



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE
NUEVE ESPECIES VEGETALES COMESTIBLES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DIANA GUADALUPE ROSALES ARTEAGA

DIRIGIDA POR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DIAZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.

No. Adq. H30284

No. Título _____

Clas. TS

664.028

R788d



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE
NUEVE ESPECIES VEGETALES COMESTIBLES”**

TESIS

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

PRESENTA

DIANA GUADALUPE ROSALES ARTEAGA

DIRIGIDA POR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

SINODALES

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ.
DIRECTOR

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA
SINODAL

M en C VALENTINA SERRANO CÁRDENAS
SINODAL

Q. B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	2
II.1 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS Y EN ALIMENTOS.	2
II.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO.	2
II.3 CONSECUENCIAS DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS.	3
II.4 ¿QUÉ SON LOS ANTIOXIDANTES?	4
II.5 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES.	6
II.6 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE ANTIOXIDANTES USADOS COMO ADITIVOS EN ALIMENTOS.	10
II.7 FUENTES POTENCIALES DE ANTIOXIDANTES NATURALES.	11
II.8 INFORMACIÓN GENERAL DE LAS ESPECIES OBJETO DE ESTUDIO.	14
II.9 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	35
III HIPÓTESIS	36
IV OBJETIVO	37
GENERAL	37
ESPECÍFICOS	37

V	METODOLOGÍA	38
V.1	MATERIALES	38
V.1.1	Procesamiento del material vegetal.	38
V.1.2	Procesamiento del extracto metanólico.	38
V.1.3	Determinación de fenoles totales.	38
V.1.4	Determinación de flavonoides totales.	39
V.1.5	Determinación de la actividad antioxidante.	39
V.1.6	Determinación de la actividad antimicrobiana.	40
V.2	MÉTODOS	41
V.2.1	Identificación y recolecta del material vegetal.	41
V.2.2	Manejo del material vegetal.	41
V.2.4	Determinación de fenoles totales.	42
V.2.5	Determinación de flavonoides totales.	43
V.2.6	Determinación de la actividad antimicrobiana.	44
V.2.7	Determinación de la actividad antioxidante.	45
VI	RESULTADOS	47
VI.1	Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólicos.	47
VI.2	Determinación de fenoles totales.	48
VI.3	Determinación de flavonoides totales.	49
VI.4	Determinación de la actividad antioxidante.	51
VI.5	Determinación de la actividad antimicrobiana.	66
VII	DISCUSIONES	67
VII.1	Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólicos.	67
VII.2	Determinación de fenoles totales.	67
VII.3	Determinación de flavonoides totales.	67
VII.4	Comparación entre las cantidades de fenoles totales y flavonoides totales presentes en la muestra.	68

VII.5	Determinación de la actividad antioxidante	68
VII.5.1	Primer método.	68
VII.5.2	Segundo método.	69
VII.5.3	Tercer método.	70
VII.5.4	Cuarto método.	71
VII.6	Relación de la concentración de fenoles totales y flavonoides totales con la actividad antioxidante.	73
VII.7	Determinación de la actividad antimicrobiana.	74
VIII	CONCLUSIONES	75
IX	BIBLIOGRAFÍA	77

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO CUADRO	PAGINA
1. Antioxidantes permitidos en alimentos.	5
2. Ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales.	9
3. Antioxidantes naturales en algunos ingredientes de alimentos.	10
4. Esquema del microplato utilizado en el método del β -caroteno.	46
5. Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólicos.	47
6. Valores para la curva de calibración de fenoles totales.	48
7. Valores para la curva de calibración de flavonoides totales.	49
8. Resultados de la determinación de fenoles totales	50
9. Resultados de la determinación de flavonoides totales.	50
10. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de <i>Malva parviflora</i> L., <i>Amaranthus hybridus</i> L. y <i>Chenopodium murale</i> L.	53
11. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de <i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K., <i>Brassica rapa</i> L. y <i>Cnidoscopus chayamansa</i> Mc. Vaugh.	54
12. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de <i>Rumex crispus</i> L., <i>Portulaca oleracea</i> L. y <i>Yucca filifera</i> Chabaud.	55
13. Actividad antimicrobiana de las especies vegetales en estudio.	66
14. Comparación entre las cantidades de fenoles totales y flavonoides totales de las especies con actividad antioxidante considerable.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO FIGURA	PAGINA
1. Flavonoides y compuestos relacionados.	12
2. Localización de las especies vegetales como malezas en el estado de Querétaro.	15
3. <i>Amaranthus hybridus</i> L.	16
4. <i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K.	18
5. <i>Brassica rapa</i> L.	20
6. <i>Chenopodium murale</i> L.	22
7. <i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc. Vaugh.	24
8. <i>Malva parviflora</i> L.	26
9. <i>Rumex crispus</i> L.	28
10. <i>Portulaca oleracea</i> L.	30
11. <i>Yucca filifera</i> Chabaud.	33
12. Curva de calibración para fenoles totales.	48
13. Curva de calibración para flavonoides totales.	49
14. Actividad antioxidante del extracto metanólico de <i>Malva parviflora</i> L. (MAL) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).	56
15. Actividad antioxidante del extracto metanólico de <i>Amaranthus hybridus</i> L. (AMA) a diferentes concentraciones mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).	57

16. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Chenopodium murale* L. (CHE) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia). 58
17. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Melampodium perfoliatum* H.B.&K. (MEL) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia). 59
18. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Brassica rapa* L. (BRA) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia). 60
19. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh. (CHA) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia). 61
20. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Rumex crispus* L. (Rum) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia). 62
21. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Portulaca oleracea* L. (POR) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia). 63
22. Actividad antioxidante del extracto metanólico *Yucca filifera* Chabaud. (YUC) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia). 64
23. Grafica comparativa entre especies con la concentración más alta. (50.5mg/ml). 65

24. Comparación de la actividad antioxidante de las especies objeto de estudio por el segundo método AA (% de inhibición relativo al control).	69
25. Comparación de la actividad antioxidante de las especies objeto de estudio por el tercer método ORR (relación antioxidante).	71
26. Comparación de la actividad antioxidante de las especies objeto de estudio por el cuarto método AAC (coeficiente de actividad antioxidante).	72

RESUMEN

En la actualidad la importancia de la búsqueda de aditivos 100% naturales procedentes de extractos de plantas o algún otro producto natural, radica en satisfacer las demandas de los consumidores ya que día a día se ha incrementado la demanda de alimentos altamente seguros, libres de contaminación microbiana así como de productos que no sean nocivos para la salud. Actualmente los investigadores se han interesado en los antioxidantes y antimicrobianos naturales, debido a las limitaciones sobre el uso de conservadores sintéticos, que normalmente son utilizados en la industria de procesamiento de alimentos. Se ha reportado que algunos de estos compuestos tienen algunos efectos colaterales. En el presente trabajo se determinó la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos metanólicos de nueve especies vegetales comestibles, procedentes del estado de Querétaro, se cuantificaron los fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos con la finalidad de observar si estos compuestos están relacionados con la actividad antioxidante. El ensayo utilizado para la determinación de fenoles totales fue el de Folin-Ciocalteu, los resultados se expresan en mg equivalente de ácido gálico por cada 100 gr. de extracto. Los flavonoides fueron determinados por el ensayo descrito por Liu y colaboradores, los resultados se expresan en mg equivalentes de catequina por cada 100 gr. de extracto. En la determinación de la actividad antioxidante se utilizó el método de la decoloración del β -caroteno que se calculó por cuatro diferentes métodos. La actividad antimicrobiana fue determinada por el método difusión en agar. De las especies utilizadas se consideraron solo cuatro con actividad antioxidante considerable (*Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Malva parviflora* L., *Rumex crispus* L. y *Cnidocolus chayamansa* McVaugh). Estas especies no necesariamente contienen los niveles más altos de fenoles o flavonoides que se reportaron, ninguna presentó actividad antimicrobiana con las cepas utilizadas.

I. INTRODUCCIÓN.

El hombre a través de los años busca nuevas alternativas para ir mejorando la calidad de vida, entre sus objetivos más importantes es mejorar la alimentación, sin embargo, para llevar una adecuada alimentación es imprescindible contar con alimentos fuera de temporada o simplemente poderlos conservar por más tiempo en condiciones optimas, aquí es donde la ciencia entra en acción, proporcionando los aditivos adecuados para lograr tal fin. Hoy se cuenta con una gama de aditivos que cubren las necesidades básicas, sin embargo la búsqueda de nuevos aditivos que cubran los requisitos de ser altamente seguros, económicos y que puedan utilizarse en grandes cantidades siendo inocuos; es debido a que en la actualidad los consumidores demandan que sus alimentos sean 100% naturales, ya que se ha relacionado el incremento de aditivos químicos con el incremento de enfermedades degenerativas, de ahí la inquietud del consumidor por consumir productos de fuentes seguras como los de origen natural.

La razón de la búsqueda de aditivos 100% naturales como los extractos de plantas o algunos otros productos naturales, son satisfacer las demandas de los consumidores, encontrar aditivos GRAS (generalmente reconocido como seguro), beneficiar a los productores, proporcionar aditivos mucho más económicos e incrementar las fuentes de trabajo de los productores de materia prima.

Se han estudiado extractos de plantas y se ha encontrado que algunos poseen propiedades de importancia para lograr tal fin, las propiedades o características que evaluamos son la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos de algunas especies vegetales comestibles procedentes del estado de Querétaro.

II. ANTECEDENTES.

II.1 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS Y EN ALIMENTOS.

La oxidación de lípidos y la generación de radicales libres son fenómenos naturales en sistemas biológicos y en alimentos. En los sistemas biológicos, varios mecanismos bioquímicos de defensa incluyen enzimas, trazas de mineral y vitaminas antioxidantes que protegen a los componentes celulares del daño oxidativo. En los sistemas alimenticios se encuentran antioxidantes que imparten cierta protección contra la oxidación. Sin embargo los antioxidantes naturales se pierden a menudo durante el procesamiento o almacenamiento, necesitando la adición de antioxidantes exógenos.

En los sistemas biológicos, la formación de radicales libres orgánicos reactivos es llevada a cabo por numerosos agentes y mecanismos como la alta tensión de oxígeno, radiación y el metabolismo xenobiótico. Los radicales libres formados son altamente reactivos con las moléculas de oxígeno, formando radicales peróxido e hidroperóxidos iniciando de esta manera reacción en cadena (Hudson, 1990).

II.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y DE NITRÓGENO.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son varias formas de oxígeno y nitrógeno activadas que incluyen radicales libres como iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}) y radicales de óxido nítrico (NO^{\cdot}), también especies que no son radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido nitroso (HNO_2). En los organismos vivos, las especies ROS y RNS pueden formarse por diferentes rutas. La respiración aeróbica, estimula a los polimorfonucleares, leucocitos y macrófagos y por tanto aparecen los peroxisomas que son la principal fuente endógena que estimula la formación de la mayoría de los oxidantes producidos por las células. Las fuentes exógenas de los radicales

libres son el tabaco, la radiación, ciertos contaminantes, solventes orgánicos y pesticidas (Yildirim y col., 2001).

La mayoría de los organismos vivos incluyendo a los seres humanos poseen un sistema de defensa enzimático y no-enzimático eficiente contra el exceso de producción de ROS y RNS protegiéndolos contra los daños oxidativos. Sin embargo diferentes factores externos como los citados anteriormente además del envejecimiento disminuyen la capacidad de tal sistema, el resultado son perturbaciones del equilibrio redox, siendo este estable en condiciones saludables. Por tal razón los antioxidantes son importantes por que actúan como secuestradores de especies reactivas, por que pueden prevenir o detener enfermedades oxidativas (Pietta y col., 1998).

II.3 CONSECUENCIAS DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS.

En sistemas celulares, la peroxidación de lípidos es de gran importancia principalmente en biomembranas donde la mayoría de las enzimas activadoras de oxígeno están presentes (Hudson, 1990).

De los componentes intracelulares y extracelulares como los lípidos, las proteínas, enzimas, DNA y RNA constituyen el mayor blanco de estas especies reactivas y el resultado es el daño asociado con las enfermedades degenerativas "oxidación" (Yildirim y col., 2001). De manera adicional se piensa que esta peroxidación de lípidos esta fuertemente asociada con el envejecimiento y la carcinogénesis entre otras enfermedades degenerativas (Tsuda y col., 1994).

Se ha sugerido que hay una relación inversa entre el consumo de alimentos ricos en antioxidantes y la incidencia de enfermedades humanas. ROS y RNS pueden causar daño al DNA originando así una mutación. Estas especies han sido implicados en más de 100 enfermedades incluyendo la malaria, síndrome de inmunodeficiencia adquirido , enfermedades del corazón, arterosclerosis, diabetes y cáncer. Por consiguiente la investigación en la determinación de fuentes de antioxidantes naturales es importante (Yildirim y col., 2001).

Los alimentos sufren una cadena de cambios en la matriz natural debido a la maduración, la cosecha, procesos primarios y el almacenamiento. Estos cambios son causados por varios factores incluyendo, reacciones de degradación por contaminación microbiana y auto-oxidación de lípidos (Madhavi y col., 1996). La reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los compuestos orgánicos conduce a numerosos cambios degenerativos que reduce el tiempo de vida de muchos productos de interés para el ser humano (Hudson , 1990).

La oxidación de lípidos es una reacción en cadena de radicales libres y esto causa un cambio total en las propiedades sensoriales y valor nutritivo de los alimentos. Los cambios en color, textura, olor y sabor; pérdida de vitaminas y daño a las proteínas son algunos de los efectos de la oxidación de lípidos (Pietta y col., 1998). El ataque de la oxidación de lípidos puede ser retardado por la adición de antioxidantes.

II.4 ¿QUÉ SON LOS ANTIOXIDANTES?

Los antioxidantes son un grupo de químicos efectivos que extienden la vida de almacenamiento de una extensa variedad de alimentos. El uso de antioxidantes data de los años cuarenta. Sustancias naturales fueron usadas inicialmente como conservadores de grasas y aceites, los cuales fueron rápidamente remplazados por muchos compuestos sintéticos que mantenían actividad antioxidante y eran de fácil disponibilidad. El uso de antioxidantes también fue extendido a una amplia variedad de alimentos incluyendo a aquellos alimentos con alto contenido de grasas, cereales e incluso productos que contienen muy bajo contenido de lípidos. La mayoría de la materia prima utilizada para la fabricación de alimentos contienen antioxidantes naturales, sin embargo durante el proceso o almacenamiento, los antioxidantes naturales son degradados, necesitando la adición de antioxidantes químicos. En años recientes los antioxidantes naturales han venido a ser preferidos por los consumidores y fabricantes principalmente por su alta seguridad en comparación con los antioxidantes sintéticos. En general, la función de los

antioxidantes es reducir la iniciación de las reacciones en cadena de los radicales libres y funcionar a muy bajas concentraciones, 0.01% o menos. Los antioxidantes no pueden sin embargo revertir el proceso de oxidación o prevenir el ranciamiento hidrolítico.

El uso de antioxidantes en productos de alimentación es regulado por las leyes del país o estándares internacionales, aunque muchos compuestos naturales y sintéticos tienen propiedades antioxidantes solo algunos de ellos pueden ser aceptados como sustancias “generalmente reconocido como seguro” (GRAS). El cuadro 1 presenta los antioxidantes permitidos para uso en alimentos .

Cuadro 1. Antioxidantes permitidos en alimentos (Madhavi y col., 1996).

Ácido ascórbico.	Glicina
Ascorbil palmitato y estearato	Goma guaica
Anoxomero	Lecitina
Butil hidroxianisol	Ionox-100
Butilhidroxitolueno	Polifosfatos
Ter- Butilhidroxiquinona	Propil, octil, y dodecil galatos
Ácido cítrico, esteres esteárilico e isopropílico	Ácido tartárico
Ácido eritorbico.	Ácido tiodiopropiónico, esteres dilaurílico y diesterílico.
Etoxiquina	Tocoferoles
Ácido ethilenediamioetetracético y sales de calcio y sodio	Trihidroxi-butirofenona.

Los antioxidantes deben cubrir varios requerimientos antes de ser aceptados para la incorporación a los alimentos. El antioxidante debe ser soluble en grasas, y no debe proporcionar color, olor, o sabor a la grasa, incluso en un largo almacenamiento y debe ser efectivo después de un año a temperatura de 25-30°C, debe ser estable en procesos de altas temperaturas protegiendo el producto final, debe ser fácilmente incorporado, y ser efectivo a bajas concentraciones.

Un antioxidante es considerado seguro si cumple con dos condiciones: si la LD₅₀ debe ser menor de 1000 mg/Kg del peso del cuerpo, y el antioxidante puede no tener ningún efecto significativo sobre el crecimiento de un animal experimental a largo plazo a un nivel 100 veces el nivel propuesto para el consumo humano. La aprobación de antioxidante para alimentos requiere extensos estudios toxicológicos, estudios sobre posible mutagénesis, teratogenicidad, y efectos carcinogénicos.

En general los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas por inhibir la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de la oxidación.

II.5 CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES.

— En general se pueden clasificar en base a su función y en base a su naturaleza.

a. CLASIFICACIÓN CON BASE A SU FUNCIÓN.

Basándonos en la función los antioxidantes se clasifican en primarios y secundario.

- ANTIOXIDANTES PRIMARIOS.

Los antioxidantes primarios terminan las reacciones en cadena de los radicales libres por la donación de hidrógenos o electrones a los radicales libres convirtiéndolos en productos más estables. Los antioxidantes primarios son efectivos a muy bajas concentraciones y a los niveles más altos ellos pueden volverse prooxidantes.

Cualquiera de los antioxidantes primarios puede retrasar o inhibir el paso de iniciación reaccionando con un radical libre de las grasas o inhibir el paso de propagación reaccionando con los radicales peroxi o alcoxi.



El radical libre-antioxidante cualquiera puede interferir con la reacción cadena-propagación formando compuestos peróxidos-antioxidantes (Madhavi y col., 1996).



- ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS.

Los antioxidantes secundarios son compuestos que retardan la velocidad de auto-oxidación de lípidos por otros procesos que interrumpen la cadena de auto-oxidación convirtiendo los radicales libres en especies más estables. Estos pueden operar por una gran variedad de mecanismos incluyendo compuestos que unen iones metálicos, secuestradores de oxígeno, descomponen hidroperóxidos o especies no-radicales, absorben radiación UV o desactivan el oxígeno singulete. Los antioxidantes secundarios usualmente muestran solo actividad antioxidante si un segundo componente minoritario está presente en la muestra (Hudson, 1990).

Los antioxidantes secundarios o preventivos, funcionan descomponiendo los peróxidos de lípidos, estabilizando el producto final (Madhavi y col., 1996).

b. CLASIFICACIÓN CON BASE A SU NATURALEZA.

De acuerdo a su naturaleza hay dos categorías básicas de antioxidantes, sintéticos y naturales (Velioglu y col., 1998).

- ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS.

En general los antioxidantes sintéticos son compuestos con estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica (Velioglu y col., 1998). Los antioxidantes sintéticos incluyen al butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), *ter*-butil-hidroquinona (TBQH), y propil, octil y dodecil galatos, antioxidantes poliméricos como Anoxomer, Ionox-330 y Ionox -100, derivados de BHT, también ha sido introducido, pero estos no están siendo utilizados comercialmente (Madhavi y col., 1996).

- ANTIOXIDANTES NATURALES.

Los antioxidantes naturales pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de clorofila, aminoácidos y aminos) o carotenoides, entre otros (Velioglu y col., 1998). El área de los antioxidantes naturales se ha desarrollado enormemente en décadas pasadas, principalmente debido al incremento de limitaciones sobre el uso de antioxidantes sintéticos y se ha reforzado el conocimiento de problemas de salud. En general los antioxidante son preferidos por los consumidores porque son

considerados seguros. Se muestra una lista de algunas de las ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales (cuadro 2).

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales
(Madhavi y col., 1996).

VENTAJAS	DESVENTAJAS.
Realmente aceptados por los consumidores, ya que son considerados como seguros y no como un químico.	Es mas costoso en caso de necesitar purificar, y es menos eficiente si no se purifica.
No requiere de cuestionamiento para la legislación si es un producto de un alimento, este es considerado "generalmente reconocido como seguro" (GRAS)	Las propiedades de diferentes preparaciones varían si no están purificados
	Muchas veces no se conoce que tan seguros son.
	Muchos dan color, cambian el sabor del producto.

Es muy común que los alimentos contengan ingredientes que son compuestos antioxidantes; sin embargo, esos ingredientes pueden ser usados solamente si son compatibles con la textura, el color y sabor del producto final. En el cuadro 3 se muestra una lista de sustancias que se encuentran en los alimentos y que tienen actividad antioxidante (Madhavi y col., 1996).

Cuadro 3. Antioxidantes naturales en algunos ingredientes de alimentos
(Madhavi y col., 1996).

Fuente	Antioxidante
Aceite y aceite de semillas	Tocoferoles y tocotrienoles y sustancias relacionadas; resinas de aceite de olivo; fosfolípidos.
Salvado de avena y arroz	Varios compuestos derivados de lignina.
Frutas y vegetales.	Ácido ascórbico; ácidos hidroxicarboxílicos; flavonoides carotenoides.
Especies, hierbas, te, cocoa	Compuestos fenólicos.
Proteínas y proteínas hidrolizadas.	Aminoácidos; dihidropiridinas.

II.6 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE ANTIOXIDANTES USADOS COMO ADITIVOS EN ALIMENTOS.

Actualmente un sector de la población consume productos que contienen etiquetas con leyendas “todo natural”, el volumen de tales productos en el mercado se ha incrementado hasta un 175%, exigiendo que se encuentren libres de aditivos o preservativos. En este sentido, por consecuencia se ha estado investigando ampliamente en la identificación e incorporación de nuevos antioxidantes naturales. El área de investigación de antioxidantes naturales se ha desarrollado ampliamente debido a las limitaciones sobre el uso de antioxidantes sintéticos, como el butil-hidroxi-tolueno (BHT) y butil-hidroxi-anisol (BHA), que normalmente son usados en el procesamiento de alimentos, se ha reportado que estos compuestos tienen algunos efectos colaterales (Madhavi y col., 1996).

La toxicología de los antioxidantes ha sido una de las áreas más controversiales en el debate de la seguridad de aditivos para alimentos. En años recientes los problemas han aumentado con los antioxidantes butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) cuando se han realizado nuevos estudios a largo plazo y estos mostraron que el BHT y BHA pudieran producir tumores en animales. Normalmente no se permite el uso de aditivos químicos que causen cáncer en estudios a largo plazo, y si las autoridades regulatorias tuvieran dudas acerca de la seguridad, tendrán que someter dichos compuestos a pruebas para ser aprobados y comprobar si son carcinogénicos genotóxicos.

Sin embargo con BHA y BHT, los nuevos resultados chocan con los primeros resultados, su importancia para la valoración de riesgo en el hombre esta rodeado de incertidumbres, los toxicólogos están considerando extrapolar los resultados de animales experimentales al hombre (Hudson, 1990).

II.7 FUENTES POTENCIALES DE ANTIOXIDANTES NATURALES.

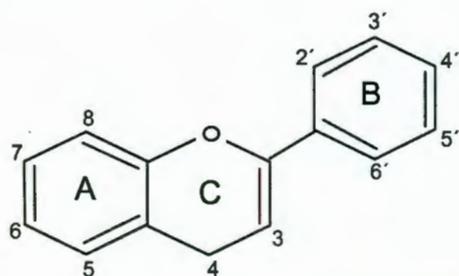
En años recientes, numerosos reportes han sido publicados sobre la identificación de nuevos antioxidantes naturales de plantas, animales, fuentes microbianas y productos de alimentos procesados.

Además de identificar las fuentes de los antioxidantes, han aparecido numerosos reportes sobre identificación y aislamiento de varios compuestos con actividad antioxidante. La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos, con la excepción de los tocoferoles. Algunos de los compuestos mayoritarios reportados hasta ahora son los flavonoides y compuestos relacionados en extractos de plantas.

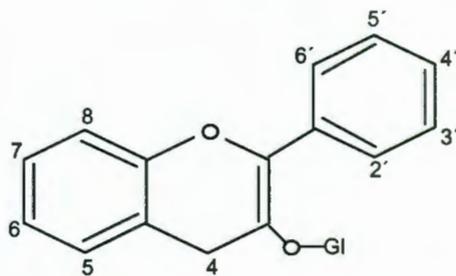
- FLAVONOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS.

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más extensos de los metabolitos secundarios en plantas. Estos se encuentran en todas las partes de la planta. La estructura química esta basada sobre un esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆. varios subgrupos son clasificados sobre la base de la sustitución en la estructura del anillo C y en la posición del anillo B como se muestra en la figura 1. Los subgrupos mayoritarios son flavonoles, flavonas, isoflavonas, catequinas, proantocianidinas y antocianinas.

Las propiedades antioxidantes reportadas por numerosos extractos de hojas, semillas, corteza de semillas, frutos y tallos son principalmente debido a flavonoides y al ácido cinámico. Los flavonoides funcionan como antioxidantes primarios, quelantes y recogedores del anión superóxido (Madhavi y col., 1996).



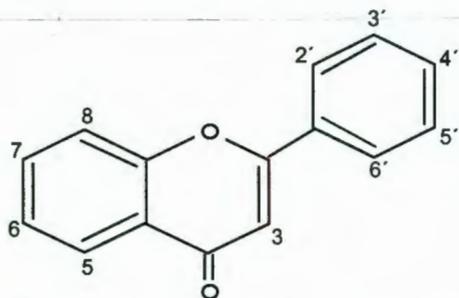
C₆-C₃-C₆ Configuración de flavonoides.



Antocianinas

Cianidina-3-glucosido 5'=4'=5=7=OH

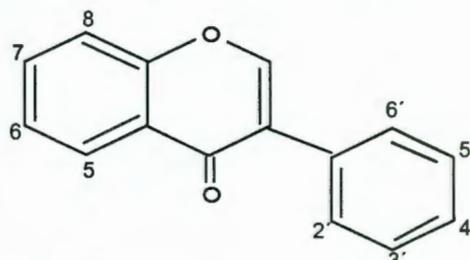
Okanina = 2'=3'=4'=OH, 3'=5'=OCH₃



Flavonas

Luteolina 5=7=3'=4'=OH

Isovitexina 4'=5=7=OH, 6= glucosa



Isoflavonas

Daidzein 7=4'=OH

Genistein 5=7=4'=OH

Figura 1. Flavonoides y compuestos relacionados (Madhavi y col., 1996).

Las plantas comestibles producen una amplia variedad de fitoquímicos que tienen un alto potencial antioxidante. Los fitoquímicos más estudiados son la vitamina C, vitamina E, carotenoides y flavonoides entre otros. Durante los últimos años un gran número de plantas han sido investigadas con el objetivo de aislar compuestos que inhiban específicamente la actividad de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. La capacidad para inhibir esta actividad han sido evaluada utilizando diferentes técnicas basadas en espectrofotometría, resonancia electro-paramagnética y quimioluminiscencia (Pietta y col., 1998).

Estudios epidemiológicos han encontrado que las personas que consumen una alta proporción de vegetales verdes y amarillos en su dieta, tienen un bajo riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer (Kennelly y col., 1997).

- **COMPUESTOS FENÓLICOS DE HIERBAS Y ESPECIES.**

Los antioxidantes de hierbas y especias tienen un gran potencial para poder ser utilizadas. Las especias no sólo se han usado por sus propiedades de condimento sino también por la propiedad de servir como conservadores en los alimentos y esto se conoce hace cientos de años. Los primeros estudios científicos sobre su actividad antioxidante se realizaron en especias enteras o sus extractos, estos estudios indicaron que una amplia gama de extractos tiene propiedades antioxidantes. Estudios posteriores se han concentrado en el aislamiento e identificación de componentes activos de varias hierbas y especias como el romero, salvia, tomillo, maza, orégano, jengibre, pimienta, clavos de olor etc. Se ha demostrado que la mayoría de estos compuestos podrían ser tan eficaces como el BHT, BHA o α -tocoferol. Algunas de las desventajas con los extractos de la especia son su color y sabor. Varios estudios se han llevado a cabo para identificar y aislar compuestos que sean insípidos y sin olor.

- PROTEINAS, PEPTIDOS Y AMINOÁCIDOS.

Las proteínas, aminoácidos y peptidos tienen propiedades antioxidantes significativas. En general, funcionan como sinergistas con antioxidantes primarios, sin embargo algunas ocasiones se requieren cantidades de antioxidantes primarios similares a los que se utiliza normalmente (Madhavi y col., 1996).

II. 8 INFORMACIÓN GENERAL DE LAS ESPECIES OBJETO DE ESTUDIO.

Existe una gran variedad de plantas con propiedades antimicrobianas, antioxidantes, alimenticias, medicinales, etc. que poseen efectos asombrosos para mejorar algunos aspectos como la salud y nutrición. Ellas contienen una notable cantidad de vitaminas, sales minerales, oligoelementos y enzimas para beneficio del ser humano y actúan favorablemente sin producir efectos negativos, de ahí la importancia de investigar las fuentes naturales de dichas sustancias para mejorar la calidad de vida, por lo que se estudiaron nueve especies vegetales comestibles procedentes del estado de Querétaro.

LOCALIZACIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES OBJETO DE ESTUDIO EN EL ESTADO DE QUERÉTARO.

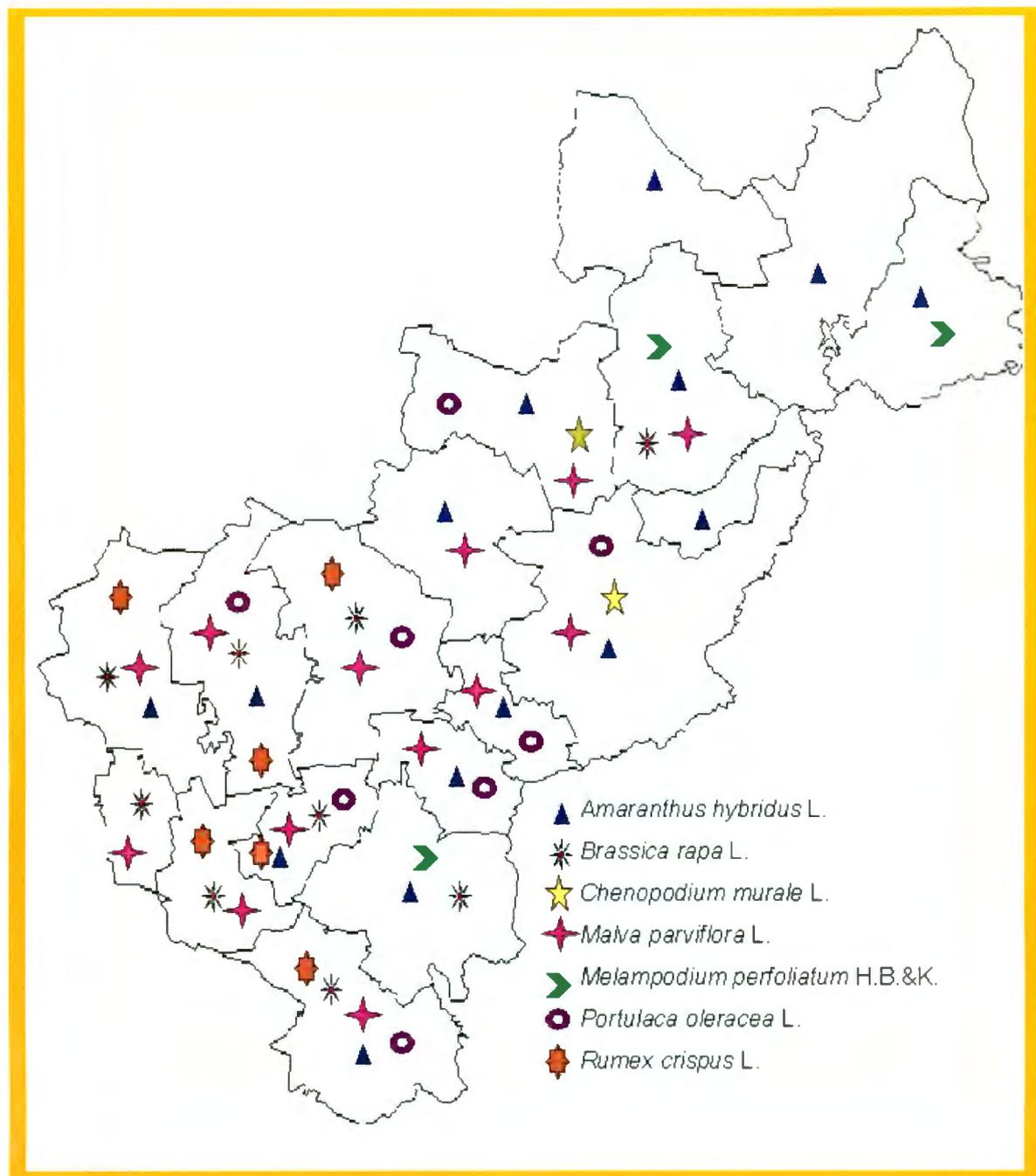


Figura 2. Localización de las especies vegetales como malezas en el estado de Querétaro (Suárez y col., 2004).

Las especies *Yuca filifera* Chabaud y *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh no son consideradas malezas.

Amaranthus hybridus L.



Figura 3. *Amaranthus hybridus* L (Guinjuan, 2000).

Nombre común: Quelite de pollo

Familia: AMARANTHACEAE

Descripción de la planta.

Planta herbácea, erecta, de hasta 1m de alto; tallo rojizo, cuadrangular, glabro; hojas ovadas, de 2 a 12 cm. de largo por 1.5 a 7 cm. de ancho, con pequeños tintes rojos. Las flores están agrupadas en espigas paniculadas, de 4 a 12 cm. de largo, color verde, pequeñas, algo espinosas en sus extremos. Los frutos son utrículos deshiscentes.

Origen, distribución y usos.

Originaria de México. Habita en clima cálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 2600 msnm. En el valle de México también se le llama “bledo”, “quintonil” o “quintolil” y “quelite”. Planta bastante común por todo el valle.

En estado “tierno” se usa como alimento ya sea hervido frito o asado, combinado o no con carne y chile. Suele venderse en los mercados. También se usa como alimento para animales. En San Pablito Pahuatlán, Puebla, se utiliza para la bilis, cocido y en baños.

Se encuentra distribuida en casi todo el estado de Querétaro, excepto en los municipios de Colón, Corregidora y Huimilpan. Se observa en varios cultivos. Se le emplea en casi todo el estado con frecuencia como forraje para toda clase de animales y como alimento cuando esta tierna (Suárez y col., 2004).

Melampodium perfoliatum H.B.&K.



Figura 4. *Melampodium perfoliatum* H.B.&K (Randall, 2005).

Nombre común: "Tinajilla" o "Tinaja"

Familia: ASTERACEA

Descripción de la planta.

Planta herbácea, erecta de hasta 1.5 m de alto, tallo estriado, glabro; hojas sésiles, abrazando el tallo, rómbico ovaladas, de 2 a 21 cm de largo por 15 cm. de ancho, de borde aserrado. Las flores están agrupadas en cabezuelas, en los extremos de las ramas, en número de 3 a 5, de color amarillo. Los frutos son aquenios de color café oscuro a negro, vilano ausente.

Origen, distribución y usos.

De origen probablemente americano. Se localiza en Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nayarit, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Veracruz, Michoacán, Estado de México, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Centroamérica. Encontrada en altitudes de 2,250 a 2650 msnm.

En el estado de Querétaro se le encuentra en los municipios de Landa de Matamoros, San Juan del Río y Pinal de Amoles a altitudes por debajo de las reportadas en el valle de México, de 1,200 a 2,075 msnm. En el municipio de Pinal de Amoles lo usan como alimento (Suárez y col., 2004).

Metabolito secundario aislado.

En estudios realizados se aisló ácido 18-angeloiloxicaurénico (Bohlmann y Zdero, 1976).

Brassica rapa. L.



Figura 5. *Brassica rapa* L (Randall, 2005).

Nombre común: “Nabo o Mostaza”

Familia: BRASSICACEAE.

Descripción de la planta madura.

Planta herbácea, erecta de 30 a 120 mm de alto; tallo pubescente; hojas inferiores divididas, con un lóbulo terminal grande, de 10 a 20 cm de largo, las superiores más pequeñas, enteras. Las flores pequeñas, con cuatro pétalos de color amarillo. Los frutos son silicuas alargadas de 1 a 1.5 cm, dehiscentes, con varias semillas.

Origen, distribución y usos.

Se presume que es una especie de origen Euroasiática, adventicia en América; muy difundida como maleza de los cultivos, borde de caminos, pastizales, campos abiertos, etc. Conocida también como “mostaza”, “nabo”, “vaina”, “pata de cuervo” y “semilla para los pájaros”. Se encuentra ampliamente distribuida en altitudes de 2,500 a 2,950 msnm. Se usa como alimento para aves domésticas. Puede ser portadora de bacterias, plantas parásitas y hongos.

La raíz hervida durante 15 minutos a dosis de 100 gr. por litro, actúa contra las inflamaciones intestinales crónicas. Cocidas y aplicadas en cataplasma reduce los sabañones. El jugo obtenido de la raíz cocida combate la tos y la bronquitis crónica. En las indias se emplea para tratar enfermedades de la piel y el estómago, mientras que extractos de la raíz se emplean para tratar la tuberculosis. Las hojas y flores son consumidas crudas o cocidas con sal en la cuenca de México, se registra como usos forrajero en el estado de Coahuila.

En el estado de Querétaro se localiza en los municipios de Amealco, Colón, Corregidora, El Marqués, Huimilpan, Pedro Escobedo, Pinal de Amoles, Querétaro y San Juan del Río, en altitudes por debajo de las reportadas para el valle de México. Es usada como forrajera para borregos, puercos y vacas en San Joaquín, Pinal y Huimilpan. En Pedro Escobedo, Amealco, San Joaquín, Huimilpan y Querétaro la usan como alimento cuando esta tierna (Suárez y col., 2004).

Chenopodium murale L.



Figura 6. *Chenopodium murale* L (Montbrison, 2000).

Nombre común: “Quelite o Quelite de pollo”

Familia: CHENOPODIACEAE

Descripción de la planta madura.

Planta herbácea, erecta de 20 a 50 cm de alto; tallo ramificado, farinoso; hojas rómbico-triangulares, de 2 a 8 cm de largo por 1.5 a 5 cm de ancho, farinosas. Las flores pequeñas, agrupadas en panículas verdes. Los frutos son pericarpios de color negro.

Origen, distribución y usos.

También conocida como “nechquelite”. Habita en clima semiseco y templado entre los 2,100 y los 2,200 msnm. Asociada a matorral xerófilo. Sus usos medicinales son: para trastornos de la piel como la sarna; padecimientos renales como el “mal de orín”, para la disentería y para controlar el vómito (Suárez y col., 2004).

Se ha reportado que las plantas pertenecientes a este género tienen amplias aplicaciones en la medicina tradicional. Es antihelmíntico, digestivo, anti-espasmódico, diaforético, emenagogo, se utiliza para el dolor de amenorrea, abortivo y ayuda en casos de asma, catarro y migraña (Gohar y col., 2000). Las hojas *C. murale* son utilizadas como ensalada (El-Sayed y col., 1999). En el estado de Querétaro se localiza en los municipios de Cadereyta y Peñamiller. En Cadereyta la usan como alimento (Suárez y col., 2004).

Metabolitos secundarios aislados.

Flavonoides glicosilados (kempferoles), desde un punto de vista fitoquímico contiene aceites esenciales, flavonoides, esteroides, alcaloides, cumarinas y sustancias similares a estrógenos (Gohar y col., 2000).

Evaluaciones farmacológicas:

La especie presenta actividad hipotensora; inducción de quinona reductasa (Gohar y Elmazar., 1997).

Cnidoscolus chayamansa Mc. Vaugh.



Figura 7. *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh (Montoya, 2004).

Nombre común: “Chaya”

Familia: : EUPHORBIACEAE

Descripción de la planta madura.

Es un arbusto herbáceo, alcanza una altura de 2 a 3 m, presenta hojas largas, pecioladas, de cinco picos e inflorescencia blanca. Crece en suelos con buena humedad y luminosidad (Montoya, 2004)

Origen, distribución y usos.

La chaya es cultivada en el sureste de México, en los estados de Yucatán, Quintana Roo, la cual ha sido tradicionalmente considerada un rica fuente de

proteínas. Se ha observado que los extractos acuosos de las hojas de esta planta tienen leche con actividad coagulante (Iturbe-Chiñas y col., 1986).

En México, actualmente se consumen las hojas tiernas en la cocina tradicional, utilizando variadas formas de presentación, como ensaladas, guisos, sopas, infusiones y como extracto para té (Montoya, 2003).

Metabolitos secundarios aislados.

Proteinasas (Yeh y col., 1986; Iturbide-Chiñas y col., 1986). Se han identificado la presencia de glicosidos de kaempferol y quercetina (Kuti y Konuro, 2004).

Evaluaciones farmacológicas.

La especie presenta actividad antioxidante (Kuti y Konuro, 2004) y actividad hipoglucemiante (Kuti y Kuti, 1999).

Malva parviflora L.



Figura 8. *Malva parviflora* L (Montbrison, 2000).

Nombre común: “Malva o Malva de quesitos”

Familia: MALVACEAE.

Descripción de la planta.

Planta herbácea, rastrera, o ascendente, usualmente de 50 cm. de alto; tallo casi glabro; hojas orbiculares de 2.5 cm de largo por 6 cm de ancho, con bordes ondulados. Las flores de 1 a 4 en las axilas de las hojas, de 8 a 12 mm de diámetro, de color lila o blanco. El fruto es un esquizocarpio de 5 a 10 mm de diámetro.

Origen, distribución y usos.

Señalan que es una planta de Europa y adventicia en América. En el valle de México también es llamada “Malva de quesitos”. Ampliamente distribuida en altitudes de 2,250 a 2,950 msnm como maleza ruderal y arvense. En el extranjero se le atribuye a esta especie cierto tipo de intoxicación, aún letal, que se observa en vacunos, equinos y principalmente, ovinos que la ingieren en gran cantidad. Los animales afectados por la ingestión de la planta presentan envenenamiento que se manifiesta con temblores musculares, vértigo y postración. En la intoxicación con esta planta es determinante la aparición de un periodo de excitación tras el cual sobreviene la muerte; si ésta no ocurre, los animales afectados generalmente se recuperan.

Se encontró que la malva en Amealco y Querétaro, es usada como planta medicinal, para combatir la tos, hervida con canela. La malva actúa principalmente como antiinflamatorio, también para bajar la fiebre, así como para lavados intestinales y para lesiones en la piel.

En el estado de Querétaro se encuentra en los municipios de Amealco, Cadereyta, Colón, Corregidora, El Marqués, Ezequiel Montes, Huimilpan, Pedro Escobedo, Peñemiller, Pinal de Amoles, Querétaro, Tolimán y Tequisquiapan. En Cadereyta y Pinal la usan como forraje para vacas y chivos. En Huimilpan, Pedro Escobedo y Corregidora la utilizan como planta medicinal para golpes y en Tolimán para curar heridas. En Pedro Escobedo también la consumen como alimento en estado tierno (Suárez y col., 2004).

Rumex crispus L.

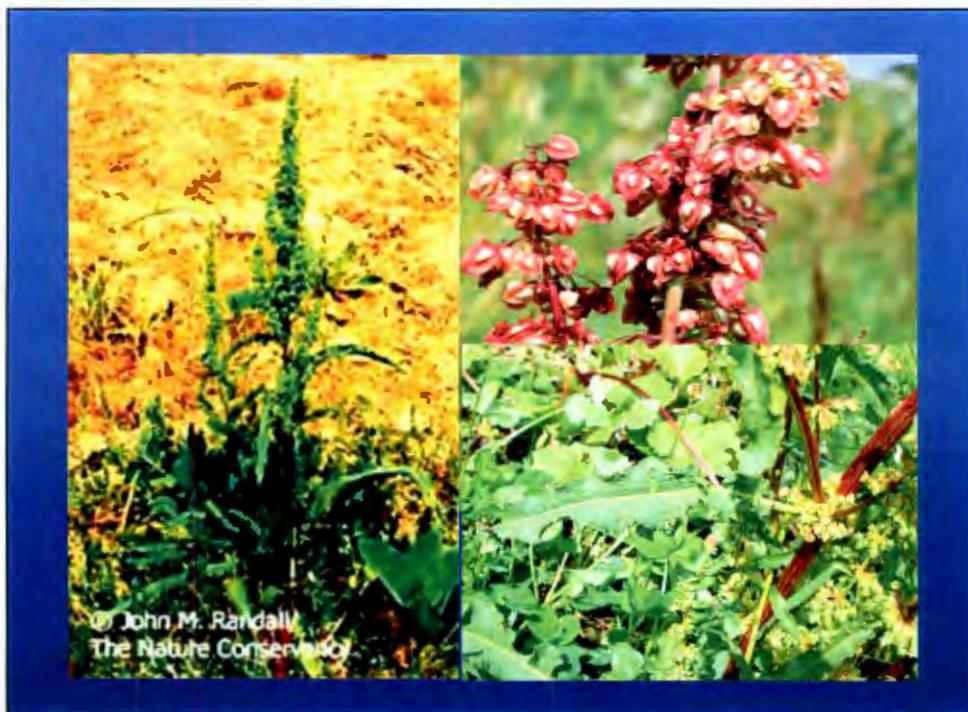


Figura 9. *Rumex crispus* L (Randall, 2005).

Nombre común: “Lengua de vaca”

Familia: POLYGONACEAE

Descripción de la planta madura.

Herbácea perenne, erecta, de 50 a 120 cm de alto; tallo estriado, glabro, poco ramificado; hojas en la parte basal lanceolado-oblongas de hasta 30 cm. de largo, hojas superiores más pequeñas. Las flores están dispuestas en inflorescencias verticiladas, de 10 a 50 cm de largo, de color verdoso, flores de 3 a 5 mm. Los frutos son aquenios de color rojo brillante, de 2 a 3 mm de longitud, de color oscuro brillante.

Origen, distribución y usos.

Planta originaria de Europa. También llamada “lengua de vaca cimarrón” y “vinagrera”. Se presenta en clima templado en altitudes de 1,950 a 2,500 msnm. Esta especie se desarrolla por arriba del círculo ártico en Noruega y la comunidad de los estados independientes (C.E.I.), se extiende arriba de los 65° latitud norte en Norteamérica y regiones templadas de Sudamérica, presente en Nueva Zelandia, Australia y Asia, al igual que en África. Ampliamente distribuida en el valle de México en las orillas de arroyos y zanjas en general, especie ruderal y arvense en cultivos diversos.

Planta que se cita comestible y medicinal por su raíz que es estimulante, tónica, astringente o laxante y activadora de la secreción biliar y por sus hojas emolientes. También se puede utilizar contra la “calentura”, y para sanar los riñones y heridas. En el estado de Oaxaca se usa para algunos tratamientos empleando las hojas en cataplasma y aplicándolas localmente. En Coahuila tiene uso forrajero.

En el estado de Querétaro se encuentra en los municipios de Amealco, El Marqués, Colón, Huimilpan, Pedro Escobedo y Querétaro. En el municipio de Huimilpan se utiliza como forraje para borregos. En Pedro Escobedo es usada para comer, pero cuando esta tierna (Suárez y col., 2004).

Evaluaciones farmacológicas.

Muestra actividad antioxidante y antimicrobiana. Los extractos en éter y etanol de las semillas y hojas muestran una actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923 y *B. subtilis* ATCC6633 (Yildirim y col., 2001).

Portulaca oleracea L.

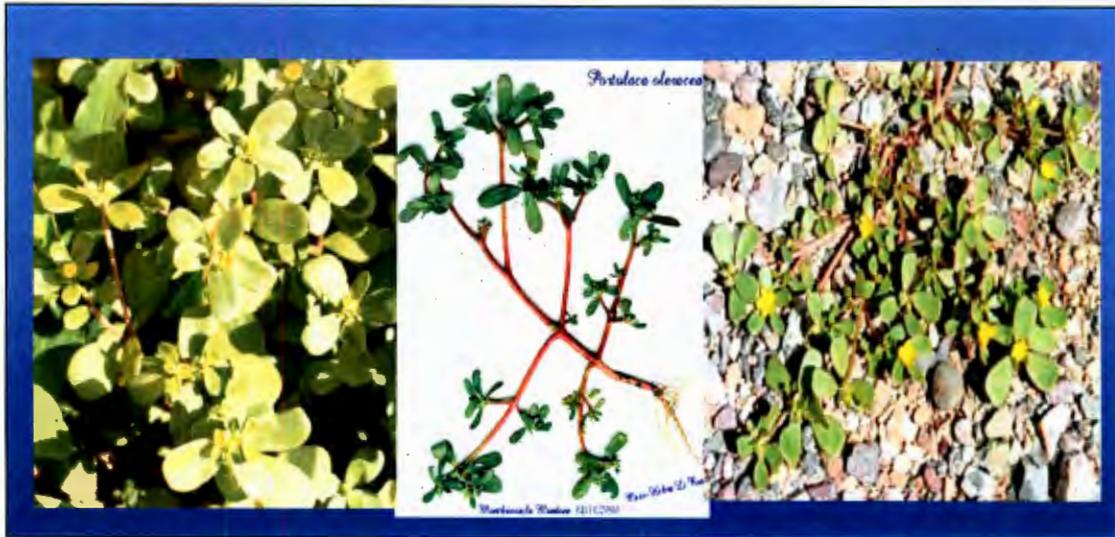


Figura 10. *Portulaca oleracea* L (Montbrison, 2000).

Nombre común: Verdolaga.

Familia: PORTULACACEAE

Descripción de la planta.

Hierba anual, suculenta, rastrera, de 5 a 40 cm de largo, tallo glabro, a veces rojizo, ramificado en forma radial, hojas espatuladas de 0.5 a 3 cm de largo por 0.2 a 1.5 cm de ancho, borde entero. Las flores solitarias de color amarillo a blanco, a veces rodeadas de pelo blanco, de 3 a 5 mm de diámetro. Los frutos son cápsulas que se abren cerca de la mitad, de color café claro.

Origen, distribución y usos.

Originaria de la India, fue naturalizada en Europa y de ahí paso a América. Actualmente es un planta cosmopolita y muy frecuente en los cultivos y jardines.

Posee una gran distribución en regiones templadas y tropicales del mundo. Está presente en numerosos municipios de la parte baja del valle de México en altitudes de 2,250 a 2,350 msnm. Los tallos y hojas se comen en ensalada. Se le atribuye principalmente usos medicinales relacionados con problemas digestivos tales como infecciones intestinales, parasitarias y estreñimiento. También se le conoce como “fraginera”, “mañanita”, “seda” y “verdolaga de agua” (Suárez y col., 2004).

Portulaca oleraceae es un importante vegetal cultivado en el sur de Europa y países mediterráneos y Asia. Tiene un sabor apacible. Las hojas y semillas pueden ser consumidas crudas, cocidas o en curtidos (Palaniswamy y col., 2001).

Es un vegetal usado tradicionalmente para aliviar el dolor y la inflamación. Es usado en la península arábiga como antiséptico, anti-escorbuto, antiespasmódico, diurético, vermífugo en úlceras orales y en trastornos urinarios. La planta es usualmente cortada en pequeños trozos tanto hojas como semillas y cocinadas o usadas tópicamente para afecciones de la piel. El jugo de las hojas en compresa es aplicado en las sien para aliviar el exceso de calor o para refrescar externamente las erisipelas, la infusión de las hojas es utilizada como diurético. Esta planta ha sido estudiada exhaustivamente en Nigeria y Escocia principalmente por su actividad como relajante muscular (Radhakrishnan y col., 2001).

En el estado de Querétaro se encuentra en los municipios de Amealco, Colón, Cadereyta, El Marqués, Ezequiel Montes, Pedro Escobedo, Peñamiller y Tequisquiapan. En el municipio de El Marqués se usa como alimento así como en Querétaro, Pedro Escobedo y Colón, pero en estado tierno (Suárez y col., 2004).

Metabolitos secundarios aislados.

Se ha identificado que es una fuente rica de ácidos grasos omega-3 (ω 3FA) y antioxidantes. Unos 100 gramos de hojas frescas pueden suplir 300-400 mg de ácido α -linolenico, 12.2 mg de α -tocoferol, 26.6 mg de ácido ascórbico, 1.9 mg de β -caroteno y 14.8 mg de glutatión. Los lípidos presentes son ricos en ácidos grasos

esenciales poli-insaturados, como el ácido linoleico y α -linoleico y ambos son esenciales para el crecimiento normal. Algunas investigaciones han demostrado que tienen un rol importante en enfermedades del corazón y que se requiere altas dosis en la dieta (Palaniswamy y col., 2001).

Evaluaciones farmacológicas.

Actividad neurofarmacológica; antimutagénico; relajante muscular (Radhakrishnan y col., 2001).

En los estudios farmacológicos que se han realizado se observa reducción en la actividad motora de ratas tratadas con extractos, también muestran actividad anticonceptiva en ratones y ratas. Los extractos poseen una gran variedad de efectos sobre el sistema nervioso central y periférico (Palaniswamy y col., 2001).

Yucca filifera Chabaud.

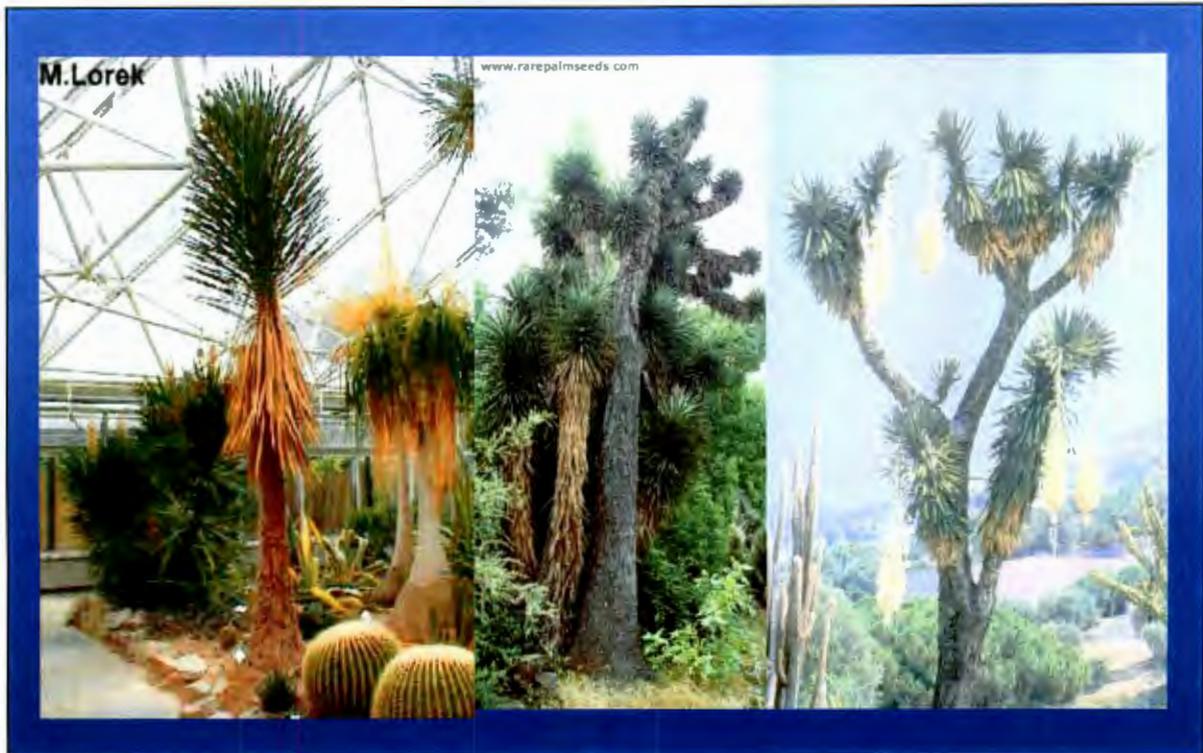


Figura 11. *Yucca filifera* Chabaud (López y col., 2004).

Nombre común: Izote (valle de México), Palma corriente(Querétaro), Palma grande (Coahuila), Palma china (San Luis Potosí).

Familia: AGAVACEA

Descripción de la planta madura.

Palma de muchas ramas, de 10 m de alto o más, con hojas de 30-45 cm de largo por 2-2.4 cm de ancho, de color verde, con los márgenes delgados de color pardo castaño y fibrosos; inflorescencias terminales, erectas en el principio, colgante después de la floración, en panículo oval, grande; flores blanco cremosas, segmentos del tépalo ovales o anchamente oblongos, agudos; filamentos más cortos que los tépalos; fruto oblongo, abayado, de 5-7 cm de largo; semillas negruzcas planas, delgadas. La floración es de mayo a julio.

Origen , distribución y usos.

Nativa de México, se distribuye del norte al centro de México. Crece en partes altas y medias de las laderas. Se utiliza como planta de ornato, principalmente se utilizan las flores y frutos (dátiles) como alimento, la inflorescencia la utilizan como forraje para ganado. Se obtienen productos usados como materia prima en la industria farmacéutica para la fabricación de hormonas, donde destaca por su cantidad de sarsapogenina empleada para la elaboración de anticonceptivos. En la industria alimenticia se produce aceite comestible de la semilla y en la industria de la celulosa para la fabricación de papel de kraft que es muy resistente al desgaste, en la industria textil se utilizan las hojas como materia prima para la obtención de fibras de buena calidad. Su aprovechamiento es regulado por la norma NOM-007-RECNAT-1997. Sin embargo para otros usos de autoconsumo están regulados las normas NOM-005-RECNAT-1997, NOM-008-RECNAT-1996 y NOM-012-RECNAT-1996 (López y col., 2004).

Metabolitos secundarios aislados.

Se han aislado los siguientes metabolitos: sarsapogenina, sapogeninas esteroidales, resveratrol (Quintero y col., 1987).

II.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La inhibición del crecimiento y actividad antimicrobiana es uno de los fines principales del uso de conservadores. Los conservadores inhiben a los microorganismos alterando sus membranas celulares, su actividad enzimática o mecanismos genéticos (Frazier, 1976).

Disponer de alimentos inocuos es la mayor preocupación de la industria alimenticia. Exclusivamente en los Estados Unidos se ha estimado que hay de 6 a 33 millones de casos por año de alimentos portadores o causantes de enfermedad. La demanda de productos alimenticios seguros se ha incrementado, así como también los casos de alimentos contaminados.

Para la prevención de infección por patógenos, los métodos de cocción o pasteurización pueden ser empleados. Esta es una manera efectiva de inhibir el crecimiento de patógenos en alimentos, sin embargo su uso es limitado. Para alimentos como frutas y vegetales la cocción y pasteurización no son apropiadas ya que sus propiedades de sensación y textura cambian. Actualmente en los procesos industriales de los alimentos se usan conservadores químicos y antimicrobianos químicos para inhibir la degradación provocada por químicos, enzimas y microorganismos. Los antimicrobianos comúnmente empleados son ácido benzoico, ácido ascórbico, y sulfitos. Desde que los extractos de plantas y otros productos de origen natural han sido clasificados como sustancias GRAS su inclusión en los productos alimenticios para controlar que los alimentos sean portadores de patógenos, puede ser una solución a este problema. Los extractos de plantas de especies y hierbas son bien conocidas para inhibir el crecimiento de bacterias, levaduras y moho. De hecho una clase de compuestos presente en plantas que son responsables de este efecto son los compuestos fenólicos, que en las plantas comestibles incluye una gama amplia de compuestos y un espectro ancho de actividades funcionales (Seaberg y col., 2003).

III. HIPÓTESIS.

En las especies vegetales con mayor cantidad de flavonoides totales se podría esperar una mayor actividad antioxidante.

IV. OBJETIVOS.

GENERAL.

Determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos metanólicos de especies vegetales usadas como alimento por algunas comunidades del estado de Querétaro.

ESPECIFICOS.

- Cuantificar el contenido de fenoles totales.
- Cuantificar el contenido de flavonoides.
- Identificar la especie vegetal con mayor actividad antioxidante y antimicrobiana.

V. METODOLOGÍA.

V.1 MATERIALES.

V.1.1 Procesamiento del material vegetal.

Material de laboratorio.

- Mortero con pistilo.

Equipos.

- Estufa para secado a 39°C.
- Balanza granataria marca Ohaus.

V.1.2 Procesamiento del extracto metanólico.

Material de laboratorio.

- Matraces, pipetas, vasos, embudos, capilares, papel filtro, etc.).

Reactivos.

- Disolventes orgánicos grado reactivo: hexano, acetona, metanol.
- Disolventes orgánicos grado HPLC: acetona.
- Gas: argón.

Equipos.

- Rotaevaporador Büchi de alto vacío, con baño, soporte y elevador.
- Bomba de alto vacío para Rotaevaporador 0.1 microHg motor ¼ HP.

V.1.3 Determinación de fenoles totales.

Material de laboratorio.

- Tubos de ensayo, gradilla, micropipetas, vasos de precipitado, papel aluminio, cronómetro.

Reactivos.

- Disolventes grado reactivo: metanol, agua destilada.
- Estándar: ácido gálico marca Aldrich.
- Reactivo de Folin marca Aldrich.
- Solución de Na₂CO₃ al 20%.

Equipos.

- Balanza analítica marca Ohaus.
- Espectrofotómetro marca Perkin-Elmer instruments lambda 40 UV/VIS.
- Sonicador,

V.1.4 Determinación de flavonoides totales.

Material de laboratorio.

- Tubos de ensayo, gradilla, micropipetas, papel aluminio, cronómetro.

Reactivos.

- Disolventes grado reactivo: metanol, agua destilada.
- Soluciones: NaNO_2 al 5%, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10%, NaOH 1M.
- Estándar: catequina marca Aldrich.

Equipos.

- Balanza analítica.
- Espectrofotómetro marca Perkin-Elmer instruments Lambda 40 UV/VIS.
- Sonicador.

V.1.5 Determinación de la actividad antioxidante.

Material de laboratorio.

- Micropipetas (100, 200 y 1000 μL), Pipetas multicanal (20, 100 y 200 μL), pipetas graduadas (1mL.), Microplatos de 96 pocillos, Vortex, vasos de precipitado, papel aluminio, membrana GHP acrodisco de 13 mm poro 0.2 μm marca pall.

Reactivos.

- Disolventes grado reactivo: metanol, agua destilada.
- Disolventes grado HPLC: agua.
- β -caroteno, CHCl_3 , ácido linoléico, tween 20.
- Soluciones: ADIBA 0.3 M, BHT 1000 μm .
- Gas nitrógeno.

Equipos.

- Balanza analítica Ohaus.
- Sonicador.
- Agitador magnético.
- Lector Elisa MRX plate reader: Spectramax Plus 384 con filtro a 450nm.

V.1.6 Determinación de la actividad antimicrobiana.

Material de laboratorio.

- Tubos de ensayo con tapón de rosca, gradilla, vasos precipitado, matraces Erlenmeyer, plato caliente, algodón, cajas petri, orador No. 2, asas, mechero bunsen, .micropipetas, cronómetro, etc.

Material Biológico.

Staphylococcus aureus 8943.

Staphylococcus aureus 8855.

Staphylococcus aureus 9993.

Staphylococcus aureus 25923.

Listeria monocitogenes scott A.

Listeria monocitogenes 67.

Listeria innocua.

Vibrio cholerae.

Vibrio parahemolíticus.

Salmonella sp.

Micrococcus luteus NCIB8861.

Reactivos.

- Agar bacteriológico.
- Caldo tripticasa soya.
- Extracto de levadura.
- Peptona.

Equipos.

- Balanza analítica Oahus.
- Autoclave marca presto.
- Campana de flujo laminar.
- Incubadora a 37°C.

V.2 MÉTODOS.

V.2.1 Identificación y recolecta del material vegetal.

La identificación de un vegetal es indispensable en todo trabajo químico, para esto se le examina ordenadamente según sus características morfológicas más sobresalientes (Mata y col., 2000).

Esta práctica se realizó en las comunidades donde se identificaron las plantas. Se depositaron muestras de referencia de la especie en el Herbario de Querétaro "Dr. Jerzy Rzedowski" (QMEX). Para esta etapa se contó con el apoyo de la M. en C. Valentina Serrano y la bióloga Patricia Balderas.

V.2.2. Manejo del material vegetal.

- Limpieza del material vegetal.

Se recomienda que los ejemplares estén completos, no destruidos por insectos, y que se encuentren frescos, es decir hay que eliminar todas aquellas hojas secas y amarillas, para garantizar que los compuestos que busquemos no se encuentren degradados. Eliminar todas las partes de la planta que no nos interesen, en todas las especies vegetales se utilizaron las hojas y tallos exceptuando en el caso de *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh que se utilizo solo las hojas y en *Yuca filifera* Chabaud se utilizaron las flores, así como la tierra y polvo para eliminar contaminación de nuestras muestras.

- Secado del material vegetal.

Las plantas fueron secadas en una estufa a una temperatura de 39 °C.

- Preparación de los extractos.

Ya que la plantas estén completamente secas posteriormente se pulverizaron mediante mortero. Diez gramos de material se maceraron inicialmente con hexano-acetona 1:1 y posteriormente con metanol. Todos los extractos se concentraron al vacío a sequedad y fueron guardados bajo atmósfera de argón a 4 °C y protegidos de la luz.

V.2.3 Determinación de fenoles totales.

- Preparación de reactivos.

Estándar de ácido gálico.

Se pesa 25 mg de ácido gálico y se afora en 25 mL. con agua destilada.

Solución de NaCO_3 al 20%.

Se pesa 10 g de NaCO_3 y se afora a 50 ml. con agua destilada grado HPLC, se requiere sonicar hasta disolución completa.

- Preparación de muestras.

Se pesan aproximadamente 25 mg. de los extractos y se disuelve con 1 mL. de Metanol grado reactivo, se sonicar para disolución completa.

- Método.

El contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Dewanto y col., 2002). Las disoluciones apropiadas de extractos fueron oxidadas con el reactivo de Folin-Ciocalteu y la reacción fue neutralizada con Na_2CO_3 . La absorbancia producida por la coloración azul se midió a 760 nm después de dos horas usando ác. gálico como estándar. Los resultados se reportan en mg de ácido gálico/100 g de extracto metanólico.

V.2.4 Determinación de flavonoides totales.

- Preparación de reactivos.

Solución de NaNO_2 al 5% .

Se pesa 5 g de NaNO_2 para 100 mL de agua destilada.

Solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10%.

1Se pesa 10 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para 100 mL de agua destilada.

Solución de NaOH 1M.

Se necesita pesar 8 g de NaOH para 200 mL. de agua destilada.

- Preparación de muestras.

Se realizaron pruebas de solubilidad para las muestras y el estándar.

Se pesó 0.025g del estándar se disolvió en 2mL. de MeOH grado reactivo y sonicar hasta disolución total, tomando de esta solución 1mL y disolviéndolo en 1mL de agua. Se realizaron diluciones seriadas a partir de esta solución tomando 1mL. y disolviendo en 1mL de agua. Hasta llegar a la concentración más pequeña con una absorbancia considerable.

- Método.

El contenido de flavonoides totales, se determinó mediante el ensayo descrito por Liu y colaboradores en el 2002. Las diluciones de los extractos se hicieron reaccionar con nitrito de sodio y cloruro de aluminio posteriormente la reacción se neutralizó con hidróxido de sodio. La reacción produjo una coloración en la gama de los rojos; la absorbancia fue medida a 510 nm inmediatamente después de adicionar el último reactivo. Los resultados se reportan en mg de catequina / 100g de extracto metanólico (Liu y col., 2000).

V.2.5 Determinación de la actividad antimicrobiana.

- Preparación de medios de cultivo.

Agar tripticasa soya-extracto de levadura (AST-EL) al 1% y 0.8 %.

Se pesa cada uno de los ingredientes necesarios en la cantidad adecuada que se indica en la etiqueta de envase. Se adiciona el extracto de levadura en el porcentaje indicado.

Los medios diluyente de peptona BHI al 1% y BHI al 0.8% se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para el medio BHI se utilizó caldo y se adicionó agar agar en el porcentaje indicado.

- Preparación de muestras.

Se pesó 100 mg de extracto y se disolvió en 500µl de agua destilada y se agitó vigorosamente en vortex para alcanzar una disolución completa.

- Método.

La actividad de los extractos de las plantas fue evaluada en medio sólido mediante el ensayo de difusión en agar (Parish y Davidson, 1993). Se colocó agar infusión cerebro corazón (BHI, 1.0%) se adicionó una sobre capa de 8 ml. de agar suave (0.8 %) de BHI, inoculada con 100µl del cultivo sensible asegurando una población (10^5 - 10^6 ufc/ml) se colocó en refrigeración por una hora. Se cortaron fosas de 4 mm

de diámetro usando un cortador de acero inoxidable, se vertieron 20µl de extracto acuoso, en cada fosa y se incubó a 37°C. La actividad antimicrobiana se registró y se midió la zona clara de inhibición.

V.2.6 Determinación de la actividad antioxidante.

- Preparación de reactivos.

Solución de β-caroteno

Se pesa 20 mg de β-caroteno, se disuelve en 10 mL de CHCl₃, al abrigo de la luz, se agita hasta disolución completa.

Se toma 1 mL de esta solución y se agrega 0.2 mL de ácido linoléico y 2 mL de tween 20. Se agita en vortex, en seguida se remueve el CHCl₃ por medio de una corriente de N₂ durante 1.5 Hrs; mientras poner agua destilada (grado HPLC) a agitar vigorosamente. Al cabo del tiempo de evaporación del CHCl₃, se le agrega a la mezcla 20 mL de agua recién agitada. Se mezcla en vortex, hasta obtener una solución muy clara.

ADIBA 0.3M

Se pesa 0.4068g y se disuelve en 5 mL de agua destilada (grado HPLC)

BHT 1000µM

Se pesa 0.0197g y se disuelve en 50 mL de agua destilada (grado HPLC)

- Preparación de las muestras.

Se realizaron pruebas de solubilidad para saber en que solvente es más soluble la muestra. Teniendo en cuenta que solo se pueden utilizar los siguientes solventes: metanol, agua, DMSO debido al material de las celdas.

Se pesó 100mg de la muestra y se disolvieron en 2 mL. de metanol. (concentración 1), se toma 1 mL. de esta solución y se le adiciona 1 mL de metanol. (concentración 2) y así sucesivamente hasta obtener 5 concentraciones diferentes.

- Método.

La actividad antioxidante fue determinada de acuerdo al método de decoloración del β -caroteno (Cardador y col., 2002). Alícuotas (20 μ L) de cada extracto o solución de BHT (1000 μ M) y 200 μ L de solución de β -caroteno se adicionó a 96 pozos del microplato. La muestra fue mezclada y diluida transfiriendo 30 μ L a otro microplato que contenga agua destilada recientemente oxigenada (210 μ L). Las diluciones se hicieron por triplicado subsecuentemente. Debido a que la reacción de decoloración del β -caroteno esta sujeta a variaciones notables. El ADIBA (20 μ L, 0.3M) se adiciono a cada pozo para iniciar la reacción . La absorbancia fue leída en un MRX lector de platos usando un filtro a 450nm en el tiempo 0 y en intervalos de cada 10 minutos durante 1hr $\frac{1}{2}$. Los platos se conservaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Cuadro 4. Esquema del microplato utilizado en el método del β -caroteno
(Cardador y col., 2002).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O											
B	Solv	solv	Solv	Solv	solv	solv	Solv	Solv	solv	solv	solv	solv
C	M1C1	M1C1	M1C1	M2C1	M2C1	M2C1	M3C1	M3C1	M3C1	BHT	BHT	BHT
D	M1C2	M1C2	M1C2	M2C2	M2C2	M2C2	M3C2	M3C2	M3C2	BHT	BHT	BHT
E	M1C3	M1C3	M1C3	M2C3	M2C3	M2C3	M3C3	M3C3	M3C3			
F	M1C4	M1C4	M1C4	M2C4	M2C4	M2C4	M3C4	M3C4	M3C4			
G	M1C5	M1C5	M1C5	M2C5	M2C5	M2C5	M3C5	M3C5	M3C5			
H												

M1C1 (muestra1 concentración1).

Solv (solvente).

VI. RESULTADOS.

VI.1 Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólicos.

El porcentaje de rendimiento se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ rendimiento} = (\text{peso inicial de la especie (g)} / \text{peso del extracto seco (g)}) \times 100$$

Cuadro 5. Porcentaje de rendimiento de las especies objeto de estudio.

Muestra	% rendimiento
<i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K.	12.19
<i>Malva parviflora</i> L.	13.28
<i>Brassica rapa</i> L.	13.05
<i>Chenopodium murale</i> L.	13.84
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	10.92
<i>Rumex crispus</i> L.	8.28
<i>Portulaca oleracea</i> L.	9.96
<i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc. Vaugh	10.02
<i>Yucca filifera</i> Chabaud.	-

En la especie *Yucca filifera* Chabaud el porcentaje de rendimiento no fue determinado.

VI.2 Determinación de fenoles totales.

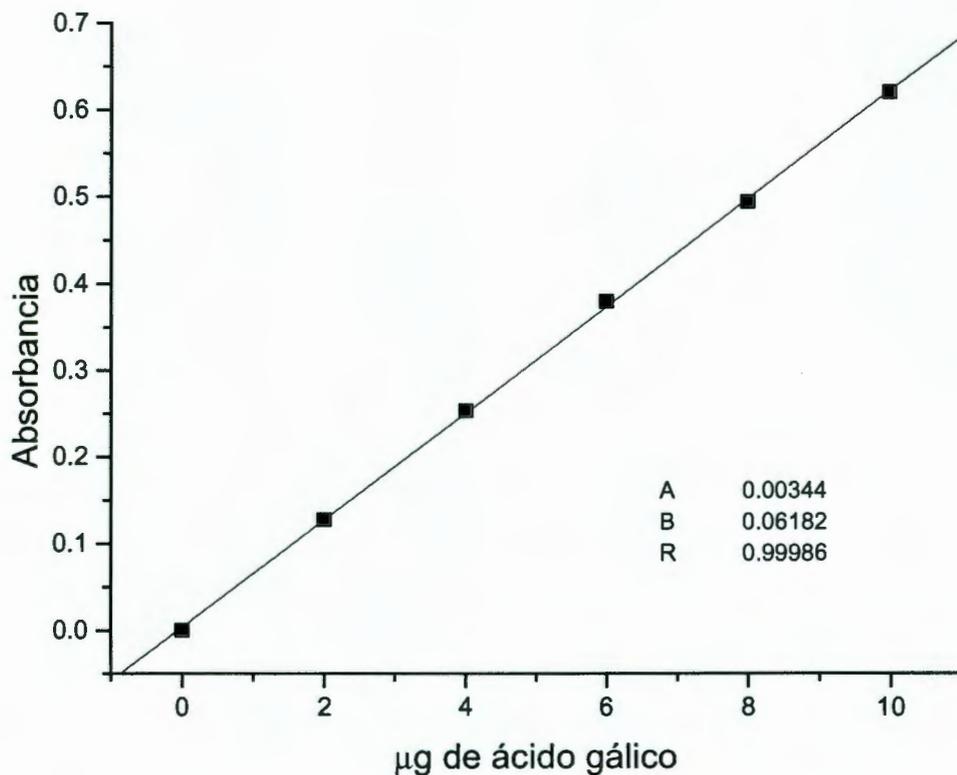


Figura 12. Curva de calibración para fenoles totales.

Donde A = la ordenada al origen, B = pendiente y R = linealidad.

Cuadro 6. Valores para la curva de calibración de fenoles totales.

Concentración μg de ác. gálico	Absorbancia
0	0
2	0.1272
4	0.2537
6	0.3803
8	0.4940
10	0.6201

VI.3 Determinación de flavonoides totales.

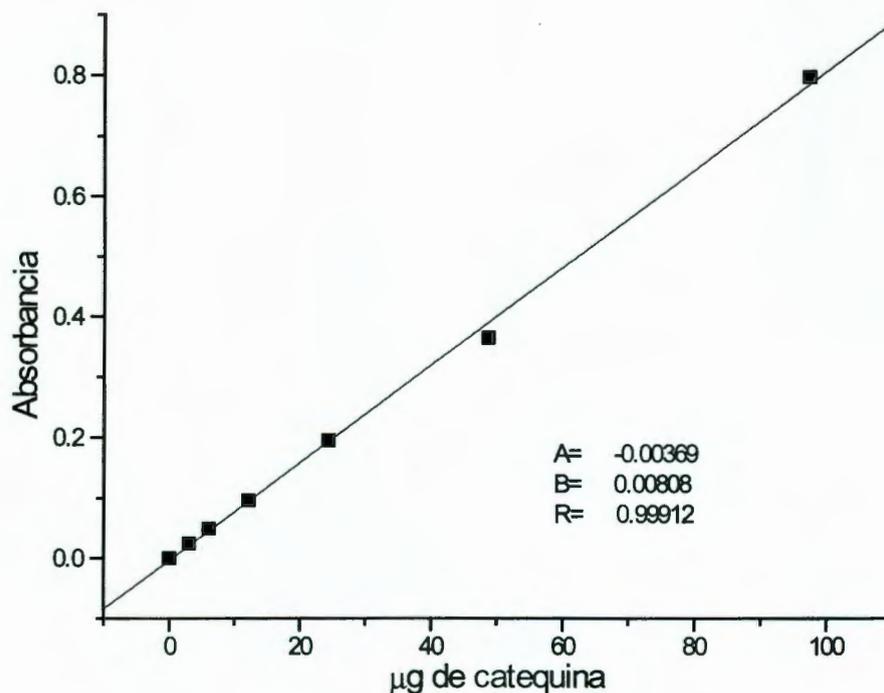


Figura 13. Curva de calibración para flavonoides totales.

Donde A= ordenada al origen , B = pendiente y R = linealidad.

Tabla 7. Valores para la curva de calibración para flavonoides totales.

Concentración µg de catequina	Absorbancia
0	0
3.05	0.0245
6.11	0.0494
12.21	0.0961
24.41	0.1952
48.83	0.3649
97.66	0.7972

Cuadro 8. Resultados de la determinación de fenoles totales.

MUESTRA	mg ác. Gálico / 100g de extracto (promedio)± DE
<i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K.	5850.245 ± 758.36
<i>Malva parviflora</i> L.	1717.57 ± 117.76
<i>Brassica rapa</i> L.	2246.87 ± 389.86
<i>Chenopodium murale</i> L.	3284.72 ± 96.46
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	1321.56 ± 38.35
<i>Rumex crispus</i> L.	2464.82 ± 94
<i>Portulaca oleracea</i> L.	5980.18 ± 1189
<i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc. Vaugh.	3470.76 ± 236.7
<i>Yucca filifera</i> Chabaud.	1705.56 ± 149.83

Cuadro 9. Resultados de la determinación de flavonoides totales.

MUESTRA	mg catequina / 100g de extracto (promedio) ± DE
<i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K	4121.50 ± 483.95
<i>Malva parviflora</i> L.	1662.46 ± 74.25
<i>Brassica rapa</i> L.	1322.92 ± 119.39
<i>Chenopodium murale</i> L.	2351.00 ± 375.19
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	1120.20 ± 97.2
<i>Rumex crispus</i> L.	1926.04 ± 142.25
<i>Portulaca oleracea</i> L.	3624.54 ± 211.47
<i>Cnidouscolus chayamansa</i> Mc. Vaugh.	1498.08 ± 127.78
<i>Yucca filifera</i> Chabaud.	318.95 ± 101.33

VI.4 Determinación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se calculó por cuatro métodos diferentes. Para el primer método se graficó el log de la absorbancia contra el tiempo y la pendiente se expresó como la actividad antioxidante (AOX). Para el segundo método el cálculo se basó en la cinética de primer orden, se emplearon las siguientes ecuaciones.

$$R = \ln (a/b) \times 1/5$$

Donde R = rapidez de degradación de la muestra o estándar.

In = logaritmo natural.

a = absorbancia de la muestra a 450nm a tiempo 0.

b = absorbancia de la muestra a tiempo 10, 20, etc.

5 = tiempo (min.).

La actividad antioxidante (AA) se calculo como % de inhibición relativo al control, usando la ecuación siguiente (Al-Saikan y col. 1995).

$$AA = (R_{\text{control}} - R_{\text{muestra}}) \times 100 / R_{\text{control}} \quad (1)$$

Donde AA = % de inhibición relativo al control.

R_{muestra} = grado de decoloración del β -caroteno con extracto

R_{control} = grado de decoloración del β -caroteno sin extracto.

Los valores de AA para diferentes tiempos se promediaron para obtener un solo valor de AA para la muestra.

El tercer método, relación antioxidante (ORR) se basó en la ecuación de Velioglu y col. (1998):

$$\text{ORR} = R_{\text{muestra}} / R_{\text{control}} \quad (2)$$

Donde ORR = relación antioxidante, R_{control} y R_{muestra} significan lo mismo que en la ecuación (1).

Para el cuarto método de cálculo, el coeficiente de actividad antioxidante (AAC, por sus siglas en inglés) se calculó como sigue (Velioglu y col, 1998).

$$\text{AAC} = (A_{\text{muestra } 90} - A_{\text{control } 90}) \times 1000 / (A_{\text{control } 0} - A_{\text{control } 90}) \quad (3)$$

Donde AAC = coeficiente de actividad antioxidante.

$A_{\text{muestra } 90}$ es la absorbancia de la muestra a 90 minutos

$A_{\text{control } 0}$ y $A_{\text{control } 90}$ son las absorbancias a 0 y 90 minutos respectivamente.

Cuadro 10. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Malva parviflora* L.,
Amaranthus hybridus L. y *Chenopodium murale* L.

	AOX	AA	ORR	AAC
CONTROL				
MeOH	0.896	0	1	0
BHT	0.71431	63.4808	0.4457	624.66
<i>Malva parviflora</i> L.				
50.5 mg/ml	0.08332	90.5241	.0909	790.2941
25.25 mg/ml	0.15910	80.0784	0.2058	639.1201
12.62 mg/ml	0.56347	41.3761	00.5579	163.6729
6.31mg/ml	0.73248	19.4773	0.7872	65.2178
3.15 mg/ml	0.87064	4.7511	0.9234	2.0948
<i>Amaranthus hybridus</i> L.				
50.5 mg/ml	0.3301	61.2740	0.39088	421.6112
25.25 mg/ml	0.65378	39.0509	0.6218	221.3494
12.62mg/ml	0.6744	27.3462	0.7167	95.3827
6.31mg/ml	0.78592	12.8886	0.8721	48.5991
3.15 mg/ml	0.88967	0.6828	0.9948	4.5387
<i>Chenopodium murale</i> L.				
50.5 mg/ml	0.18744	70.8837	0.3395	658.2526
25.25 mg/ml	0.3405	51.7928	0.5289	429.2223
12.625 g/ml	0.49989	32.8010	0.7299	236.5017
6.31mg/ml	0.71065	12.9413	0.9117	98.2456
3.15 mg/ml	0.84322	1.9179	0.9928	27.0926

Cuadro 11. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Brassica rapa* L. y *Cnidoscopus chayamansa* Mc. Vaugh.

	AOX	AA	ORR	AAC
CONTROL				
MeOH	0.65106	0	1	0
BHT	0.12552	64.0947	0.359052	715.5215
<i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K.				
50.5 mg/ml	0.08497	97.5654	0.024345	948.9269
25.25 mg/ml	0.11264	84.2069	0.157960	813.1872
12.625 mg/ml	0.21216	69.1192	0.308808	553.9926
6.31mg/ml	0.33209	50.4695	0.495305	313.8318
3.15 mg/ml	0.46085	31.7187	0.682813	187.7986
<i>Brassica rapa</i> L.				
50.5 mg/ml	0.16778	65.8764	0.341236	780.2760
25.25 mg/ml	0.28927	50.4284	0.495616	494.8434
12.62 mg/ml	0.35416	55.0794	0.442059	361.8336
6.31mg/ml	0.43896	29.9772	0.700228	194.9268
3.15 mg/ml	0.15130	31.1375	0.688625	215.7049
<i>Cnidoscopus chayamansa</i> Mc. Vaugh.				
50.5 mg/ml	0.08906	75.9259	0.240741	934.7463
25.25 mg/ml	0.22669	56.8937	0.431063	624.7441
12.625mg/ml	0.38425	38.4401	0.615599	288.5796
6.31mg/ml	0.49889	10.9590	0.890410	117.6537
3.15 mg/ml	0.59904	7.14289	0.928571	29.61249

Cuadro 12. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Rumex crispus* L., *Portulaca oleracea* L. y *Yucca filifera* Chabaud.

Concentración	AOX	AA	ORR	AAC
CONTROL				
MeOH	1.2054	0	1	0
BHT	0.26824	64.7765	0.440474	617.3611
<i>Rumex crispus</i> L.				
50.5 mg/ml	0.09789	85.4782	0.145218	849.4045
25.25 mg/ml	0.19710	75.8832	0.241168	659.6412
12.62 mg/ml	0.41113	62.8619	0.371380	361.1473
6.31mg/ml	0.68248	39.4075	0.605925	163.0807
3.15 mg/ml	1.00576	20.0770	0.799230	41.38004
<i>Portulaca oleracea</i> L.				
50.5 mg/ml	0.22465	70.2851	0.297148	686.1268
25.25 mg/ml	0.44903	53.4549	0.465451	355.4502
12.62 mg/ml	0.68538	37.3518	0.626481	189.3845
6.31mg/ml	0.85887	19.9098	0.800902	95.62410
3.15 mg/ml	1.07100	9.89736	0.901026	26.16745
<i>Yucca filifera</i> Chabaud.				
50.5 mg/ml	0.66486	34.9836	0.650163	195.3241
25.25 mg/ml	0.84764	27.4027	0.725973	118.8975
12.625 mg/ml	0.99414	12.1484	0.878515	74.83560
6.31mg/ml	1.19434	-4.3413	1.043413	2.833419
3.15 mg/ml	1.26584	-11.5331	1.115312	-14.98530

Malva parviflora L.

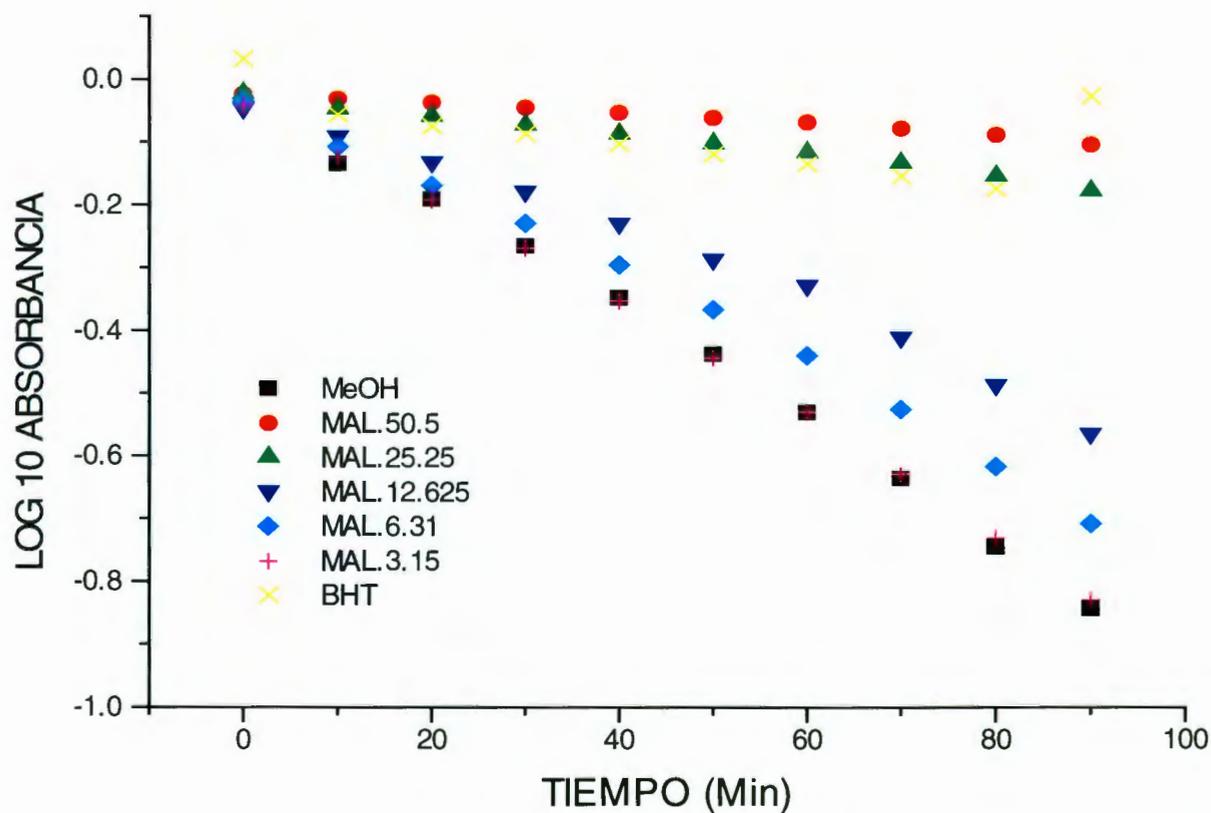


Figura 14. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Malva parviflora* L. (MAL) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Amaranthus hybridus L.

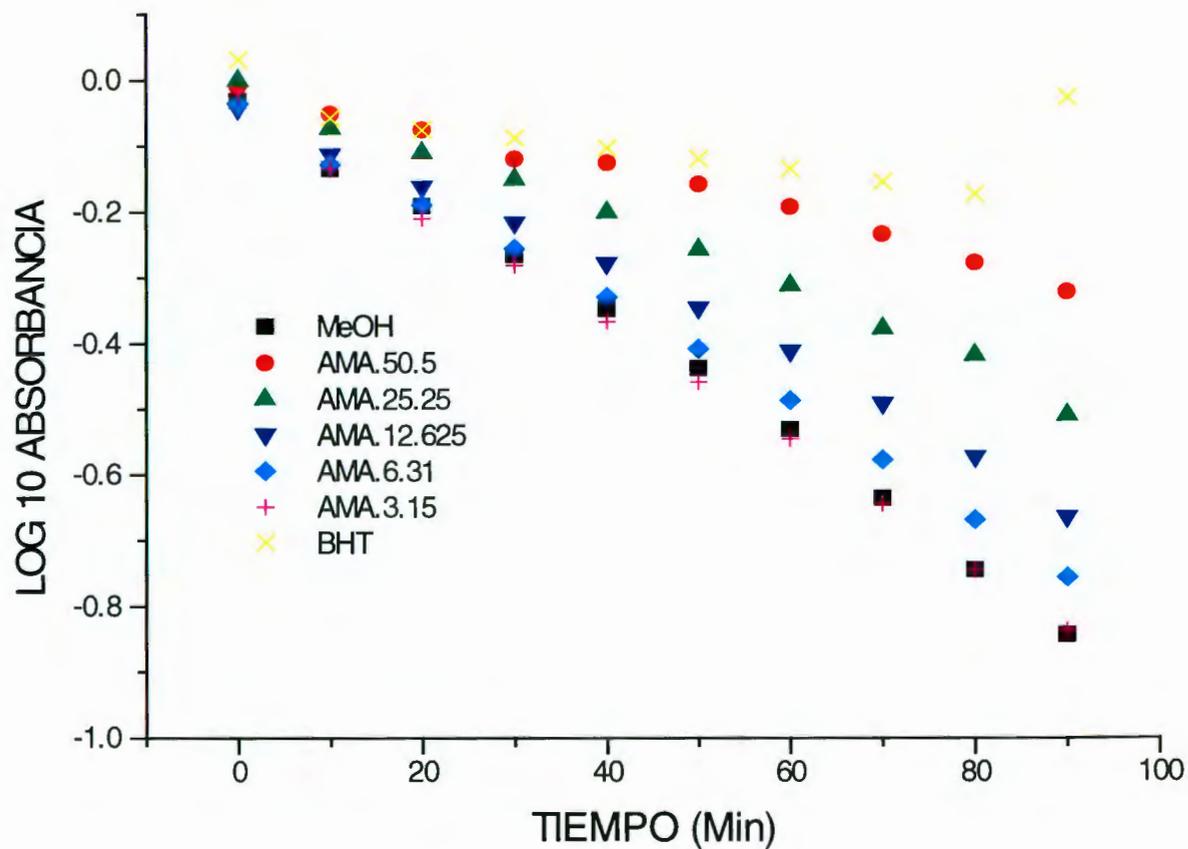


Figura 15. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Amaranthus hybridus* L. (AMA) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Chenopodium murale L.

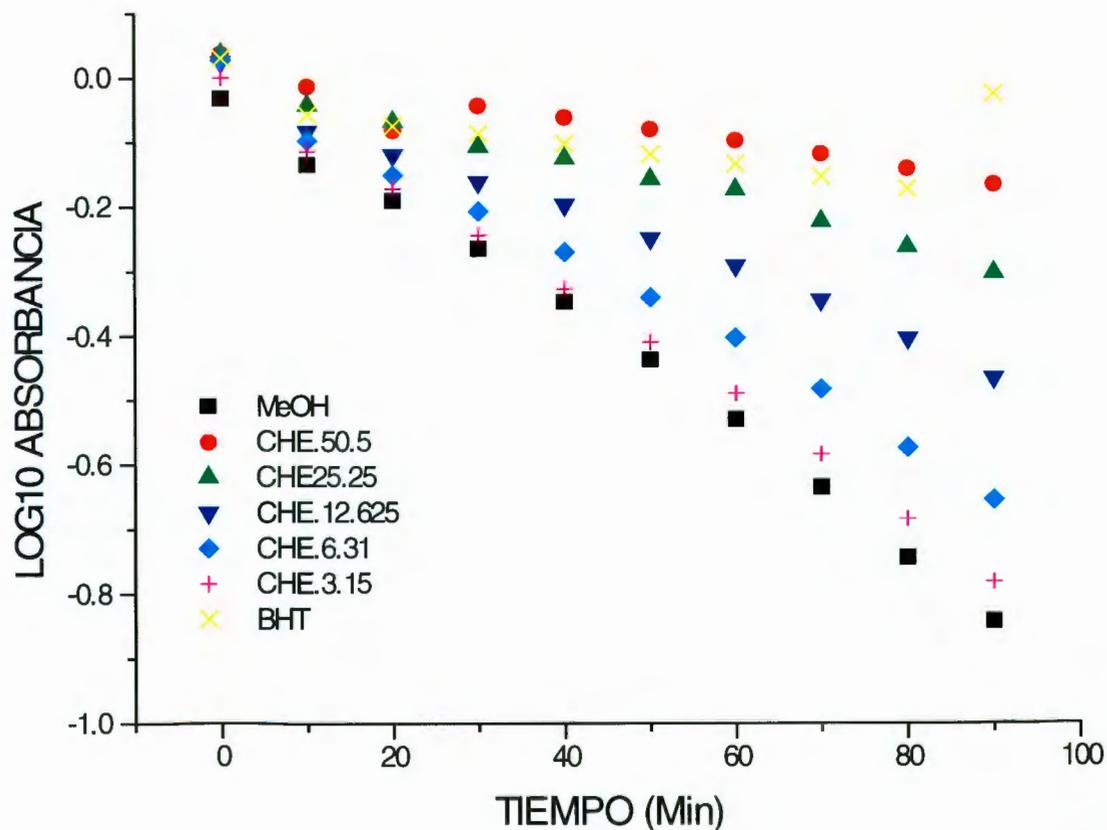


Figura 16. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Chenopodium murale* L. (CHE) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Melampodium perfoliatum H.B.&k.

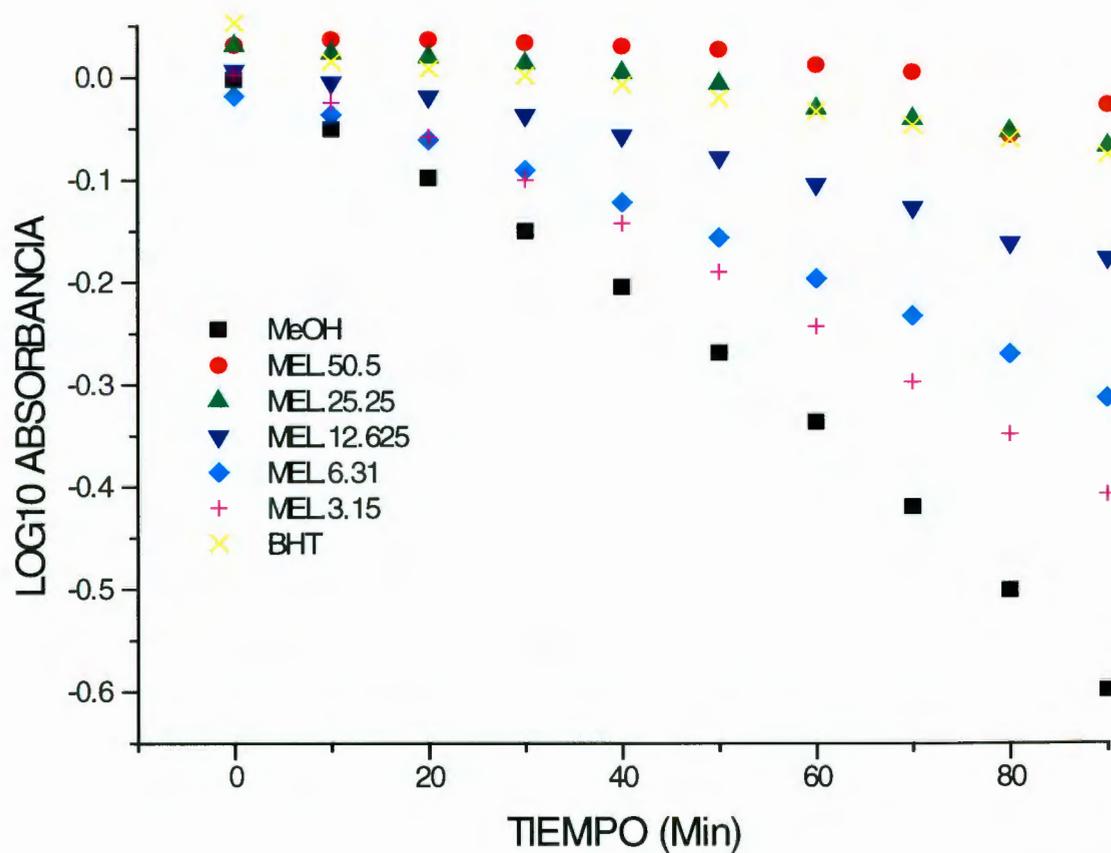


Figura 17. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Melampodium perfoliatum* H.B.&K. (MEL) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Brassica rapa L.

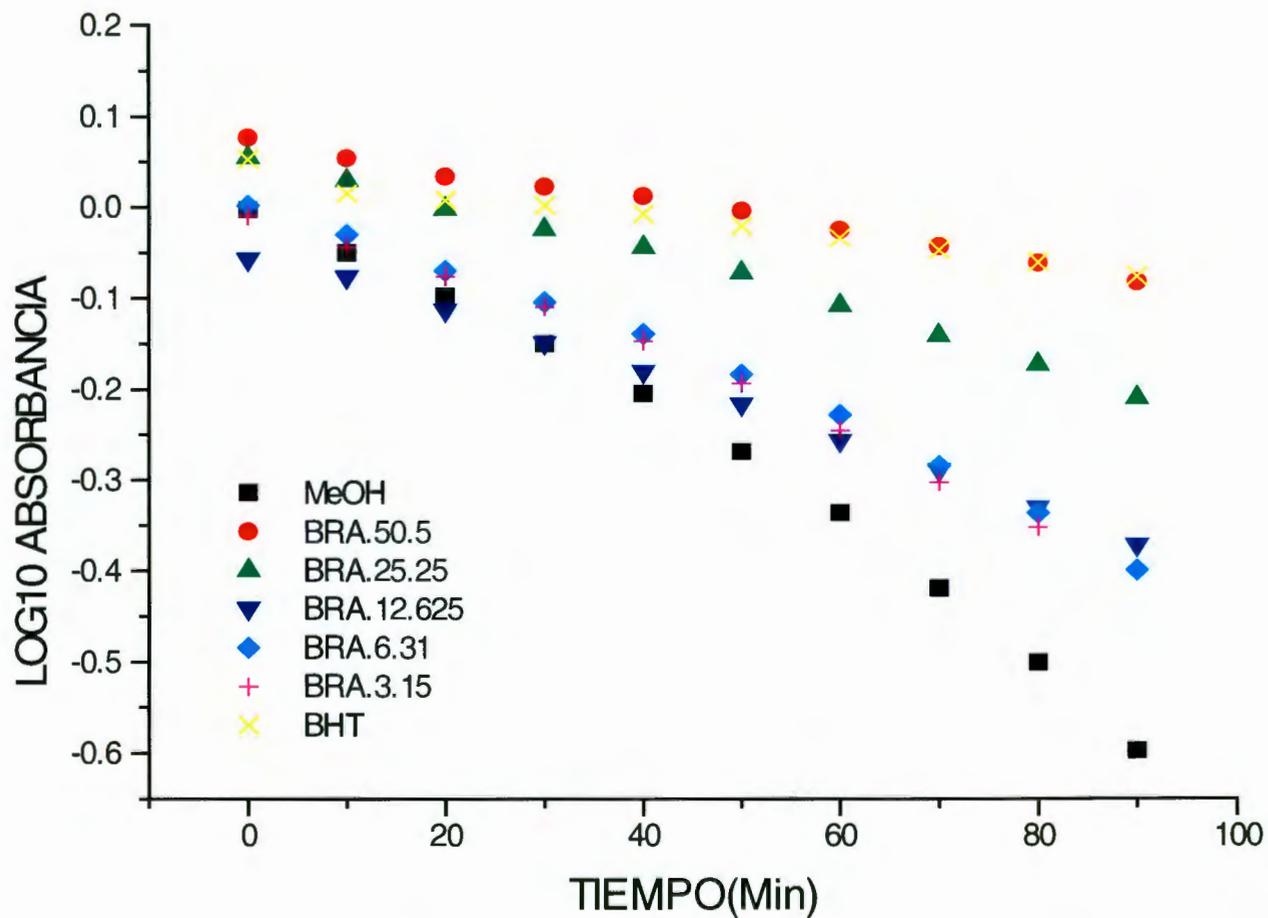


Figura 18. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Brassica rapa* L. (BRA) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Cnidoscolus chayamansa Mc. Vaugh.

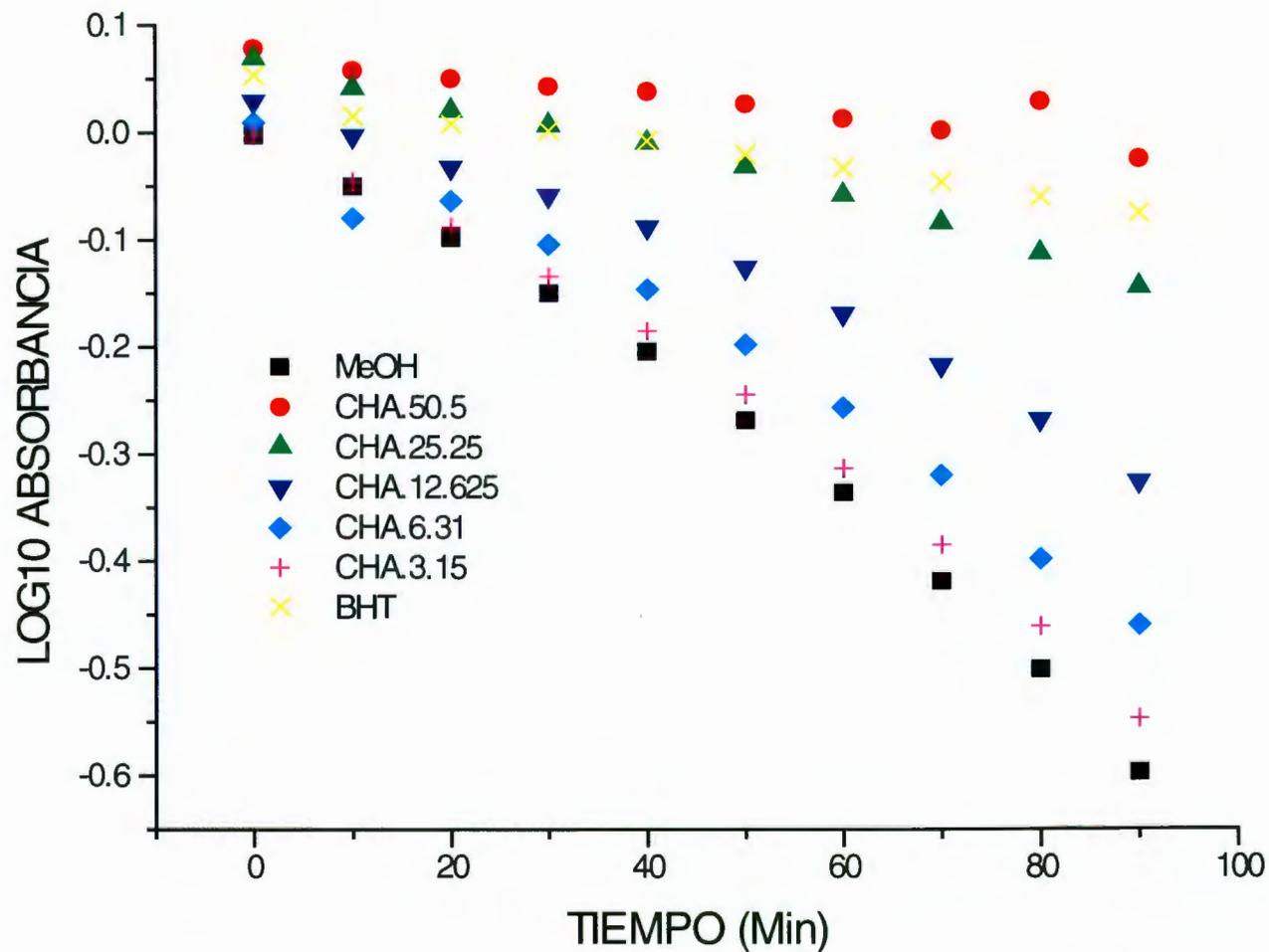


Figura 19. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh (CHA) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Rumex crispus L.

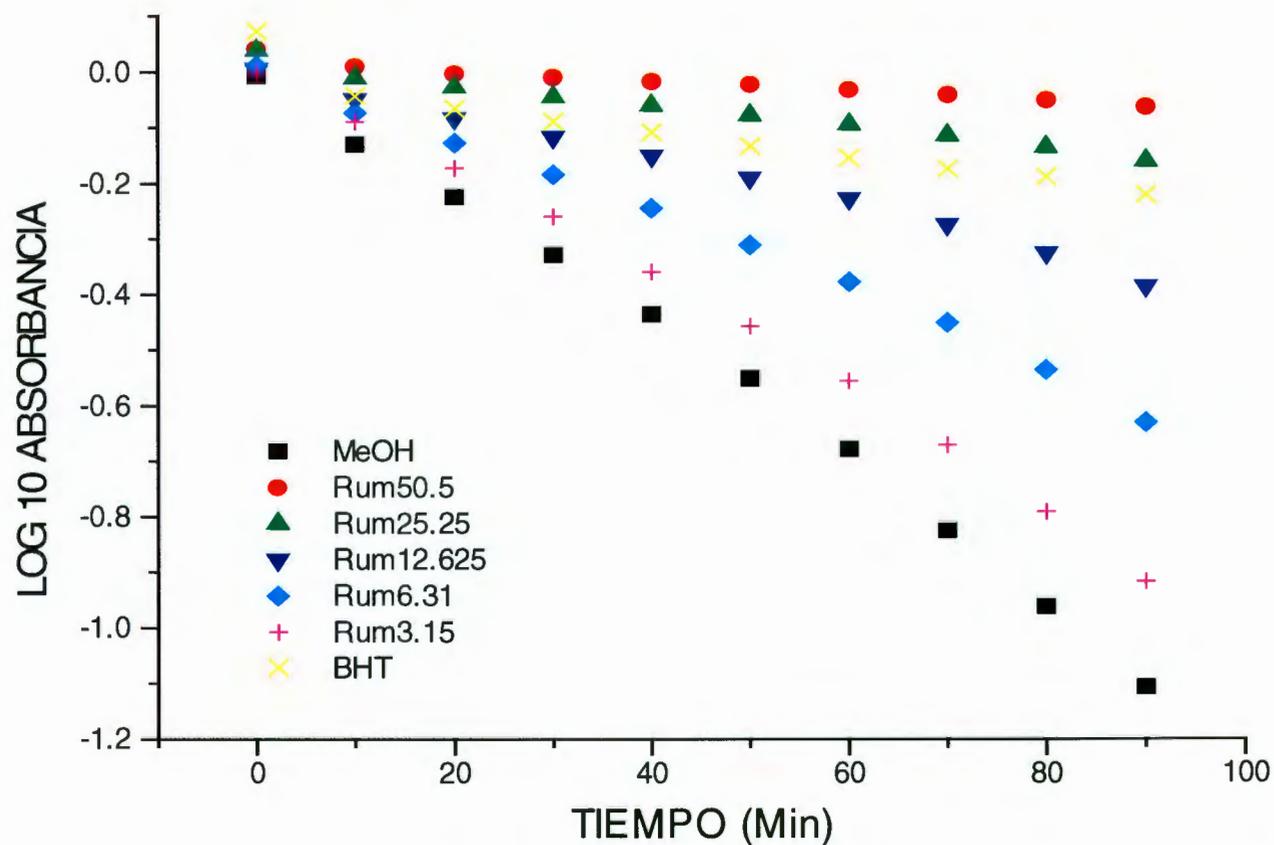


Figura 20. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Rumex crispus* L. (Rum) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Portulaca oleracea L.

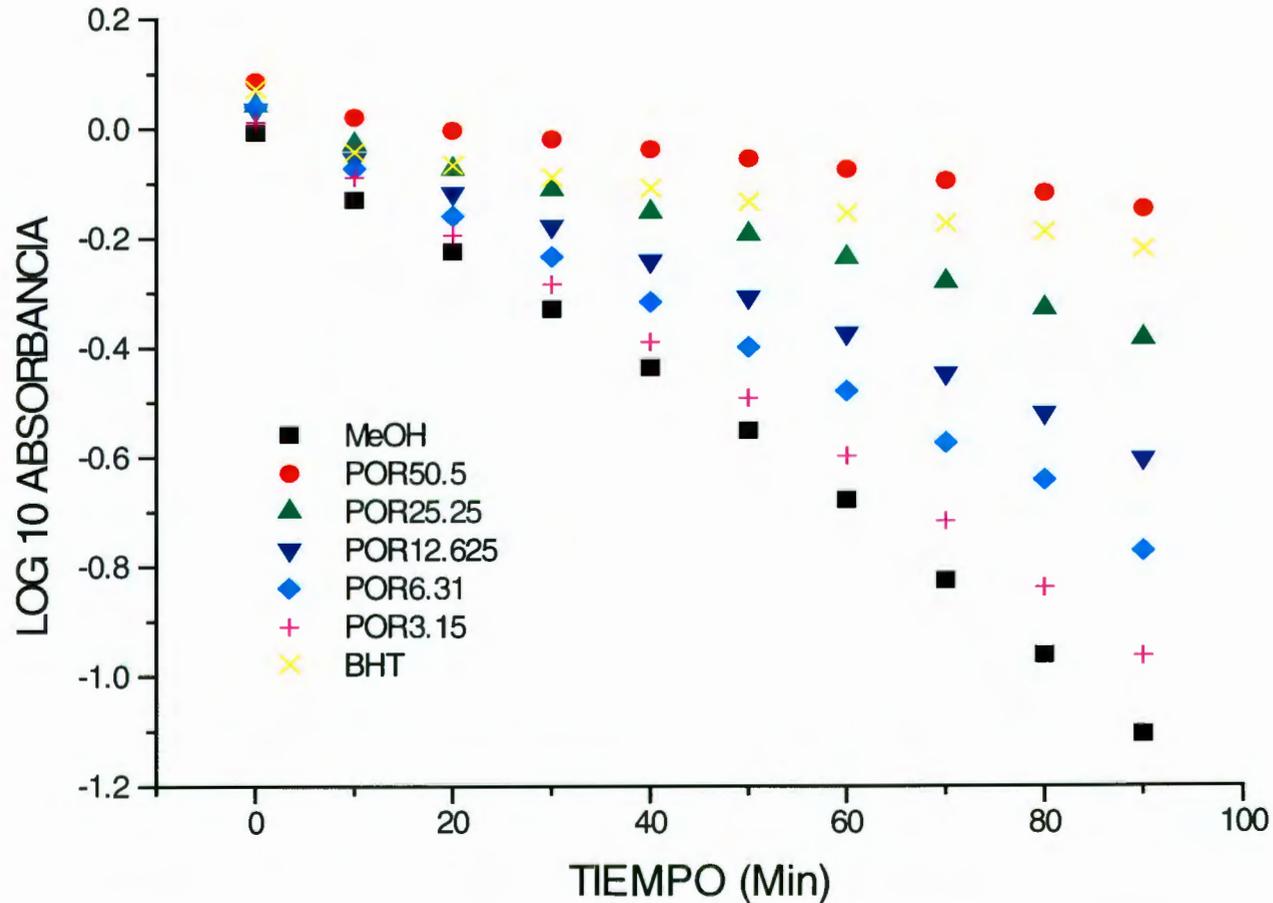


Figura 21. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *Portulaca oleracea* L. (POR) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

Yucca filifera Chabaud.

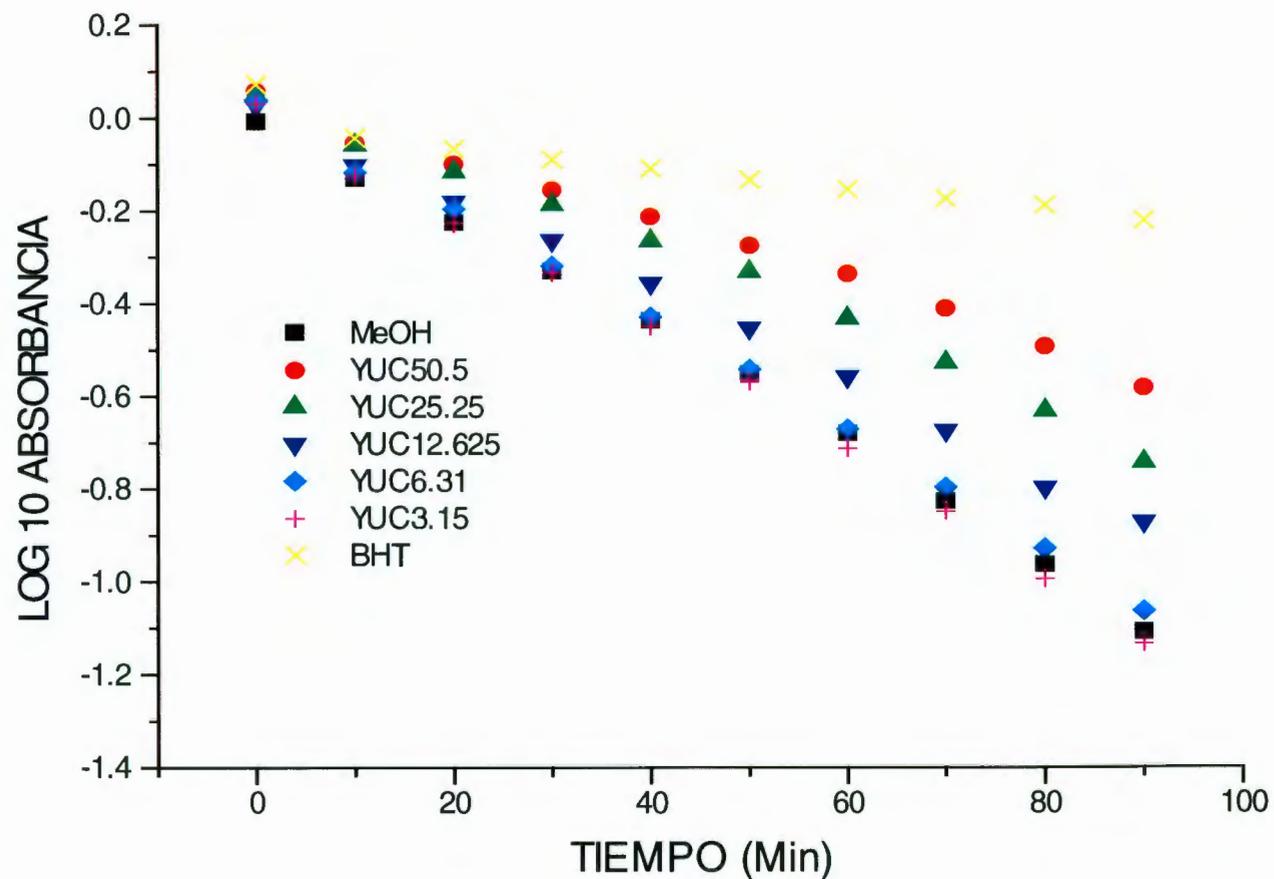


Figura 22. Actividad antioxidante del extracto metanólico *Yucca filifera* Chabaud. (YUC) a diferentes concentraciones (mg/mL) por el ensayo de decoloración del β -caroteno (BHT 1000 μ M como referencia).

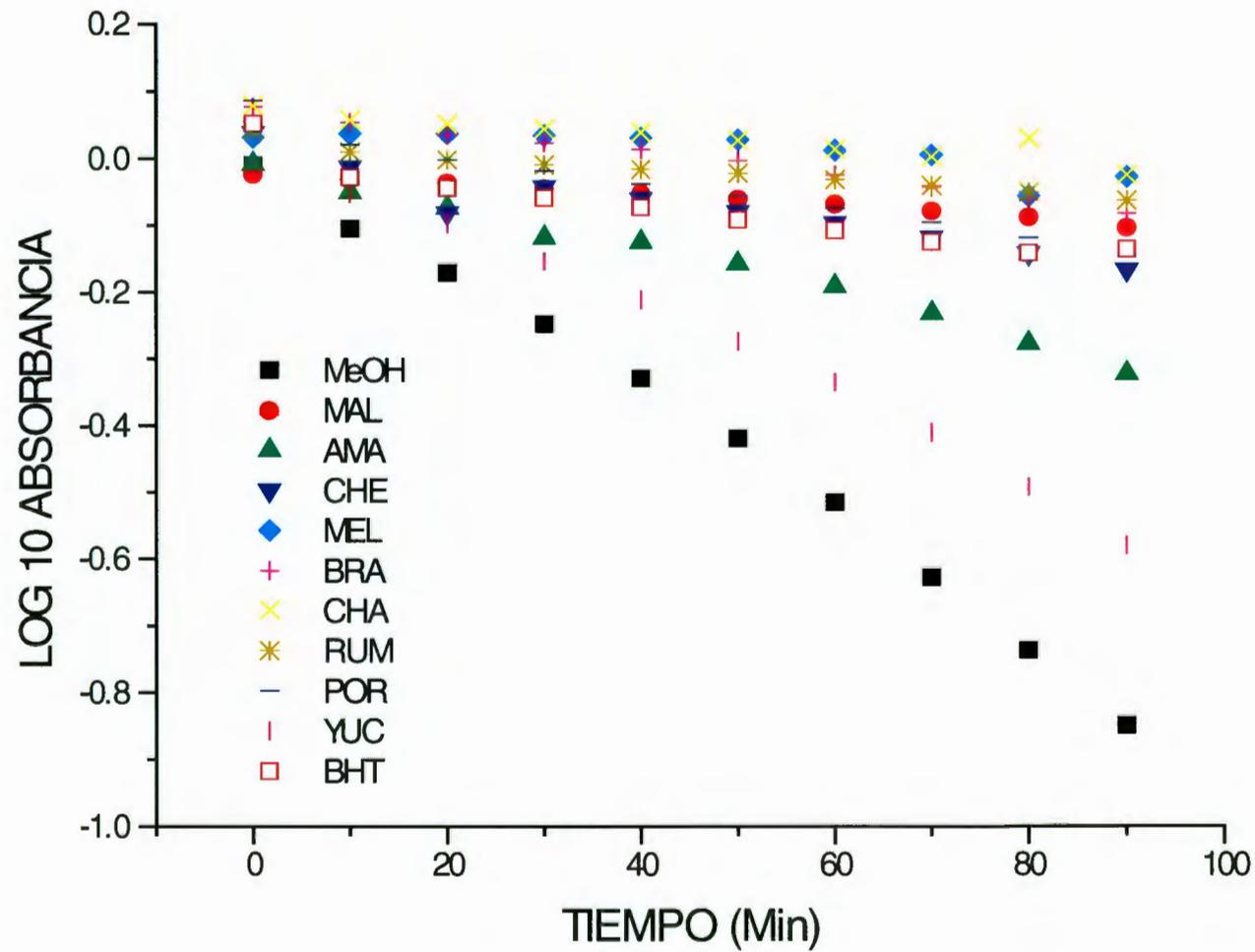


Figura 23. Grafica comparativa entre especies con la concentración mas alta (50.5 mg/mL).

VI. 6. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Cuadro13. Actividad antimicrobiana de las especies vegetales en estudio.

	<i>L. monocitogenes</i> scott A (cm)	<i>L. Monocitogenes</i> 67 (cm)	<i>L. innocua</i> (cm)	<i>S. aureus</i> 8855 (cm)	<i>S. aureus</i> 9993 (cm)	<i>S. aureus</i> 8943 (cm)	<i>S. aureus</i> 25923 (cm)	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahe-molíticus</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Micrococcus luteus</i> NCIB8861
<i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Malva parviflora</i> L.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Brassica rapa</i> L.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Chenopodium murale</i> L.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Rumex crispus</i> L.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Portulaca oleracea</i> L.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Cnidioscolus chayamansa</i> Mc. Vaugh.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Yucca filifera</i> Chabaud.	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

VII. DISCUSIONES.

VII.1 Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólicos.

El porcentaje de rendimiento más alto corresponde a *Chenopodium murale* L. y el de menor rendimiento es para *Rumex crispus* L., los rangos de porcentaje de rendimiento van desde el 13.84-8.3 % lo cual nos indica que el porcentaje es muy similar entre todas las especies.

VII.2 Determinación de fenoles totales.

De las muestras estudiadas las tres que presentan mayor contenido de fenoles son *Portulaca oleraceae* L., *Melampodium perfoliatum* H.B.&K. y *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh en orden descendente. Los rangos de contenidos van desde los 5980.18 ± 758 a 1321.56 ± 38 . mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de extracto.

VII.3 Determinación de flavonoides totales.

Con respecto al contenido de flavonoides las tres especies que presentan mayor contenido son; *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Portulaca oleracea* L. y *Chenopodium murale* L. Los rangos van de 4121.50 ± 483 a 318.95 ± 101 mg equivalentes de catequina por 100 g de extracto.

VII.4 Comparación entre las cantidades de fenoles totales y flavonoides totales presentes en la muestra.

Como se puede observar en todas las muestras el contenido de fenoles es mucho mayor que el de flavonoides, esto sugiere que los extractos poseen una mayor cantidad de metabolitos secundarios como fenoles simples.

VII.5 Determinación de la actividad antioxidante.

El método de decoloración fue utilizado para la evaluación de la actividad antioxidante en los extractos metanólicos de especies vegetales comestibles. Se obtuvieron diferentes concentraciones de muestras para observar como se comporta la concentración con respecto a la actividad antioxidante a la que tiene una actividad similar al estándar, el cual fue el BHT a una concentración 1000 μ M.

VII.5.1 Primer método.

Observamos para el primer método que la actividad puede ser similar al estándar o ligeramente mayor. Para *Malva parviflora* L., *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Rumex crispus* L. y *Portulaca oleracea* L. observamos que en la concentración de 50.5 mg/ml la actividad antioxidante (AAOX) es ligeramente mayor que la del estándar, y la concentración de 25.25 mg/ml es muy similar al BHT 1000 μ M quedando las demás concentraciones por debajo del valor del BHT.

Yucca filifera Chabaud y *Amaranthus hybridus* L. no presento una AAOX similar al BHT en las concentraciones utilizadas pues todos los resultados están por debajo de los valores del estándar.

La especie *Brassica rapa* L., *Chenopodium murale* L. al igual que *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh presentan una actividad similar al estándar en la concentración de 50.5 mg/ml.

VII.5.2 Segundo método

El segundo método mide el porcentaje de inhibición relativo al control, por lo tanto la especie que tenga un mayor porcentaje, muestra una mayor actividad antioxidante, el porcentaje para nuestro estándar utilizado (BHT 1000 μ M) es en promedio de 64.1173 ± 0.4341 % .

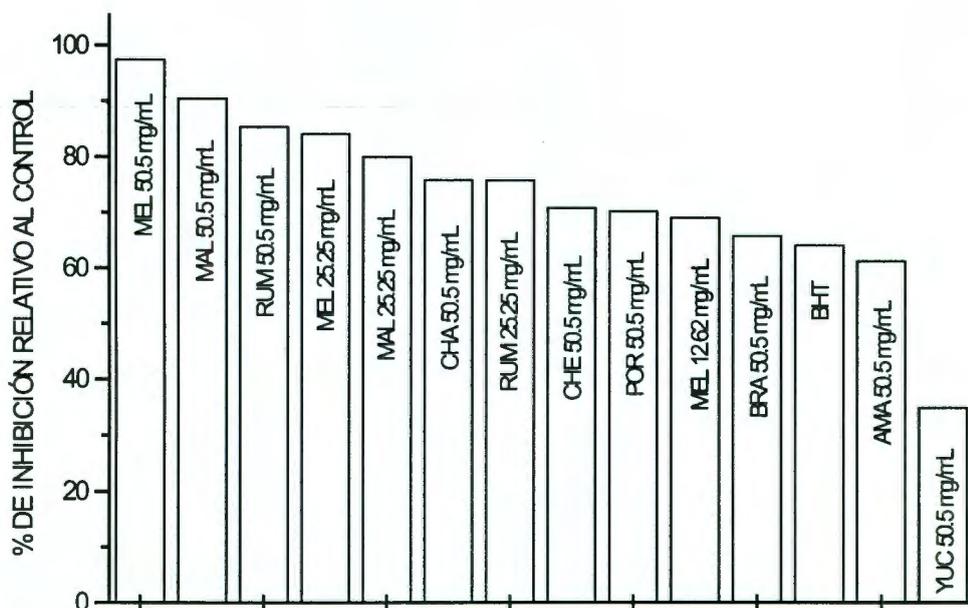


Figura 24. Comparación de la actividad antioxidante de las especies objeto de estudio por el segundo método AA (% de inhibición relativo al control).

Observamos que la especie *Melampodium perfoliatum* H.B.&K. tiene una actividad antioxidante mayor a la del estándar en una concentración de 12.625 mg/ml , por lo que podemos decir que este especie tiene una AAOX mucho mayor que las otras especies.

Las especies que muestran una AAOX considerable con este método son *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Malva parviflora* L. y *Rumex crispus* L., lo cual concuerda con los resultados del primer método y desplazando a la especie *Portulaca oleracea* L. en un orden menor pues en este segundo método se observa que la diferencia entre *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh y *Chenopodium murale* L. tiene una AAOX ligeramente mayor, lo cual no se aprecia claramente en el primer método.

VII.5.3 Tercer método.

El tercer método mide la relación antioxidante, con lo cual comparamos cada una de las especies con el estándar utilizado. Haciendo un promedio de ORR para todas las muestras ORR BHT = 0.4151 y ORR MeOH = 1.

Sabemos que mientras más se acerque el valor de ORR a la unidad su AAOX va disminuyendo, podemos observar en la figura 25, que las especies que muestran una AAOX considerable comparado con el estándar es *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Malva parviflora* L. y *Rumex crispus* L., lo cual sigue concordando con los métodos anteriores, sin embargo podemos notar ligeras discrepancias por ejemplo la especie *Amaranthus hybridus* L. se sitúa dentro de los rangos permisibles donde la AAOX es ligeramente mayor a la del estándar mientras que en los métodos anteriores se considera fuera.

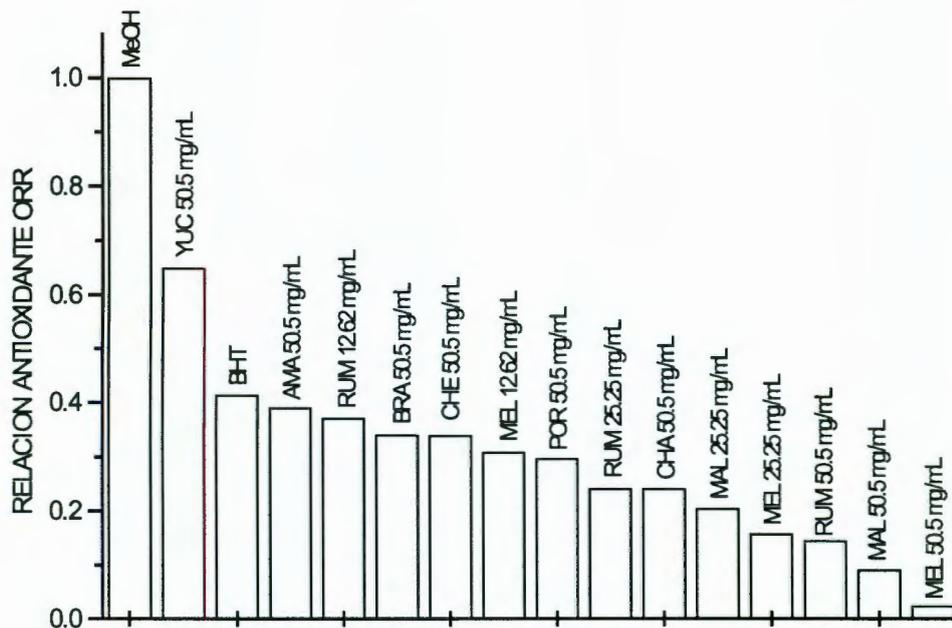


Figura 25. Comparación de la actividad antioxidante de las especies objeto de estudio por el tercer método ORR (relación antioxidante).

VII.5.4 Cuarto método.

Para el cuarto método, el coeficiente de actividad antioxidante AAC del estándar es comparado nuevamente con cada una de las especies teniendo el valor promedio de AAC para BHT = 652.4142 y AAC MeOH = 0.

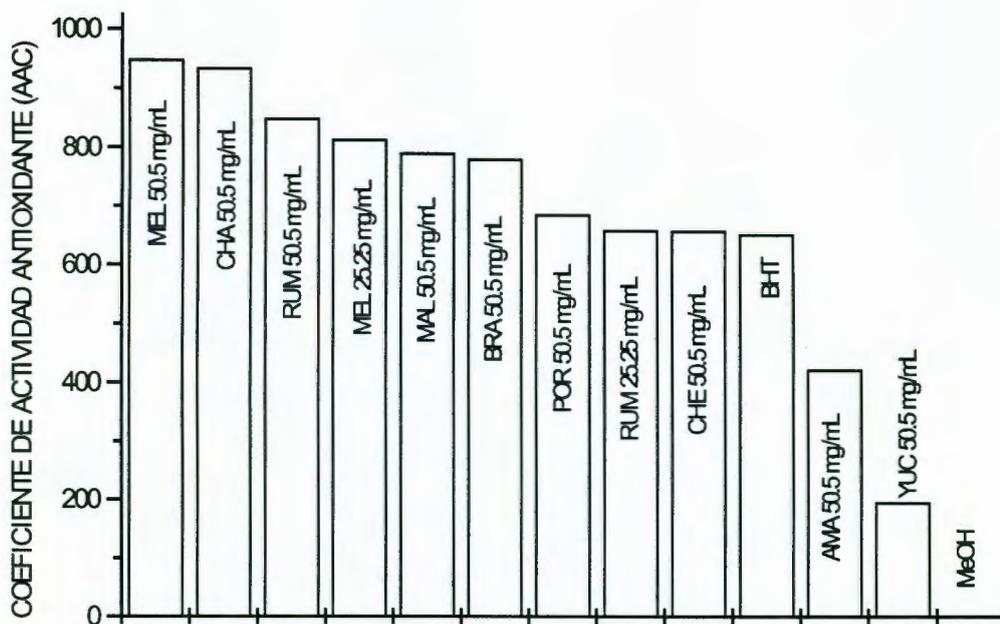


Figura 26. Comparación de la actividad antioxidante de las especies objeto de estudio por el cuarto método AAC (Coeficiente de actividad antioxidante).

Podemos observar en la figura 26, que ahora las especies con una AAOX representante son *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Rumex crispus* L. y *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh, por lo que podemos decir que las primeras dos tiene una AAOX significativa pues ya por los cuatro métodos se mantienen como especies con una actividad significativa comparando con el estándar BHT, tomando en cuenta que *Melampodium perfoliatum* H.B.&K. tiene estas características a concentraciones más pequeñas que las demás especies.

VII.6 Relación de la concentración de fenoles totales y flavonoides totales con la actividad antioxidante.

Los antioxidantes naturales pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides, entre otros (Velioglu y col., 1998).

La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos, con la excepción de los tocoferoles. Algunos de los compuestos mayoritarios reportados hasta ahora son los flavonoides y compuestos relacionados en extractos de plantas (Madhavi y col., 1996).

Relacionando la cantidad de flavonoides totales con la actividad antioxidante en los cuatro métodos las especies en orden de importancia son: *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Malva parviflora* L., *Rumex crispus* L. y *Cnidoscopus chayamansa* Mc. Vaugh, considerando lo observado en los cuatro métodos.

Cuadro 14. Comparación entre las cantidades de fenoles totales y flavonoides totales de las especies con actividad antioxidante considerable.

Especie.	Fenoles totales mg ác. Gálico / 100g de extracto (promedio)± DE	Flavonoides totales mg catequina / 100g de extracto (promedio) ± DE
<i>Melampodium perfoliatum</i> H.B.&K.	5850.245 ± 758.36	4121.50 ± 483.95
<i>Malva parviflora</i> L.	1717.57 ± 117.76	1662.46 ± 74.25
<i>Rumex crispus</i> L.	2464.82 ± 94	1926.04 ± 142.25
<i>Cnidoscopus chayamansa</i> Mc. Vaugh.	3470.76 ± 236.7	1498.08 ± 127.78

Melampodium perfoliatum H.B.&K. posee la mayor cantidad de fenoles totales y flavonoides que las otras especies con actividad antioxidante considerable.

Podemos observar en cuadro 14 que *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaughn tiene una mayor cantidad de fenoles totales que *Malva parviflora* L. y *Rumex crispus* L., sin embargo la “chaya” tiene menos cantidad de flavonoides totales que estas. Por lo que podemos decir que los flavonoides totales en este caso son los responsables de la actividad antioxidante.

En *Rumex crispus* L. la cantidad de flavonoides es mayor que para *Malva parviflora* L. pero la diferencia entre la actividad antioxidante no es mucha ya que para *Rumex crispus* L. tiene un valor mayor en el cuarto método que *Malva parviflora* L. y sin embargo esta tiene un valor mayor en el segundo y tercer método, por lo cual podemos concluir que estas dos especies tienen una actividad antioxidante muy similar.

VII.7 Determinación de la actividad antimicrobiana.

No se mostró ningún efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de las especies estudiadas. Yildirim y colaboradores en el 2001 determinaron que el extracto etanólico de *Rumex crispus* L. muestra actividad antimicrobiana contra *S. aureus* STCC 25923 y *B. Subtilis* ATCC 6633 (Yildirim y col., 2001). En este caso no se encontró actividad contra las cepas estudiadas, a pesar que la polaridad del metanol y etanol son muy similares.

VIII. CONCLUSIONES.

- El porcentaje de rendimiento en promedio de las especies objeto de estudio es alrededor del 11%.
- Las tres especies con mayor cantidad de fenoles totales son: *Portulaca oleracea* L., *Melampodium perfoliatum* H.B.&K. y *Chenopodium murale* L.
- Las tres especies con mayor cantidad de flavonoides son: *Melampodium perfoliatum* H.H.&K. , *Portulaca oleracea* L. y *Chenopodium murale* L.
- En todas las muestras el contenido de fenoles es mucho mayor que el de flavonoides, por lo tanto los extractos poseen una mayor cantidad de metabolitos secundarios como fenoles simples.
- El método de decoloración del β -caroteno fue usado para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de especies vegetales comestibles donde se utilizó BHT 1000 μ M como estándar , las especies que mostraron una actividad antioxidante considerable con este método fueron las especies *Melampodium perfoliatum* H.B.&K., *Malva parviflora* L., *Rumex crispus* L. y *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh, las especies restantes mostraron baja actividad antioxidante.
- Los métodos AOX (actividad antioxidante), AA (% de inhibición relativo al control), ORR (relación antioxidante) y AAC (Coeficiente de actividad antioxidante) para las diferentes especies mostraron las mismas tendencias.
- La actividad antioxidante de las muestras presentó dependencia con la concentración.

- Las especies que presentan mayor actividad antioxidante no necesariamente son aquellas que tienen una concentración alta en flavonoides, pues en las especies *Portulaca oleracea* L. y *Chenopodium murale* L. su actividad antioxidante es menor que las especies que se mencionan en el párrafo anterior, sin embargo sería interesante realizar algún otro método para determinar la actividad antioxidante de estas especies.
- Ninguna de las especies estudiadas presentó actividad antimicrobiana contra las cepas que se utilizaron.
- En estudios posteriores sería interesante determinar que compuesto le confiere la actividad antioxidante a *Melampodium perfoliatum* H.B.&K.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Bohlmann F., Zdero Ch., 1976. Naturally Ocurring Terpene Derivates, 60. A New Diterpene from *Melampodium perfoliatum*. *Chemische Berichte*: Vol.109: 1670-1672.

Cardador M. A., Loarca P. G., Oomah D. B. 2002. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem*: Vol.50: 6975-6980.

Dewanto V., Wu X., Adom K. K., Lui R. H. 2002. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem*: Vol. 50: 3010-3014.

El-Sayed N. H., Awaad A. S., Hifnawy M. S., Mabry T. J.1999. A Flanonol triglycoside from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*: Vol. 51: 591-593.

Frazier W. C. 1976. Microbiología de los alimentos. 2da. ed., Acribia, Zaragoza España: 1-9, 66-67, 253.

Gohar A. A., Elmazar M. M. A. 1997. Isolation of Hypotensive Flavonoids from *Chenopodium* species Growing in Egypt . *Phytotherapy Research*: Vol 11: 564-567.

Gohar A. A., Maatooq G. T., Niwa M. 2000. Two Flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*: Vol. 53: 299-303.

Guinjuan R. J. 2000. <http://malesherbes.etsea.udl.es/visor/amaranthus-hybridus.htm>.

Hudson B. J. F. 1990. Food Antioxidants. 2da ed., El sevier Applied Science. New York: 1-15,65-68,171-179.

Iturbe-Chiñas F. A., López A., Canales M. 1986. Proteolytic enzymes from *Cnidocolus chayamansa* "chaya". *J. Food Science*: Vol. 51: 243-244.

Kennelly E. J., Gerhäuser C., Song L. L., Graham G. J. Beecher C. W. W., Pezzuto M. J., Kinghorn A. D. 1997. Induction of Quinone Reductase by Withanolides Isolated from *Physalis philadelphica* (Tomatillos). *J. Agric. Food Chem*: Vol. 45: 3771-3777.

Kuti J. O., Konuru H.B. 2004. Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidocolus spp.*). *J. Agric. Food Chem*: Vol 52: 117-121.

Kuti J. O., Kuti H. O. 1999. Proximate composition and mineral content of two edible species of *Cnidocolus* (tree spinach). *Plant foods for human Nutrition*. Vol 53: 275-283.

Liu M., Li X. Q., Weber C., Lee C. Y., Brown J., Liu R. H. 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries. *J. Agric. Food Chem*: Vol.50: 2926-2930.

López F. A. N., Ceja R. J., Zavala Hurtado A., Gío C. R., Romero C. Z. 2004. http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/yucca_filifera.htm

Madhavi D. L., Desphande S.S., Salunkhe D. K. 1996. Technological, Toxicological, and Health perspectives. Marcel Deker, inc. Estados Unidos de America:73

Mata R., Rivera J. F. 2000. Obtención y caracterización de los principales activos a partir de sus fuentes naturales: Curso teórico en farmacognosia. U.N.A.M.: 102

Montbrison S. L. 2000. <http://leroux01.club.fr/botanique2.htm>.

Montoya N. W. 2003. Servicio de información agropecuaria del ministerio de agricultura y ganadería del Ecuador. *El Agro*: Vol 20: 32-34.

Palaniswamy V. R., Mc Avoy R. J., Bible B. B. 2001. Stange of Harvestand polyunsaturated Essential Fatty Acid Concentrations in Puslane (*Portulaca oleracea*) Leaves. *J. Agric. Food Chem*: Vol. 49: 3490-3493.

Parish M. E., Davidson P. M. 1993. Methods for Evaluation Antimicrobials in food. Marcel Decker Inc. New York: 597-615.

Pietta P., Simonetti P., Mauri P. 1998. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *J. Agric. Food Chem*: Vol. 46: 4487-4490.

Quintero A., Zamudio F., Rosas V., Capella S., Romo de Vivar A. 1987. Sarsapogenin in *Yucca filifera* Callus Culture. *Rev. Latinoamericana*: Vol. 18: 24-28.

Radhakrishnan R., Zakaria M. N. M., Islam M. W., Chen H. B., Kamil M., Chan K., Al-Attas A., N. 2001. Neuropharmacological Actions of *Portulaca oleraceae* L. V. *Sativa*. *J. Ethnopharmacology*: Vol. 76: 171-176.

Randall J. M. 2005. <http://tncweeds.ucdavis.edu/photosp-z.html>.

Seaberg A. C., Labbe R. G., Shetty K. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Elite Clonal Extracts of Oregano (*Origanum vulgare*). *Food Biotechnology*: Vol. 17: 129-149

Suárez Ramos Gpe., Serrano Cárdenas V., Valderas Aguilar P., Pelz Marín R. 2004. Atlas de malezas arvenses del estado de Querétaro. 1ª.ed., Ediciones U.A.Q., Querétaro México: 15-35.

Tsuda T., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T. **1994**. Antioxidative Pigments Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Food Chem*: Vol. 42: 248-251

Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. **1998**. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Select Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem*: Vol. 46: 4113-4117.

Yeh C. M., Cruz T. O., Castaneda A. M., Del Castillo L. **1986**. Proteinases of Mexican Plants. XIV. Chayain from the latex of *Cnidoscolus chayamansa*. *Rev. Latinoamericana de Química*: Vol. 16: 162-163.

Yildirim A., Mavi H., Kara A. A. **2001**. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem*: Vol. 49: 4083-4089.