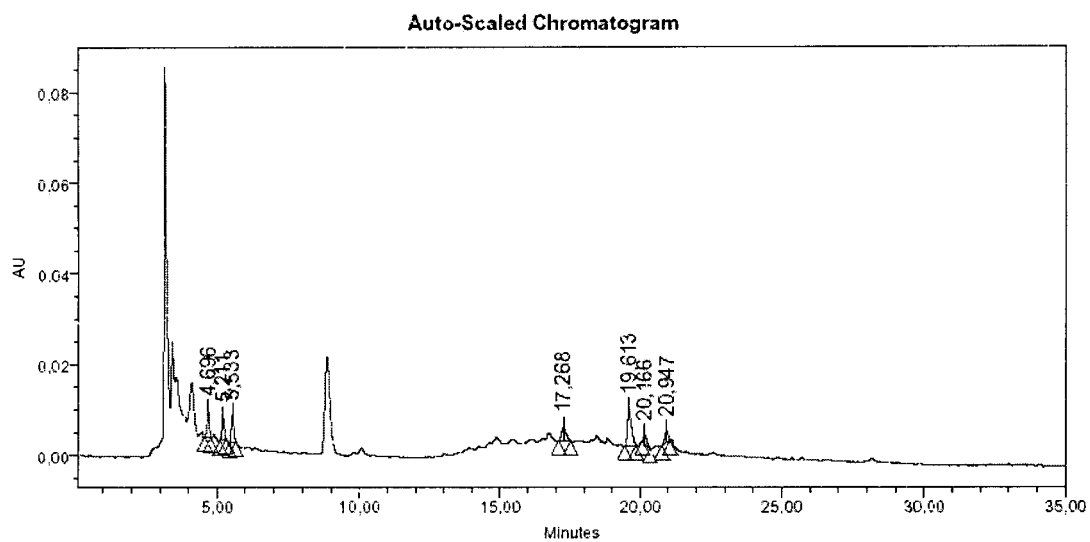


Figura 29. Cromatograma del extracto acuoso de *S. rostratum*.

Nombre de la muestra: *T. mucronatum* (1.03 mg/ml)

Tiempo de corrida: 35 min

Fecha de adquisición: 24/02/05

Procesamiento: 23/08/06

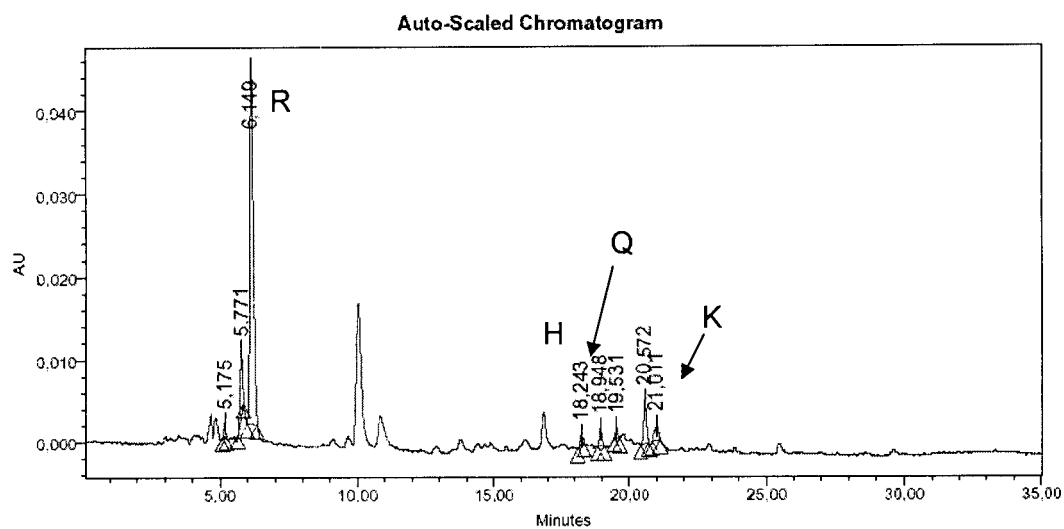


Figura 30. Cromatograma del extracto acuoso de *T. mucronatum* (R = rituna, H = hesperitina, Q = quercetina, K = kaempferol).

VII. DISCUSIÓN

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos tienen una gran inestabilidad química frente a la luz, el aire y la temperatura, debido a que se oxidan con facilidad. Además, tienen solubilidades muy variadas. Por esta razón, se escogió en el presente trabajo la digestión con agua como método de extracción relativamente suave que proporcionara una extracción efectiva y con menos riesgos de obtener artefactos.

Por otra parte, la selección de la longitud de onda de detección de los flavonoides se hizo utilizando un detector de arreglo de diodos, el cual permite, a través de un barrido, determinar la longitud de onda de máxima intensidad de los picos correspondientes a los estándares buscados. La mayor respuesta y la mayor estabilidad de la línea base se obtuvieron a 280 nm. Todos los análisis se efectuaron a esa longitud de onda.

La casi totalidad de los flavonoides descritos con anterioridad en algunas de estas plantas fueron aislados de extractos orgánicos, u orgánico-acuosos, a pesar de que en el uso tradicional de las plantas medicinales, se consumen principalmente extractos acuosos en forma de maceraciones, infusiones, digestiones y decocciones. El estudio del perfil de flavonoides en extractos acuosos se ha limitado por lo general a los del té negro y del té verde. Se ha sostenido que los flavonoides son los principales compuestos presentes en esos extractos acuosos y que ejercen las actividades antihipertensivas, hipotensivas, o preventivas de enfermedades cardiovasculares y del cáncer. Sin embargo, son escasos los estudios que determinan la presencia de esos metabolitos en los extractos acuosos que se consumen. Por ello, el presente trabajo, con sus limitaciones, aporta datos sobre la hipótesis de que los principales componentes medicinales en esas especies son los flavonoides. Se ha descrito un inmenso número de flavonoides, por lo cual es poco realista adquirir un gran número de ellos como estándares para análisis por cromatografía. Por esta razón, se decidió buscar solamente algunas de las agliconas más frecuentes para la mayoría de los flavonoides (ver punto V.1.3). En los extractos, los flavonoides

naturales pueden encontrarse en su forma de aglicona y/o en su forma glicosídica. Por esta razón, se investigó su presencia en los extractos sin hidrolizar y en los extractos hidrolizados de algunas de las especies. Como criterio de identificación se utilizaron los tiempos de retención de los estándares. Al respecto, un problema con el que se enfrentó durante los análisis fue la poca reproducibilidad de los tiempos de retención al hacer los análisis en días diferentes, aún para el mismo estándar. Sin embargo, se obtuvieron datos similares con un margen de error en los tiempos de retención aceptable para ese tipo de determinaciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tiempos de retención experimentales obtenidos en las mismas condiciones analíticas para los flavonoides utilizados como estándares.

Flavonoide	Tiempo de retención registrado (min) en diferentes días	Tiempo de retención (min) obtenido el día del análisis del extracto
Quercetina	19.120 19.223	19.223
Catequina	4.987 5.001 5.008 5.211	5.008
Kaempferol	21.097 21.414 21.681 21.880	21.414
Hesperitina	17.943 18.004	18.006
Rutina	6.068 6.145 6.673	6.065

Tres de los estándares buscados (kaempferol, quercetina y hesperitina) tuvieron tiempos de retención cercanos entre sí en las condiciones de análisis (21.41, 19.22 y 18.00 min, respectivamente). Por lo tanto, la identificación de esos debió de considerar esas pequeñas dispersiones. Después de efectuar un análisis comparativo de los cromatogramas de estándares y extractos, se pudo determinar la presencia de los metabolitos buscados en algunos de los extractos, aunque el área bajo la curva fuera mínima (Cuadro 4). Los estándares que más frecuentemente estuvieron presentes en las plantas fueron catequina, quercetina y hesperitina y los menos frecuentes rutina y kaempferol. No se detectó ninguna de las agliconas en tres de los extractos: *A. palmeri*, *S. edule* y *S. rostratum*. La hesperitina se detectó únicamente después de efectuar la hidólisis ácida de dos de los extractos, los de *A. palmeri* y *C. murale*, lo cual sugiere que esa aglicona se encuentra en forma de glicósidos, entre ellos, la hesperidina. Asimismo, la rutina se encuentra sólo en *M. grandiflora* y *T. mucronatum*. Esos resultados comprueban en parte la hipótesis de que los flavonoides constituyen los principales agentes terapéuticos presentes en los extractos acuosos de la mayoría de las especies estudiadas.

Cuadro 4. Resumen del análisis de la presencia de los flavonoides investigados en las plantas. El signo + indica presencia.

Extracto	Catequina	Quercetina	Hesperitina	Kaempferol	Rutina
<i>A. palmeri</i>					
<i>A. palmeri</i> (hidrolizado)		+	+		
<i>B. frutescens</i>	+	+	+		
<i>C. murale</i>		+		+	
<i>C. murale</i> (hidrolizado)		+	+		

Cuadro 4. Resumen del análisis de la presencia de los flavonoides investigados en las plantas (continuación). El signo + indica presencia.

Extracto	Catequina	Quercetina	Hesperitina	Kaempferol	Rutina
<i>D. moldavica</i>			+		
<i>M. grandiflora</i>	+	+	+		
<i>P. serotina</i>	+				
<i>P. calyculatus</i>	+	+	+		
<i>P. calyculatus</i> (hidrolizado)	+				
<i>S. edule</i>					
<i>S. rostratum</i>					
<i>T. mucronatum</i>		+	+	+	+

VIII. CONCLUSIONES

El estudio mediante cromatografía de líquidos permitió establecer la presencia de los flavonoides más comunes presentes en las plantas medicinales estudiadas. Sin embargo, es importante recalcar que una identificación basada exclusivamente en tiempos de retención no puede considerarse como categórica, toda vez que compuestos diferentes pueden tener el mismo tiempo de retención en cualesquiera condiciones de análisis idénticas.

Las fluctuaciones en los tiempos de retención son una constante en análisis mediante cromatografía de líquidos. Por lo tanto, los datos experimentales obtenidos durante estos análisis son aceptables en el rango (< 1min).

Al parecer, la catequina, la quercetina y la hesperitina son los flavonoides más difundidos en esas plantas usadas para el tratamiento de los padecimientos cardiovasculares. Todos son buenos agentes antioxidantes y por lo tanto el consumo de las infusiones de esas plantas puede representar un beneficio real para la salud.

Los extractos de *S. rostratum* y *S. edule* no hidrolizados no mostraron ningún pico que se acercara a los tiempos de retención de los estándares. Sin embargo, ese resultado no puede excluir la presencia de esos metabolitos en sus formas glicosídicas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ali**, N.A., Julich, W.D., Kusnick, C., Lindequist, U. **2001**. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*: Vol. 74:173-179.
- Bah**, M., Gutierrez, D. M.; Escobedo, C., Mendoza, S., Rojas, J.I; Rojas, A. **2004**. Methylprotodioscin from the Mexican medicinal plant *Solanum rostratum* (Solanaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*: Vol. 32: 197-202.
- Beckman**, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H. Crow, J.P. **1994**. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods in Enzymology*: Vol. 233: 229-240.
- Buxton**, Noah D.; Kaiser, Robert A.; Buxton, Iain L. O **2003** Vascular actions of the polyphenolic catechin gallate EGCG: endothelium-dependent contraction and relaxation. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*: Vol. 46: 37-38
- Caballero-George**, C., Vanderheyden, P.M., Solis, P.N., Gupta, M.P., Pieters, L., Vauquelin, G., Vlietinck, A. **2003**. In vitro effect of sanguinarine alkaloid on binding of [3H]candesartan to the human angiotensin AT1 receptor *European Journal of Pharmacology*: Vol. 458: 257-262.
- Franke**, A.A., Custer, L.J., Cooney, R.V., Tanaka, Y., Xu, M., Dashwood, R.H. **2002**. Inhibition of colonic aberrant crypt formation by the dietary flavonoids (+)-catechin and hesperidin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: Vol. 505 (Flavonoids in Cell Function): 123-133
- Gohar**, A.A., Maatooq, G.T., Niwa, M. **2000**. Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*: Vol. 53: 209-303.
- Gordon**, E.A., Guppy, L.J., Nelson, M. **2000**. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Indian Medical Journal*: Vol. 49: 27-31.
- Jensen**, L.P., Lai, A.R. **1986**. Chayote (*Sechium edule*) causing hypokalemia in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*: Vol. 155: 1048-1049.

- Gu, H.F., Chen, R.Y., Sun, Y.H., Xing, J.G. 2004.** Studies on chemical constituents in herbs of *Dracocephalum moldavica*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*: Vol. 29: 232-234.
- Gu, H.F., Chen, R.Y., Sun, Y.H., Xing, J.G. 2005.** Studies on chemical constituents in herbs of *Dracocephalum moldavica* II. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*: Vol. 30: 677-679.
- Holcapek, M., Bandera, P., Zderadicka, P., Hruby, L. 2003.** Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A.*: Vol. 1010: 195-215.
- Kim, H., Kong, H., Choi, B., Yang, Y., Kim, Y., Lim, M.J., Neckers, L., Jung, Y. 2005.** Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutical Research*: Vol. 22: 1499-1509.
- Kishore, K., Singh, M. 2005.** Rutin (a bioflavonoid antioxidant) attenuates age-related memory deficits in mice. *Biomedical Research*: Vol. 16: 6-10.
- Li, J.B., Ding, Y. 2001.** Studies on chemical constituents from *Dracocephalum moldavica* L.. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*: Vol. 26: 697-698.
- Molina-Hernandez M, Tellez-Alcantara P, Martinez E. 2000.** *Agastache mexicana* may produce anxiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine*: Vol. 7:199-203.
- Moncada, S., Higgs, E.A. 1991.** Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation.*: Vol. 21: 361-374.
- Morales, M.A., Lozoya, X. 1994.** Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Medica*: Vol. 60: 313-7.
- Oladosu, L.A., Case, A.A. 1979.** Large animal hepatotoxic and nephrotoxic plants. *Veterinary and Human Toxicology*: Vol. 21: 363-5.
- Olszewska, M. 2005a.** Flavonoids from *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica*: Vol. 62: 127-133.
- Olszewska, M. 2005b.** High-performance liquid chromatographic identification of flavonoid monoglycosides from *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica*: Vol. 62: 435-41.

- Pan, X., Tan, N., zeng, G., Zhang, Y., Jia, R. 2005.** Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human Cathepsin B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*: Vol. 13820: 5819-5825.
- Park, J., Lee, J., Jung, E., Park, Y., Kim, K., Park, B., Jung, K., Park, E., Kim, J., Park, D. 2004.** In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. *European Journal of Pharmacology*: Vol. 496: 189-195.
- Park, J.S., Rho, H.S., Kim, D.H., Chang, I.S. 2006.** Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 54: 2951-6.
- Perrusquia, M., Mendoza, S., Bve, R., Linares, E., Mata, R. 1995.** Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*: Vol. 46: 63-69.
- Rodriguez-Cruz, M.E., Perez-Ordaz, L., Serrato-Barajas, B.E., Juarez-Oropeza, M.A., Mascher, D., Paredes-Carbajal, M.C. 2003.** Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 86: 213-218.
- Rojas, A., Mendoza, S., Moreno, J., Arellano, R.O. 2003.** Extracts from plants used in Mexican traditional medicine activate Ca(2+)-dependent chloride channels in *Xenopus laevis* oocytes. *Phytomedicine*: Vol. 10: 416-421.
- Rubbo, H., Darley-Usmar, V. and Freeman, B.A. 1996.** Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chemical Research in Toxicology*: Vol. 9: 809-820.
- Siciliano, T., De Tommasi, N., Morelli, I., Braca, A. 2004.** Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*: Vol. 52: 6510-6515.
- Terao, J. 2005.** Quercetin glycosides: Their absorption metabolism and antioxidant activity. *Bitamin*: Vol. 79: 3-11.
- Timoshin, A.A., Dorkina, E.G., Paukova, E.O, Vanin, A.F 2005.** Quercetin and hesperidin decrease the formation of nitric oxide radicals in rat liver and heart under the conditions of hepatitis. *Biofizika*: Vol. 50: 1145-1149.

- Velazquez, C., Calzada, F., Torres, J., Gonzalez, F., Ceballos, G. 2006.** Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*: Vol. 103: 66-70.
- Wu, C.H., Chen, C.W., Chen, H.C., Chang, W.C., Shu, M.J., Hung, J.S. 2005.** Elucidating the inhibitory mechanisms of magnolol on rat smooth muscle cell proliferation. *Journal of Pharmacological Sciences*: Vol. 99: 392-399.
- Yamaguchi, K., Liggett, J.L., Kim, N.C., Baek, S.J. 2006.** Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. *Oncology Reports*: Vol. 15: 275-281.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H. 2001.** Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology*: Vol. 39: 1045-1053.