

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y
EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS
ACUOSOS DE *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* Y
Malva parviflora”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA GORETTI ARVIZU ESPINOSA

DIRIGIDA POR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.

No. Adq. H73580

No. Título _____

Clas. IS

615.32

A7959



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS ACUOSOS DE *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium
murale* Y *Malva parviflora*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA GORETTI ARVIZU ESPINOSA

DIRIGIDA POR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

SINODALES

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ
DIRECTORA

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA
SINODAL

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH
SINODAL

Q. ALFONSO PÉREZ BUENROSTRO
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Generalidades del metabolismo primario y secundario	3
II. 2. Flavonoides	3
II.2.1. Efectos farmacológicos de los flavonoides	5
II.2.2. Mecanismos de acción de la actividad antioxidante de los flavonoides	8
II.2.2.1. Actividad quelante de metales de transición y secuestradora de radicales libres de los flavonoides	8
II.2.2.2. Inhibición de oxidasas	9
II.2.2.3. Otros mecanismos de acción antioxidante de los flavonoides	9
II.2.2.4. Capacidad Reductora de los flavonoides	10
II.3. Estrés oxidativo	12
II.4. El uso de antioxidantes para el tratamiento de enfermedades	14
a) Enfermedades del sistema inmunológico	14
b) Daños cardiovasculares	14
c) Cáncer	15
d) Alzheimer	15
e) Diabetes mellitus	16
II.5. Generalidades de plantas a investigar	16
II.5.1. <i>Malva parviflora</i>	17

II.5.2. <i>Chenopodium murale</i>	19
II.5.3. <i>Portulaca oleraceae</i>	20
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	25
IV.1. Objetivo general	25
IV.2. Objetivos específicos	25
V. METODOLOGÍA	26
V.1. Materiales	26
V.2. Equipos e instrumentos	26
V.3. Reactivos y material biológico	27
V.3.1 Material biológico	27
V.3.1.1. Reactivos y disolventes para identificación de metabolitos secundarios	27
V.3.1.2. Reactivos y disolventes para la evaluación de la capacidad antioxidante por medio del ensayo FRAP	28
V.3.1.3. Reactivos y disolventes para la evaluación de la capacidad antioxidante por medio del ensayo ABTS	28
V. 4. Métodos	29
V.4.1. Preparación de los extractos acuosos	29
V.4.1.1. Hidrólisis ácida de extractos acuosos	29
V.4.2. Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, (HPLC)	29
V.4.3. Análisis de la capacidad antioxidante	30
V.4.3.1. Poder antioxidante de reducción férrica (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)	30
V.4.3.2. Método ABTS	31
VI. RESULTADOS	32
VI.1. Identificación de metabolitos secundarios mediante análisis HPLC	32
VI.1. 2. Identificación de Ácidos fenólicos y flavonoides en	33

extracto acuoso de <i>Portulaca oleraceae</i>	
VI.1.2.1. Extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	33
VI.1.2.2. Extracto acuoso hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	37
VI.1.3. Identificación de Ácidos fenólicos y flavonoides en extracto acuoso <i>Malva parviflora</i> .	41
VI.1.3.1. Extracto acuoso no hidrolizado <i>Malva parviflora</i>	41
VI.1.3.2. Extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	46
VI.1.4. Identificación de Ácidos fenólicos y flavonoides en extracto acuoso de <i>Chenopodium murale</i> .	50
VI.1.4.1. Extracto acuoso no hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i>	50
VI.1.4.2. Extracto acuoso hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i>	55
VI.2. Ensayo FRAP	58
VI.3. Ensayo ABTS	66
VII. DISCUSIÓN	70
VIII. CONCLUSIÓN	76
IX .BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Actividad antimicrobiana de flavonoides.	7
2	Ácidos fenólicos y flavonoides incluidos en la mezcla de estándares	32
3	Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	34
4	Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	36
5	Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	38
6	Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	40
7	Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	42
8	Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso no hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	45
9	Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	47
10	Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	49
11	Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i>	51

12	Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso no hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i>	54
13	Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i>	56
14	Lecturas y solución patrón de FeSO ₄ ·7H ₂ O (100 μM)	59
15	Cambio de absorbancia con respecto a la concentración a los 4 y 30 min de haber empezado la reacción de FeSO ₄ ·7H ₂ O	60
16	Regresión lineal de FeSO ₄ ·7H ₂ O a los 4 y 30 minutos	61
17	Cambio de absorbancia de los extractos acuosos de <i>Portulaca oleraceae</i> , <i>Chenopodium murale</i> y <i>Malva parviflora</i> a los 4 y 30 minutos.	63
18	Equivalentes de FeSO ₄ ·7H ₂ O para los extractos acuosos a los tiempos de 4 y 30 minutos	65
19	Valor calculado de FRAP en unidades FeSO ₄ ·7H ₂ O de los extractos acuosos	66
20	Cambio de absorbancia y porcentaje de inhibición a los 6 minutos de haber empezado el ensayo de ABTS tomando como estándar una solución de Trolox	67
21	Linealidad de la curva estándar de Trolox.	68
22	Porcentaje de inhibición para los extractos acuosos a los tiempos de 0 y 6 minutos	69
23	Valores de FRAP y ABTS para los extractos acuosos de <i>Portulaca oleraceae</i> , <i>Malva parviflora</i> y <i>Chenopodium murale</i>	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura base de los flavonoides	4
2	Ejemplos de estructuras resonantes de la oxidación de los flavonoides	12
3	<i>Malva parviflora</i> en estado natural	18
4	<i>Chenopodium murale</i> en estado natural	19
5	<i>Portulaca oleraceae</i> en estado natural	21
6	Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides para el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	33
7	Cromatograma del extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	35
8	Cromatograma del extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	35
9	Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i> (negro)	36
10	Cromatogramas de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i> (negro) y la coelución de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i> con el ácido protocatéuico (azul)	37
11	Cromatograma de extracto acuoso hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i>	39
12	Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y de extracto acuoso hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i> (negro)	39
13	Cromatogramas de extracto acuoso hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i> (negro) y la coelución de	40

	extracto acuoso hidrolizado de <i>Portulaca oleraceae</i> con el ácido protocatéuico (azul)	
14	Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides para el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	41
15	Cromatograma de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	43
16	Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Malva parviflora</i> (negro)	44
17	Cromatogramas de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Malva parviflora</i> (negro) y la coelución de de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Malva parviflora</i> con el ácido protocatéuico (azul)	45
18	Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides para el análisis del extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	46
19	Cromatograma de extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i>	48
20	Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y de extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i> (negro)	48
21	Cromatogramas de extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i> (negro) y la coelución de extracto acuoso hidrolizado de <i>Malva parviflora</i> con el ácido protocatéuico(azul)	49
22	Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides para el análisis del extracto acuoso de de <i>Chenopodium murale</i>	50
23	Cromatograma de extracto acuoso no hidrolizado	52

	de <i>Chenopodium murale</i>	
24	Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i> (negro)	53
25	Cromatogramas de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i> (negro) y la coelución de extracto acuoso no hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i> con el ácido protocatéuico y rutina (azul)	54
26	Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides, para el análisis del extracto acuoso hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i>	55
27	Cromatograma de extracto acuoso hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i>	57
28	Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y de extracto acuoso hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i> (negro)	57
29	Cromatogramas de extracto acuoso hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i> (negro) y la coelución de extracto acuoso hidrolizado de <i>Chenopodium murale</i> con el ácido protocatéuico (azul)	58
30	Gráfica de cambio de absorbancia del blanco y solución patrón de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 μM)	59
31	Gráfica que representa el cambio de absorbancia con respecto a la concentración a los 4 y 30 minutos para la solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	61
32	Cambio de absorbancia con respecto al tiempo de los extractos acuosos de <i>Portulaca oleraceae</i> , <i>Chenopodium murale</i> y <i>Malva parviflora</i> (100 mg/ml)	62
33	Gráfica que representa el cambio de absorbancia	64

	con respecto a la concentración de los extractos acuosos de <i>Portulaca oleraceae</i> , <i>Chenopodium murale</i> y <i>Malva parviflora</i> a los 4 minutos.	
34	Gráfica que representa el cambio de absorbancia con respecto a la concentración de los extractos acuosos de <i>Portulaca oleraceae</i> , <i>Chenopodium murale</i> y <i>Malva parviflora</i> a los 30 minutos.	64
35	Gráfica que representa la curva estándar de Trolox a 6 minutos	68
36	Gráfica comparativa del cambio del porcentaje de inhibición para los extractos acuosos de <i>Portulaca oleraceae</i> , <i>Chenopodium murale</i> y <i>Malva parviflora</i>	69
37	Comparativa de cromatogramas para extracto acuoso no hidrolizado (Negro) e hidrolizado (Azul) de <i>Portulaca oleraceae</i>	70
38	Comparativa de cromatogramas para extracto acuoso no hidrolizado (Negro) e hidrolizado (Azul) de <i>Malva parviflora</i>	71
39	Comparativa de cromatogramas para extracto acuoso no hidrolizado (Negro) e hidrolizado (Azul) de <i>Chenopodium murale</i>	71
40	Esquema que indica la degradación de la rutina por medio de una hidrólisis	73

RESUMEN

En la actualidad tanto el continuo desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánicas desembocan en la nueva producción de medicamentos, en donde muchos de éstos contienen principios activos de las plantas medicinales; *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora* son plantas utilizadas en diferentes regiones del territorio mexicano por sus propiedades medicinales esto gracias a su importante contenido de flavonoides. Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL), así como a la inhibición de oxidasas. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos. En el presente trabajo se identificaron compuestos fenólicos por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obteniendo como resultado la presencia del ácido protocatéuico en los extractos acuosos no hidrolizados de *P. oleraceae*, *M. parviflora* y *C. murale*, este último también presentó Rutina. En los extractos acuosos hidrolizados de *P. oleraceae* y *M. parviflora* se presentó en menor cantidad el ácido protocatéuico. La actividad antioxidante fue evaluada por los métodos de FRAP y ABTS. Benzie y Strainn propusieron un método para medir la capacidad antioxidante de los flavonoides por su habilidad de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , conocido como FRAP. Éste método fue estandarizado usando como solución patrón el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ a Fe^{2+} -TPTZ, está dado por equivalentes de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Dentro de los extractos acuosos estudiados, el de *C. murale* presentó la mayor capacidad reductora seguido por *M. parviflora* y por último *P. oleraceae*. El ensayo de ABTS de Van Den Berg y col. tiene como fundamento la capacidad de inhibir al radical ABTS^{*+} que actúa como oxidante. Este método se estandarizó con una solución patrón de Trolox. En los extractos acuosos evaluados, el que presenta mayor porcentaje de inhibición fue el de *C. murale*, seguido por *M. parviflora* y por último *P. oleraceae*.

I. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraían. Muchas especies de plantas, por sus virtudes curativas, entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo.

En la actualidad la prevención de las enfermedades, sobre todo las crónicas, ha incitado a la investigación científica de plantas usadas como alimentos nutraceuticos.

Estudios epidemiológicos han mostrado que una dieta rica en frutas y verduras está asociada con la disminución de hasta el 80% de enfermedades cardiovasculares, 90% de los padecimientos relacionados con la diabetes tipo II y aproximadamente 30% de los cánceres podrían ser evitados. Esto es atribuido en parte a la presencia de compuestos fenólicos y a sus propiedades antioxidantes.

Los flavonoides son compuestos fenólicos que constituyen la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino, café y té negro. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima que es de 23 mg/día, siendo la quercetina el flavonoide que predomina con un valor promedio de ingesta de 16 mg/día. A los flavonoides se les atribuye la capacidad de atrapar a los radicales libres (RL). Los RL son las especies químicas que se forman durante una reacción y que son capaces de existir con uno o más electrones desapareados. La presencia de estos electrones hace que las especies sean altamente reactivas

ya que requieren de otro electrón para llenar su orbital y volverse estables. Los radicales libres se producen en la respiración con la presencia de oxígeno que aunque es imprescindible para la vida celular de nuestro organismo, también induce la formación de estas moléculas reactivas, que provocan a lo largo de la vida efectos negativos para la salud debido a su capacidad de alterar el ADN, las proteínas y los lípidos (oxidación). En nuestro cuerpo existen células que se renuevan continuamente como las células de la piel, del intestino, y el hígado. En el transcurso de los años, los radicales libres pueden producir una alteración genética sobre las células que se dividen continuamente contribuyendo a aumentar el riesgo de cáncer por mutaciones genéticas o bien, disminuyen la funcionalidad de las células que no se dividen tanto, disminuyendo el número de mitocondrias, que es característico del envejecimiento.

Estudios de corte clínico y nutricional han demostrado que los radicales libres son responsables de ciertas enfermedades crónico-degenerativas y en general del estrés oxidativo.

Por todo lo anterior, el conocimiento de los perfiles de una planta, sobre todo en relación a los flavonoides así como el estudio de las propiedades biológicas de éstos, específicamente su capacidad reductora, es importante para entender su contribución en la disminución de la prevalencia de las enfermedades relacionadas con estrés oxidativo.

II. ANTECEDENTES

II. 1. Generalidades del metabolismo primario y secundario

El término general de metabolismo se refiere a un conjunto de reacciones químicas que tienen lugar dentro de las células de los organismos vivos, las cuales transforman energía, conservan su identidad y se reproducen.

Normalmente se distingue entre metabolismo primario y secundario. El primario se refiere a los procesos fotosintéticos que dan lugar a metabolitos primarios que se caracterizan por tener una función metabólica directa, ser compuestos intermedios esenciales en las vías catabólica y anabólica, encontrarse en todas las plantas. En cambio, el metabolismo secundario es en donde se producen metabolitos secundarios los cuales presentan diferente distribución en el reino vegetal, no tienen funciones metabólicas directas, pero son importantes para supervivencia e interacción con el entorno que les rodea (Dewick, 2003).

Entre los metabolitos secundarios que son de importancia encontramos a los alcaloides, taninos, saponinas y flavonoides.

II. 2. Flavonoides

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", la estructura base se cicla por acción de una enzima isomerasa.

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo. Pueden aparecer desde simples

moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da.

La estructura base, un esqueleto C₆-C₃-C₆ (Figura 1), puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos (Martínez y col., 2002).

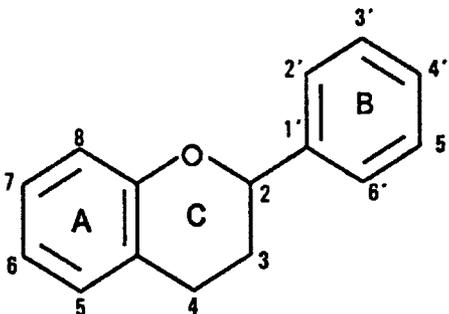


Figura 1. Estructura base de los flavonoides (Pérez, 2003).

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, entre otras.

Sin embargo, dentro de todas sus propiedades las de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional, teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos son comúnmente recomendados en todo el mundo.

Estudios epidemiológicos han demostrado que una ingesta de flavonoides promedio de 23 mg/día ayudan a evitar la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), ya que son excelentes antioxidantes (Dugas y col., 2000).

II. 2. 1. Efectos farmacológicos de los flavonoides

Los flavonoides consumidos por el hombre lo protegen del daño de los oxidantes, como los rayos UV (cuya cantidad aumenta en verano); la polución ambiental (minerales tóxicos como el plomo y el mercurio); algunas sustancias químicas presentes en los alimentos (colorantes, conservantes, etc.). Como el organismo humano no tiene la capacidad de sintetizar estas sustancias químicas, las obtiene enteramente de los alimentos que ingiere.

Al limitar la acción de los radicales libres (que son oxidantes), los flavonoides reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, evitan las tufaradas de calor en la menopausia y combaten otros síntomas.

En general, el sabor de los flavonoides es amargo, aunque puede variar dependiendo de las sustituciones presentadas en el esqueleto llegando incluso a usarse como edulcorantes cientos de veces más dulces que la glucosa.

- Propiedades anticancerosas: muchos han demostrado ser tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas. Se ha probado contra el cáncer de hígado tanto apigenina como quercetina.
- Propiedades cardiotónicas: tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque este efecto es producido en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina. Se ha estudiado que los flavonoides reducen el riesgo de enfermedades cardíacas.

- Propiedades antitrombóticas: la capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.
- Protección del hígado: algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de contraer enfermedades en el hígado. Fue probado en laboratorio que la Silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis. Junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.
- Protección del estómago: ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.
- Antiinflamatorios y analgésicos: la hesperidina, por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se ha utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides.
- Antimicrobianos (Cuadro 1): isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas (Narayana y col., 2001).
- Fragilidad capilar: mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Los flavonoides con mejores resultados en este campo son la hesperidina, la rutina y la quercetina.
- Disminución del colesterol: poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos (Tsimikas y col., 2005).

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de flavonoides.

Microorganismo	Flavonoides
Antibacterial	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Quercetina, Naringina, isoquercetina
<i>S. albuns</i>	Fisetina
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Apigenina
<i>S. viridans</i>	Apigenina
<i>S.s baris</i>	Crisina
<i>S. pneumoniae</i>	Crisina
<i>Shigella boydii</i>	Hesperitina, Naringina y Rutina
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Rutina, Naringina
<i>Escherichia coli</i>	Quercetina
<i>Bacillus subtilis</i>	Quercetina
<i>B. anthracis</i>	Rutina
<i>Proteus vulgaris</i>	Datisetina
<i>Clostridium perfringens</i>	Hidroxi-etil-rutosida
Actividad antiviral	
<i>Rhabdovirus</i>	Quercetina y Rutina
<i>Herpes hominis</i>	
<i>Tipo I</i>	Galangina, Quercetina y Kaempferol
<i>Tipo II</i>	Quercetina
<i>Parainfluenza</i>	Quercetina y Rutina
VIH	Apigenina
<i>Poliovirus</i>	Quercetina
Actividad antimicótica	
<i>Candida albicans</i>	Cloro-flavonina
<i>Fusarium solani</i>	Crisoeriol
<i>Botrytis cinerea</i>	Crisoeriol
<i>Verticillum dahliae</i>	Crisoeriol

II. 2. 2. Mecanismos de acción de la actividad antioxidante de los flavonoides

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL); así como de la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO), evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) in vivo, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). De esta forma, los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí (Acuña y col., 2004).

II. 2. 2. 1. Actividad quelante de metales de transición y secuestradora de radicales libres de los flavonoides

Las ERO reaccionan con las biomoléculas conduciendo al daño celular y tisular. Afortunadamente, el organismo cuenta con mecanismos efectivos para protegerse de los efectos nocivos de estas especies químicas. Estos mecanismos se componen de enzimas y de compuestos no enzimáticos como el glutatión (GSH), el ácido ascórbico, el α -tocoferol contenido en la membrana, los flavonoides y los carotenos.

Numerosas investigaciones han evaluado la actividad antioxidante de los flavonoides frente a los RL generados durante la peroxidación lipídica (POL), ya sea enzimática o no enzimática (Acuña y col., 2004).

II. 2. 2. Inhibición de oxidasas

La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus actividades antioxidantes. Existen evidencias de que la Quercetina y la Rutina inhiben la NADPH del sistema de la citocromo P-450 en microsomas hepáticos. Este efecto pudiera impedir el metabolismo de una gran diversidad de xenobióticos que emplean esta vía para generar RL.

Las oxidasas CO y LO, involucradas en la cascada del ácido araquidónico, resultan inhibidas por los flavonoides en múltiples ensayos experimentales. La eficacia de la inhibición varía enormemente; así, un único flavonoide puede inhibir una enzima a bajas concentraciones, pero puede necesitar de concentraciones 100 veces superiores para inhibir otra (Battaglia y col., 2005).

II. 2. 2. 3. Otros mecanismos de acción antioxidante de los flavonoides

Además de secuestrar RL, quelatar iones metálicos e inhibir oxidasas, los flavonoides pueden aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes. Al mismo tiempo que son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de ERO.

La teoría mitocondrial del envejecimiento indica que el aumento de los radicales libres de oxígeno y nitrógeno (RLO/RLN) que se produce a lo largo de la vida, altera la función mitocondrial. En el envejecimiento, disminuye progresivamente la eficiencia de la cadena de transporte electrónico (CTE) y la producción de ATP, lo que contribuye a la disminución de funciones cognitivas como la memoria.

Estas alteraciones son similares a las que ocurren en procesos neurodegenerativos e inflamatorios, tales como el Parkinson, Alzheimer, Huntington

y ataxia de Friedreich, e incluyen alteraciones en la CTE y la fosforilación oxidativa, debidas al daño oxidativo e indirectamente a las mutaciones del ADN mitocondrial y nuclear inducidas por el estrés oxidativo (Willcox y col., 2004).

II. 2. 3. Capacidad reductora de los flavonoides

Se han desarrollado varios métodos para evaluar la capacidad antioxidante global, generalmente basados en la evaluación de la capacidad de captura de radicales libres en la evaluación de su capacidad reductora (Firuzi y col., 2005).

La actividad antioxidante de los flavonoides se ha evaluado a través de varias especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como los radicales: 1,1-difenil-2-picrihidrazil (DPPH), hidroxilo (OH^\cdot), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido (ROO^\cdot) el hipoclorito (ClO^\cdot). Sin embargo, existen discrepancias en los estudios realizados debido en parte a las diferencias que hay entre los métodos de medición. Algunos autores miden la actividad antioxidante a través de los métodos de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) o por medio de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) (Apak y col., 2005).

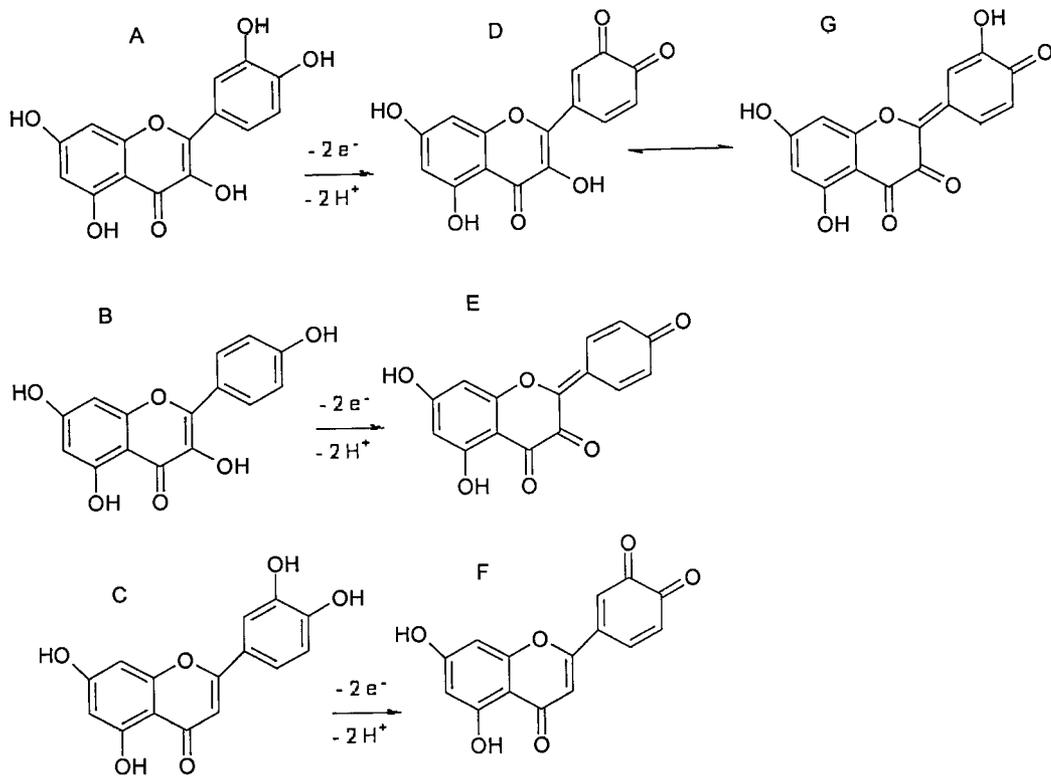
Otro método utilizado para la medición de la capacidad total antioxidante es el ensayo conocido como FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), el cual es un método simple de colorimetría propuesto por Benzie y Strain en 1996. Este método está basado en la habilidad de los flavonoides de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} ; mientras que la mayoría de los métodos aplicados para evaluar la estructura y la capacidad antioxidante de los flavonoides se basan en la capacidad del flavonoides de atrapar al oxidante. El FRAP mide directamente la capacidad reductora de la sustancia que es un parámetro importante de un compuesto antioxidante.

Otro ensayo utilizado ampliamente es el método ABTS, tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica.

El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342 nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical ABTS•+ una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl]), pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm.

El radical ABTS•+ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las antocianinas, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además radical generado químicamente (persulfato potásico), fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente (Miller y Rice, 1997).

De acuerdo con estudios de estructura-actividad, se explica que la presencia de un grupo catecol en el anillo B del flavonoide, un grupo hidroxilo en el anillo C y una doble ligadura en los carbonos 2, 3 del anillo C, son responsables en la formación de estructuras resonantes muy estables como se muestra en la Figura 2 y son características de flavonoides que presentan una actividad antioxidante elevada. Se ha pensado de forma generalizada que la presencia de grupos hidroxilos en la estructura del flavonoides aumenta su capacidad antioxidante (Galati y col., 2001).



A= 5,7,3',4'-tetrahydroxiflavonol
(Quercetina)

B= 2, 3, 4, 5-tetrahydroxiflavonol
(Kaempferol)

C= 5, 7, 3', 4'-tetrahydroxiflaoona
(Luteolina)

D y G = Estructuras resonantes de la
Quercetina

E = Estructura resonantes del
Kaempferol

F= Estructurasa resonantes de la
Luteolina

Figura 2. Ejemplos de estructuras resultantes de la oxidación de los flavonoides
(Pérez, 2003).

II. 3. Estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno (EROS) incluyen: el radical superóxido (O^{2•-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el oxígeno singlete (¹O₂) y el ácido hipocloroso (HClO).

Si el balance entre la formación y la eliminación de las especies EROS se altera a favor de lo primero, estos metabolitos inducen reacciones en cadena, capaces de dañar moléculas de importancia biológica (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), a este fenómeno se le denomina estrés oxidativo. En particular el ataque a los lípidos provoca su oxidación y esto a su vez conduce a la formación de nuevas especies de radicales libres y metabolitos tóxicos, por lo que se desencadena una cascada de eventos que amplifican el daño (Willcox y col., 2004).

La oxidación es un proceso natural, por lo que el organismo requiere mecanismos preventivos para retardar el proceso de oxidación. Las vitaminas A, C, E y los oligoelementos (zinc, manganeso, cobre, selenio y el hierro) son ejemplos de antioxidantes que se encuentran en las frutas y verduras y son requeridos por las enzimas destoxificadoras como la superóxido dismutasa.

El proceso de envejecimiento se asocia con el incremento de estrés oxidativo y se relaciona con la pérdida de la capacidad antioxidante. Se sugiere que los cambios que se presentan con la edad son manifestaciones de la inhabilidad del cuerpo de enfrentarse al estrés oxidativo que ocurre en el transcurso de la vida. Ya sea normal o patológico, el envejecimiento es asociado con el incremento a la sensibilidad a los radicales libres.

El estrés oxidativo es provocado por innumerables fuentes, algunas de éstas provienen de nuestro ambiente, como los agentes contaminantes, pero otras son el resultado de nuestra actividad metabólica.

En las células, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la síntesis de ATP utiliza al oxígeno como último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, donde aproximadamente el 15 % del oxígeno utilizado pudiera producir radicales libres.

II. 4. El uso de antioxidantes para el tratamiento de enfermedades

a) Enfermedades del sistema inmunológico

Los radicales libres son vitales para la presentación del antígeno y la proliferación celular. Sin embargo, niveles demasiado altos pueden disminuir la función inmune. El estrés oxidativo es perjudicial para los linfocitos debido a la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poli-insaturados en la membrana celular y a la oxidación de las proteínas del plasma. Los antioxidantes pueden mejorar la respuesta controlando la producción de radicales libres en la proliferación celular (Willcox y col., 2004).

b) Daños cardiovasculares

La hipoxia y re-oxigenación son causa frecuentes de mortalidad debido a isquemia miocárdica; en el shock circulatorio y en el trasplante de órganos, existe una gran producción de especies reactivas de oxígeno que pueden alterar los mecanismos de señalización celular y dañar a los lípidos, proteínas y ADN, produciendo lo que se llama daño por isquemia-reperfusión. La exposición de las células endoteliales a los fenómenos de isquemia-reperfusión produce un aumento de la apoptosis secundaria debido a la liberación del Citocromo C, que puede ser evitada al consumir vitamina C (Dhar y col., 2005).

La estenosis valvular aórtica (EVA) es una patología crónica evolutiva. La vitamina E, además de su capacidad antioxidante, reduce los valores del factor nuclear κ -B (NF κ -B) que también participa en los procesos inflamatorios y aumenta la expresión de las moléculas de adhesión. Por su parte, la vitamina C posee propiedades antioxidantes y reduce la disfunción endotelial. La vitamina C reconstituye a la vitamina E oxidada y por ello tiene un mecanismo sinérgico (Tahir y col. 2005).

c) Cáncer

Las dolencias más comunes de los pacientes con cáncer durante el tratamiento con radioterapia son: la fatiga, náuseas, vómitos, malestar general, diarrea y dolores de cabeza. Estos efectos adversos, como se sabe, son debido al daño de tejidos normales durante el curso de la terapia.

Pruebas recientes indican que la fatiga es relacionada con una reducción de la función mitocondrial, debido a la pérdida de eficacia en la cadena del transporte de electrones causada por la oxidación de la membrana, que es lo que ocurre durante el envejecimiento. La terapia de reemplazo de lípidos administrada como un suplemento alimenticio con antioxidantes puede prevenir el daño oxidativo restaurando la membrana mitocondrial y otras funciones celulares; reduciendo los efectos adversos de la radioterapia en general. En pacientes con cáncer, el ensayo clínico de cruce, que usa la terapia de reemplazo de lípidos más antioxidantes, demostró que se pueden reducir los efectos adversos de la quimioterapia en los pacientes en un 57-70% (Nicolson, 2005).

d) Alzheimer

En la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA), existe un componente de estrés oxidativo, cuya magnitud y participación en la génesis y el mantenimiento de la enfermedad aún no ha sido esclarecido. Mientras tanto, existen numerosos estudios con el empleo de antioxidantes, en la prevención o reducción de la sintomatología de la EA. Se efectuaron estudios de ADN para el genotipo de la apolipoproteína E (APOE) a fin de identificar y diagnosticar los casos prevalentes de demencia. La administración de vitamina E y C, o complejo multivitamínico se asoció inversamente con la concentración de APOE (Zandi y col., 2004).

f) Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una condición metabólica de incidencia creciente, caracterizada por disfunción en la homeostasis de la glucosa, que se presenta con hiperglucemia crónica y con inmunodeficiencia absoluta o relativa. La enfermedad es progresiva y está asociada con el estrés oxidativo. La hiperglucemia puede dañar los sistemas antioxidantes permitiendo que las especies reactivas de oxígeno dañen otras moléculas, incluso proteínas estructurales. La protección contra el daño producido por las especies reactivas de oxígeno está dada por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX), las cuales detoxifican e impiden oxidaciones biológicas (Guerra y col., 2003).

Se ha observado que con una ingesta de antioxidantes, se tiene una mejora en los síntomas neurológicos, así como una disminución en la peroxidación lipídica, y en la hemoglobina glicosilada, esto último debido al aumento de la actividad de la enzima glutatión reductasa (Willcox y col., 2004).

Por todo lo anterior este trabajo está enfocado al estudio de tres plantas medicinales: *Portulaca oleraceae*, *Malva parviflora* y *Chenopodium murale* además la correlación con los temas ya tratados.

II. 5. Generalidades de plantas a investigar

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de afecciones humanas esta basado en el folklore y la tradición. La Organización Mundial de la Salud estima que un 80% de la población en países en vías de desarrollo, confía en las medicinas tradicionales para solucionar sus problemas de salud. La mayoría de las terapias están basadas en el uso de plantas, pero lo anterior no posee una prueba científica, por lo que es de gran interés realizar estudios con la finalidad de conocer sus principios activos y sus efectos en la salud humana (Mata y Rivero, 2007).

II.5.1. *Malva parviflora*

Nombre común: Malva o Malva de quesitos; Familia: *Malvaceae*.

M. parviflora es una planta herbácea, rastrera o ascendente, de usualmente 50 centímetros de alto; con tallo casi glabro y con hojas orbiculares de 2.5 cm de largo por 6 cm de ancho (Figura 3). Las flores se presentan durante todo el año y se encuentran de 1 a 4 flores en las axilas de las hojas, de 8 a 12 mm de diámetro, pudiendo ser de color lila o blanco. El fruto es un esquizocarpio de 5 a 10 mm de diámetro (Fryxell, 1993).

La malva se encuentra distribuida en altitudes de entre 2,250 a 2,950 metros sobre el nivel del mar y es originaria de Europa y adventicia en América.

En el estado de Querétaro, esta planta se encuentra en los municipios de Amealco, Cadereyta, Colón, Corregidora, El Marqués, Ezequiel Montes, Huimilpan, Pedro Escobedo, Peñamiller, Pinal de Amoles, Querétaro de Arteaga, Tolimán y Tequisquiapan. En el municipio de Pedro Escobedo se utiliza como alimento en estado tierno. En los municipios de Huimilpan, Pedro Escobedo y Corregidora se utiliza como planta medicinal para golpes y, en Tolimán, para curar heridas. En Amealco, la malva se usa como planta medicinal para combatir la tos, hervida con canela. La malva actúa principalmente como desinflamatoria, también para bajar la fiebre, así como para lesiones en la piel (Suárez y col., 2004).

Los extractos hexánicos de *M. parviflora* inhiben el crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* (Jiménez y col., 2003), presentan actividad antiinflamatoria y antibacterial (Shale y col., 2005). Así mismo, las semillas de la planta de *M. parviflora* exhiben un efecto anticancerígeno (Wang, 2001). Adicionalmente, esta planta es una fuente importante de tiamina (Meyer, 2005).



Figura 3. *M. parviflora* en estado natural (Quiles, 2009).

Camacho y col. (2007) reportan un contenido de fenoles totales de 30.82 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto acuoso y de flavonoides totales de 20.27 mg equivalentes de catequina/g de extracto acuoso. Miranda y col. (2005) reportan un contenido de fenoles totales de 298 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto metanólico y de flavonoides totales de 10.9 mg equivalentes de catequina/g de extracto. Estos resultados muestran un mayor contenido de fenoles totales en el extracto metanólico que en el extracto acuoso, lo que además sugiere que esta planta puede actuar como agente antioxidante.

II.5. 2. *Chenopodium murale*

Nombre común: Quelite o Quelite de pollo; Familia: *Chenopodiaceae*.

C. murale es una planta herbácea, erecta de 20 hasta 50 cm de alto, su tallo es profundamente ramificado desde la base y farinoso. Las flores son de color verde y pequeñas, agrupadas en panículas (Figura 4); las hojas son rómbico ovaladas de 2 a 8 cm de largo. Las inflorescencias están en forma de pequeños

glomérulos, en cimas o panículas axilares o terminales, más bien cortas, y los frutos presentan pericarpios de color negro (Rzedowski, 1979).

Esta planta es originaria de Euroasia y naturalizada ampliamente en América; habita en climas templados entre los 2,100 y 2,200 metros sobre el nivel del mar, además habitando en climas semiseco y templado. La planta se localiza en los municipios de Amealco, Cadereyta y Peñamiller. El quelite se cultiva como ornamental; las raíces se utilizan en medicina casera. Sus usos medicinales son: para infecciones en la piel, padecimientos renales y para controlar el vomito. En Cadereyta se utiliza esta planta como alimento (Suárez y col., 2004).

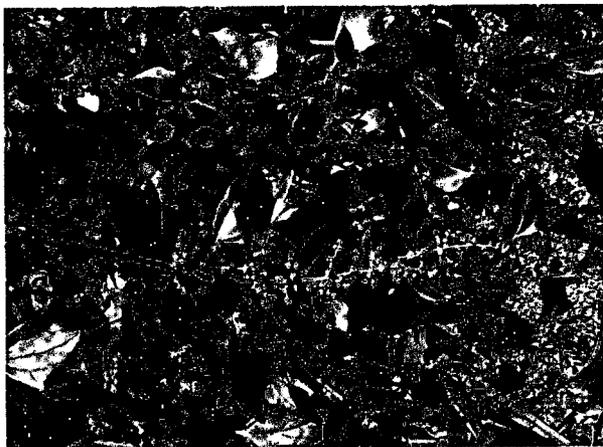


Figura 4. *C. murale* en estado natural (Quiles, 2009).

Se ha reportado el aislamiento de triglicósidos de Kaempferol (flavonoides glicosilados), flavonoides y aceites esenciales del extracto metanólico de esta planta (Gohar y col., 2000), así como una cumarina y tres agliconas nuevas a partir de los extractos de una variedad *C. murale*, cuyas hojas se utilizan en ensaladas y las semillas en panes, fermentos de bebidas y también como alimento para animales. Así mismo, la planta ha mostrado actividad citotóxica contra células amnióticas de epitelio (Awadh y col., 2001). La especie presenta actividad

hipotensora (disminución de la presión arterial) e inducción de la actividad de la enzima quinona reductasa (NQO1) (Gohar, 2000).

Camacho y col. (2007) reportan para el extracto acuoso de *C. murale* un contenido de fenoles totales de 30.62 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto y de flavonoides totales de 15.83 mg equivalentes de catequina/g de extracto acuoso. Así mismo, Miranda y col. (2005) reportan un contenido de fenoles totales 363 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto y de flavonoides totales de 13.8 mg equivalentes de catequina/g de extracto metanólico, lo que sugiere que esta planta puede actuar funcionar como agente antioxidante. El contenido de fenoles totales fue mayor en el extracto metanólico puesto que son más solubles en este disolvente.

II. 5. 3. *Portulaca oleraceae*

Nombre común: Verdolaga; Familia: *Portulacaceae*.

La verdolaga es una hierba anual, suculenta (contiene alrededor del 90% de agua); con tallo glabro postrado o ascendente, de color rojizo o verde, generalmente muy ramificado en la base; posee ramas extendidas en forma radial desde la base de la planta, de 20 a 40 cm de largo. Las hojas son espatuladas y aplanadas, alternas a menudo esparcidas en aglomeraciones sobrepuestas. La inflorescencia generalmente terminal es pequeña, con racimos de 2 a 6 flores amarillas agrupadas en panículas, las cuales se abren en las mañanas (Figura 5).

La verdolaga posee numerosas semillas, pardo oscuras a negro o azuladas y el fruto es un pixidio, fruto oblongo transversalmente dehiscentes, de color café claro. La verdolaga es una planta de rápido crecimiento, compatible con otros cultivos y produce una gran cantidad de semillas con una alta viabilidad (Liu y col., 2002).

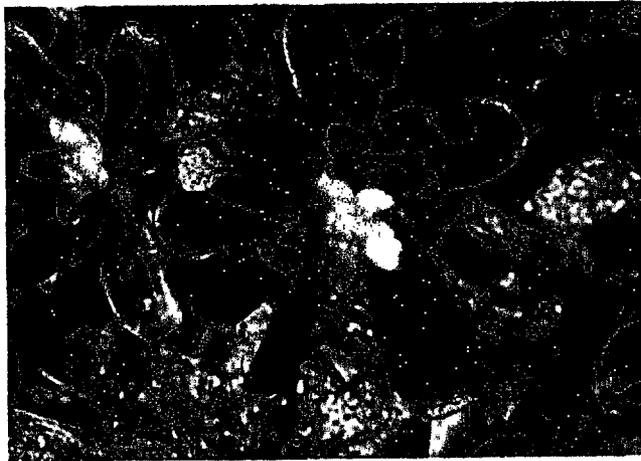


Figura 5. *P. oleraceae* en estado natural (Quiles, 2009).

Esta planta es originaria de la India y actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo, además es muy frecuente encontrarla en los cultivos, jardines, como planta ornamental y en algunas áreas es destinada a la producción agrícola. En las regiones templadas y tropicales del mundo posee una gran distribución ya que es una planta cosmopolita. Además esta planta es comestible, utilizándola como verdura cocida, a menudo los tallos y las hojas se comen en ensaladas.

En México, la verdolaga se utiliza también en usos medicinales relacionados con problemas digestivos, tales como infecciones intestinales, estreñimiento y parásitos. En el estado de Querétaro, la *P. oleraceae* se encuentra en forma silvestre en los municipios de Amealco, Colón, Cadereyta, El Marqués, Ezequiel Montes, Pedro Escobedo, Peñamiller y Tequisquiapan. Así mismo, en los cultivos encuentra las condiciones ideales para su crecimiento, por lo que es posible encontrarla como maleza (Suárez y col., 2004).

La *P. oleraceae* se utiliza en la medicina tradicional como diurético, antiséptico, antiespasmódico, febrífugo y vermífugo, para aliviar el dolor y la inflamación. En la península arábiga, la verdolaga se corta usualmente en pequeños trozos tanto hojas como semilla, se cocinan o se usan tópicamente para

infecciones en la piel. El jugo de las hojas en compresa se aplica en la sien para evitar el exceso de calor, la infusión de las hojas se utiliza como diurético. Esta planta se ha estudiado exhaustivamente en Nigeria y Escocia principalmente por su actividad como relajante muscular. Por otro lado, la administración intravenosa de 200 mg/Kg de verdolaga produce convulsiones en ratones por el alto contenido de potasio de esta planta (Radhakrishnan y col., 2001).

Se han encontrado diversas propiedades farmacológicas en estudios científicos, Zhang y col. (2002) encontraron propiedades antibacteriales; Chan y col. (2000) atribuyen capacidades analgésicas y antiinflamatorias; Okwuasaba y col. (1988) descubrieron el mecanismo por el cual actúa como relajante del músculo esquelético, también observaron que es una planta utilizada para calmar el dolor; Radhakrishnan y col. (2001) demuestran la capacidad antiespasmódica al relajar la actividad locomotora del sistema nervioso central o del músculo esquelético.

Los lípidos presentes en esta planta son ricos en ácidos grasos esenciales poliinsaturados y se ha demostrado que tienen un papel importante en enfermedades del corazón. Se ha reportado que la verdolaga es un vegetal rico en ácido α -linoleico y β -caroteno, 100 g de las hojas contienen 200 mg de ácidos grasos de cadena corta y 2.5 g de β -caroteno, además de presentar un 50% de ácido α -linolénico en el total de ácidos grasos (Liu y col., 2002).

P. oleraceae es una planta que puede utilizarse en un futuro por su alto contenido nutricional y propiedades antioxidantes. Además, es un excelente recurso de antioxidantes como son vitamina A, C y E, que tienen la habilidad de neutralizar radicales libres, con lo que se tiene el potencial de prevenir el cáncer, los padecimientos cardiovasculares y enfermedades infecciosas (Liu y col., 2002).

La *P. oleraceae* contiene betalaínas así como antocianinas. Las betalaínas son hidrosolubles y consisten tanto en betacianinas, que dan un color rojo-violeta,

como en betaxantinas, que dan un color amarillo. De las hojas se han aislado compuestos del grupo de las betacianinas, oleraceinas I y II (Xiang y col., 2005).

Camacho y col. (2007) reportan para el extracto acuoso de *P. oleraceae* un contenido de fenoles totales de 34.39 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto acuoso y de flavonoides de 26.98 mg equivalentes de catequina/g de extracto acuoso. En lo que respecta al extracto metanólico, Miranda y col. (2005) reportan un contenido de fenoles totales de 808 mg equivalentes de ácido gálico/g y de flavonoides de 61.2 mg de equivalentes de catequina/g de extracto acuoso, lo que sugiere que esta planta puede funcionar como agente antioxidante.

La malva, el quelite y la verdolaga son vegetales comestibles con efectos farmacológicos y con un alto contenido de fenoles y flavonoides, por lo que resulta atractivo evaluar la capacidad antioxidante de extractos de estas plantas. Estas especies vegetales pueden constituir una nueva alternativa para el cuidado de la salud.

III. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora* presentan cantidades cuantificables de ácidos fenólicos y flavonoides que les proporcionan capacidad antioxidante.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Identificar los ácidos fenólicos y flavonoides además de evaluar la capacidad reductora de los extractos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora*.

IV.2 Objetivos específicos

- Identificar los ácidos fenólicos y flavonoides de los extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora* por medio de cromatografía líquida de alta resolución.
- Evaluar la capacidad reductora de los extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora* mediante la técnica de FRAP.
- Evaluar la capacidad antirradical de los extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora* mediante la técnica de ABTS.

V. METODOLOGÍA

V. 1. Materiales

- Matraces Erlenmeyer 250 mL
- Matraces bola de 50 mL
- Matraces volumétrico de 5 mL con tapa
- Matraces volumétrico de 10 mL
- Matraz volumétrico de 50 mL
- Matraz volumétrico de 250 mL
- Viales de 10 y 20 mL con tapa
- Viales ámbar de 10 mL con tapa
- Pipetas
- Embudos
- Condensador delgado
- Probetas de 10 y 25 mL
- Vasos de precipitado
- Soporte universal
- Pinzas
- Micropipetas de 20, 100, 200, 1000 y 5000 μL
- Pipeta multi-canal
- Placas para lector de Elisa
- Papel aluminio
- Papel filtro Wattman 40
- Parafilm

V. 2. Equipos e instrumentos

- Termómetro
- Balanza analítica Sartorius

- Rotaevaporador de alto vacío, con baño, soporte y elevador marca Büchi
- Bomba de alto vacío para rotaevaporador 0.001 mmHg
- Plato caliente marca Corning
- Lector de ELISA Versamax Microplate reader. SoftMax Pro. 2004
- Liofilizadora marca labconco
- Ultracongelador -86°C ULT Freezer marca ThermoForma
- Un sistema cromatográfico (HPLC) marca Waters integrado por una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, acoplada a un detector ultravioleta-visible programable modelo 486. El equipo está provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). La adquisición del procesamiento de datos se llevó a cabo utilizando el programa Empower2 (Waters).

V.3. Reactivos y material biológico

V.3.1. Material biológico

- Extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora*

V. 3. 2. Reactivos y disolventes para la identificación de metabolitos secundarios

- Ácido clorhídrico al 36% (J.T. Baker).
- Metanol (J.T. Baker)
- Acetonitrilo (J.T. Baker)
- Agua destilada

V. 3. 3. Reactivos y disolventes para la evaluación de la capacidad antioxidante por medio del ensayo FRAP

- Acetato de sodio (Aldrich)
- Ácido acético glacial (J.T. Baker)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker)
- Cloruro férrico hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)
- Sulfato ferroso heptahidratado (control positivo), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)
- 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina, (TPTZ) (Sigma)
- Metanol (J.T. Baker)
- Agua Destilada
- Soluciones amortiguadoras de pH de 4 y 7 (J.T. Baker)
- Solución FRAP: amortiguador de acetato 300 mM, a un pH de 3.6, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, Sulfato ferroso heptahidratado (control positivo), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM

V. 3. 4. Reactivos para la evaluación de la capacidad antioxidante por medio del ensayo ABTS

- Ácido 6-Hidroxi-2, 5, 7, 8- tetrametilcromo-2-carboxílico al 97% (TROLOX), (Aldrich)
- Sal 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzodiazolina-6-sulfónico)diamonio (ABTS), (Sigma)
- Persulfato de potasio (Sigma-Aldrich)
- Metanol (J.T. Baker)
- Etanol Hn
- Agua destilada

V. 4. Métodos

V. 4. 1. Preparación de los extractos acuosos

El material vegetal se secó en una estufa a 25°C. Enseguida se pulverizó en un molino manual y se extrajo con agua, mediante un proceso de digestión, a una temperatura de 60°C por un tiempo de 12 horas. Después se filtró cada extracto y se realizaron otras dos digestiones.

El extracto que fue obtenido en las tres digestiones se concentró al vacío en un rotaevaporador. Al finalizar este procedimiento, en caso de que todavía hubiera agua en el concentrado, se eliminó mediante una liofilización, para así obtener el extracto totalmente seco de cada planta. El material liofilizado fue protegido de la luz y guardado a 4°C (Juárez, 2007).

V. 4. 1. 1 Hidrólisis ácida de extractos acuosos

Se pesaron de 50 a 100 mg del extracto acuoso seco, agregándole 10 mL de agua; posteriormente, a esa solución, se le añaden 5 mL de HCl 6 M y se lleva a reflujo por 2 horas a 90°C.

V. 4. 2. Identificación de metabolitos secundarios por análisis HPLC

Los extractos acuosos se filtraron a través de una membrana (de filtración) de 0.2 mm y 20 µL se inyectaron por triplicado.

La cuantificación se llevó a cabo por estandarización externa, basándose en curvas estándares (Bah y col., 2008). Las condiciones cromatográficas para cuantificar flavonoides fueron: λ_{max} de 280 nm; el gradiente de la fase móvil consistió en (A) CH₃CN, (B) Ácido acético 0.0125 N 95% a un flujo de 1 mL/min.

EL gradiente se programa como sigue: 0-5 min, 95%B, 5%A; 5-20 min, 85%B, 15%A; 20-25 min 50%B, 50%A; 25-35 min, 95%B, 5%A.

V. 4. 3. Análisis de la capacidad antioxidante

V. 4. 3. 1. Poder antioxidante de reducción férrica. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Los valores FRAP serán obtenidos de acuerdo al método reportado por Firuzi y col. (2005). Brevemente, se preparó el reactivo FRAP, una mezcla de 10 mL de buffer de acetato 300 mM (pH 3.6), 1 mL de FeCl₃ 20 mM, 1 mL de TPTZ 10 mM, se disuelve en HCl 40 mM. 25 µL de cada extracto se colocaron por cuadruplicado en una microplaca de 96 pozos (Nalge Nunc International, N.Y., U.S.A. Después 175 µL de la solución FRAP recién preparada y tibia (37°C) se agregaron a tres pozos y el mismo volumen de buffer de acetato se añadió al cuarto. Se monitoreó la absorbancia a 595 nm en los tiempos 0, 4, 10, 30 y 60 min. Las absorbancias de los blancos son restadas de las absorbancias de las muestras en cada intervalo de tiempo para calcular el cambio de absorbancia. El valor de FRAP para los compuestos puros para cada intervalo de tiempo se calcula de acuerdo a la Ecuación 1, mientras que para determinar el valor de FRAP de los extractos se utiliza la curva de calibración con FeSO₄·7H₂O:

$$FRAP(M) = \left(\frac{\Delta a_t FI}{\Delta a_t Fe^{2+}} \right) \times 10^{-5} \quad (1)$$

$\Delta a_t FI$ = Es el cambio de absorbancia después del intervalo de tiempo del compuesto a evaluar.

$\Delta a_t Fe^{2+}$ = Es el cambio de absorbancia al mismo intervalo de tiempo para el sulfato de hierro a la misma concentración.

V. 4. 3. 2. Método ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto expresada como equivalentes de Trolox se basa en la habilidad de antioxidante para atrapar radicales libres. El método de Van Den Berg y col. (1999) fue adaptado para su uso en microplaca, donde se agregaron solamente 20 μ L el blanco, los controles, los estándares de Trolox y las muestras. Cada muestra se agregó por triplicado. Al término del llenado la placa se cubrió con el parafilm y con papel aluminio para protegerlo de la luz y evitar la degradación de la sustancias, se resguardó de este modo hasta la adición del ABTS^{••+}, de la cual se agregaron 230 μ L.

Con esta técnica se determinaron los porcentajes de inhibición para cada muestra; posteriormente éstos se compararon con los cambios de la absorbancia del control (solvente + ABTS^{••+}) con respecto a los cambios en la muestra. Una disminución o desaparición del color azul característico del reactivo de ABTS al reaccionar con una muestra, significó que la muestra tiene capacidad de inhibir al oxidante. Este cambio de coloración se indicó por una disminución en la absorbancia de la muestra a 734 nm en los tiempos 0 y 6 min.

El valor de ABTS para cada intervalo de tiempo se calculó de acuerdo a la Ecuación 2.

$$\% \text{ inhibición} = [(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})/\text{Abs control}] * 100 \quad (2)$$

VI. RESULTADOS

VI.1. Identificación de metabolitos secundarios por HPLC

Para la identificación de ácidos fenólicos y flavonoides por medio del HPLC se utilizó la fase móvil compuesta por un 95% de ácido acético 0.0125 N y un 5% de metanol como lo indica la metodología.

Al inicio del estudio se inyectaron los estándares de manera individual y luego la mezcla de los mismos (Cuadro 2); con esto se buscó poder comparar e identificar los posibles compuestos de los respectivos extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora*, en base a los tiempos, y posteriormente realizar las coeluciones pertinentes.

Cuadro 2. Ácidos fenólicos y flavonoides incluidos en la mezcla de estándares.

	Estándares
I	Ácido Gálico
II	Ácido Protocatéuico
III	Catequina
IV	Ácido Caféico
V	Rutina
VI	Ácido p-Cumárico
VII	Hesperidina
VIII	Ácido Rosmarínico
IX	Miricetina
X	Luteolina
XI	Quercetina
XII	Apigenina
XIII	Naringenina
XIV	Kaempferol
XV	Hesperetina

Para cada extracto acuoso se tomaron en cuenta tanto la forma sin hidrolizar de éste, como la forma hidrolizada; identificando y cuantificando (en caso de ser necesario) el ácido fenólico y/o flavonoide presente en cada uno de ellos.

VI.1. 2 Identificación de Ácidos fenólicos y flavonoides para extracto acuosos de *Portulaca oleraceae*

VI.1.2.1 Extracto acuoso no hidrolizado de *Portulaca oleraceae*

En la Figura 6 se muestra el cromatograma de la mezcla de estándares utilizados para el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *Portulaca oleraceae*, mientras que en el Cuadro 3 se muestran los ácidos fenólicos y flavonoides, con sus respectivos tiempos de retención.

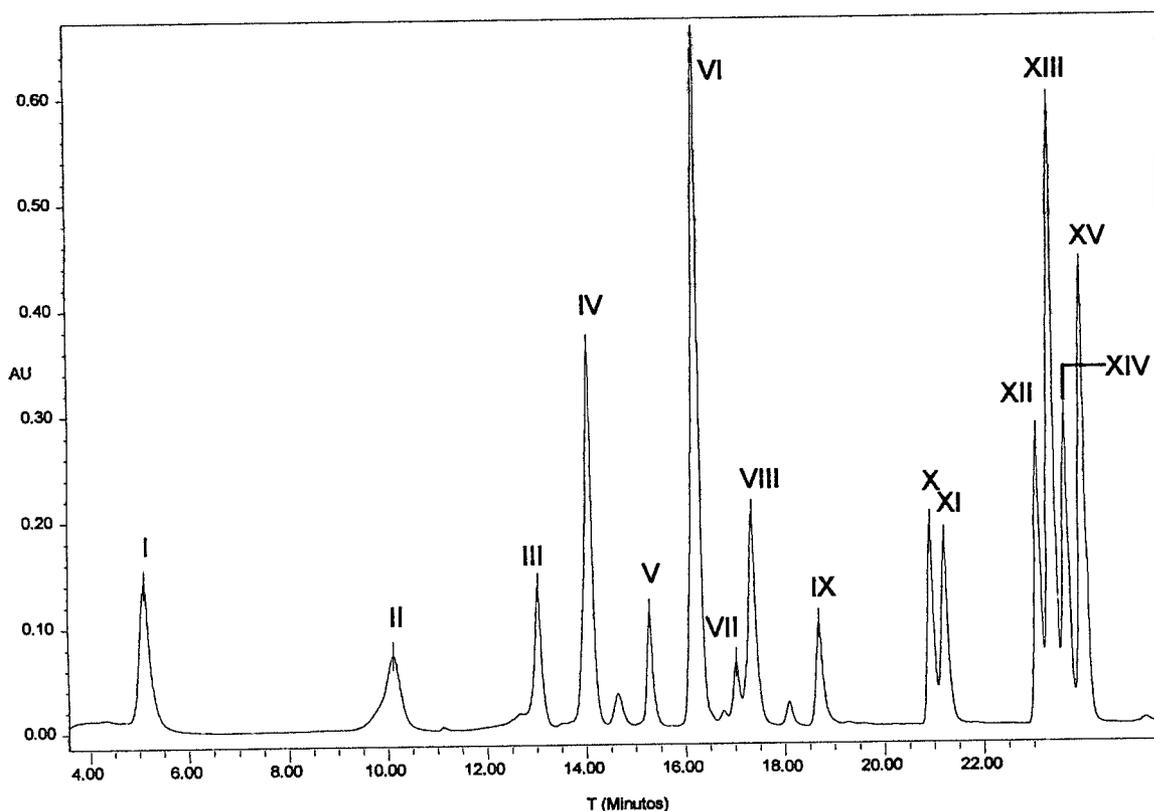


Figura 6. Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides, para el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae*.

Cuadro 3. Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae*.

No. de estándar	Tiempo de retención (min)
I	5.093
II	10.107
III	13.021
IV	14.048
V	15.273
VI	16.217
VII	17.019
VIII	17.336
IX	18.682
X	20.916
XI	21.199
XII	23.067
XIII	23.342
XIV	23.637
XV	23.974

En la Figura 7 se puede observar el cromatograma para la muestra de extracto acuoso de no hidrolizado de *P. oleraceae*.

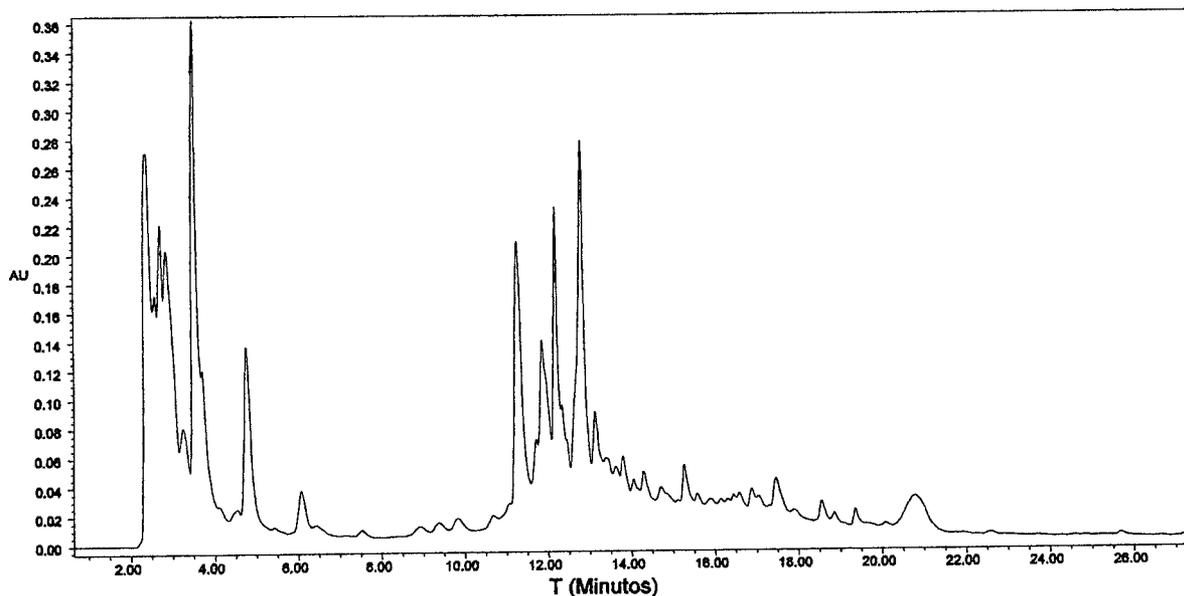


Figura 7. Cromatograma de extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae*.

Para saber que posibles ácidos fenólicos y/o flavonoides presentaba la muestra de extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae*, se traslaparon los cromatogramas de la mezcla de estándares y el de dicha muestra (Figura 8).

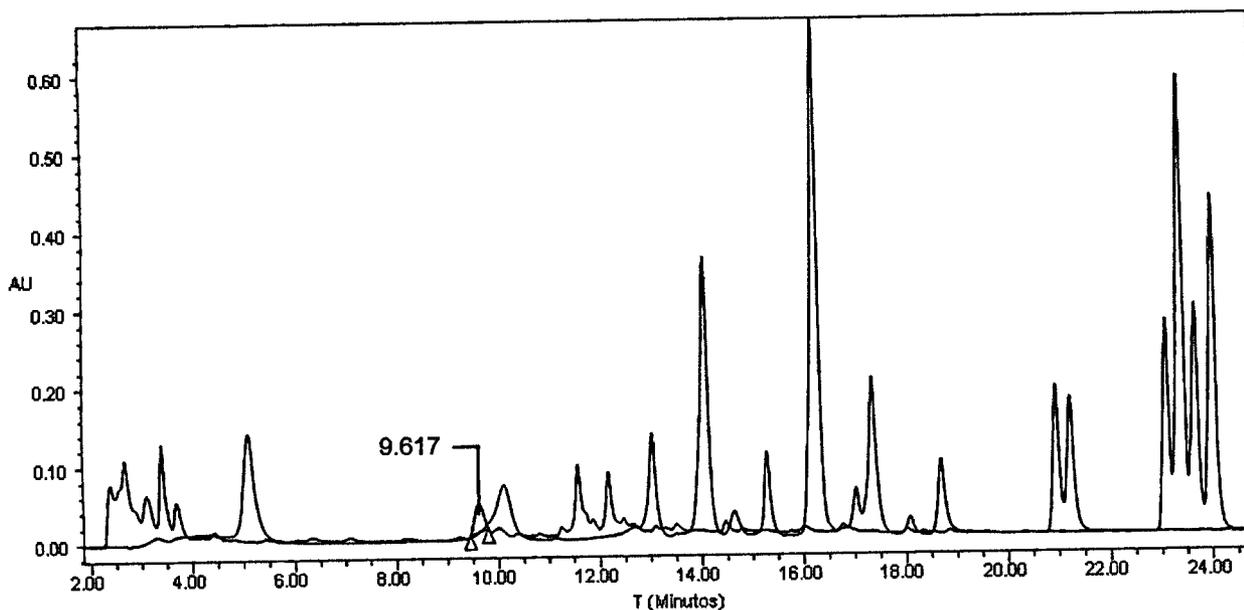


Figura 8. Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y de *P. oleraceae* sin hidrolizar (negro).

Se realizaron las coeluciones pertinentes y se obtuvo como resultado que el ácido protocatéuico está presente en el extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae* (Figura 9) en la concentración que se muestra en el Cuadro 3, obtenido a partir de la curva estándar de Bah y col. (2008).

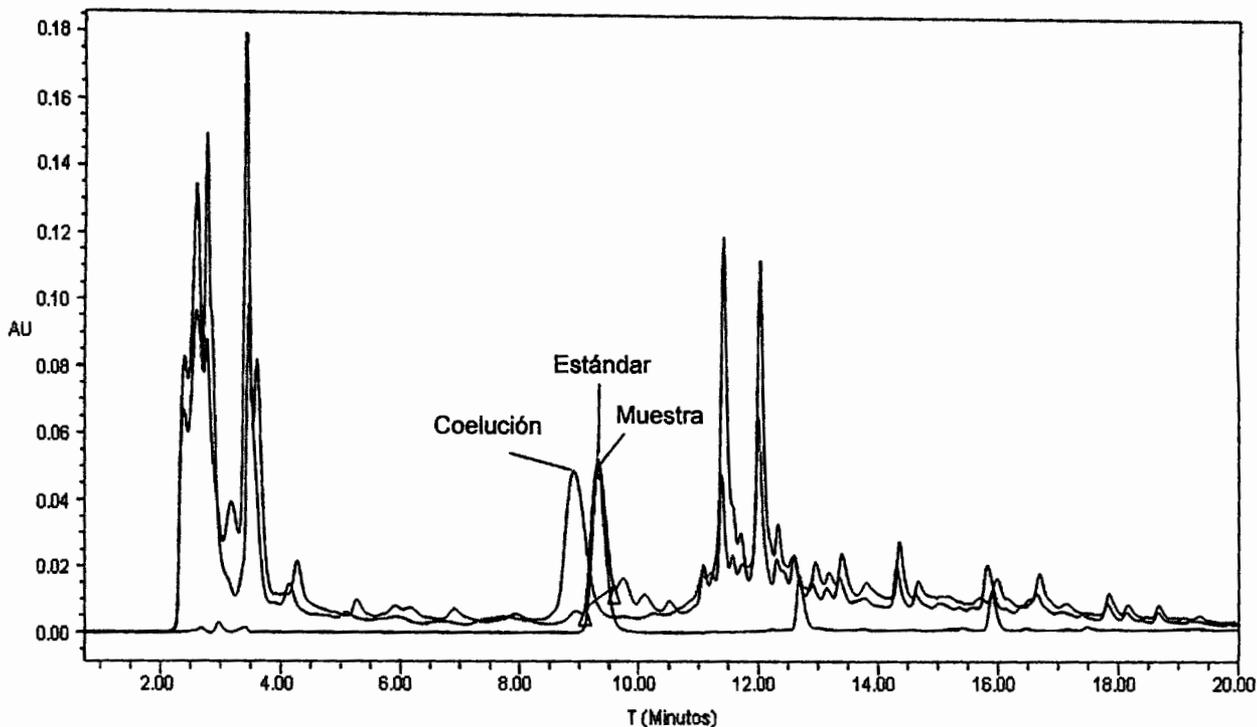


Figura 9. Cromatogramas de extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae* (negro), de ácido protocatéuico (verde) y la coelución del extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae* con el ácido protocatéuico (azul).

Cuadro 4. Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso de *P. oleraceae* sin hidrolizar.

Extracto	Estándar	µg de estándar/mg de extracto
Extracto acuoso no hidrolizado de <i>P. oleraceae</i>	Ácido Protocatéuico	33.66

VI.1.2.2 Extracto acuoso hidrolizado de *Portulaca oleraceae*

Se hidrolizó al extracto acuoso seco de *Portulaca oleraceae* como lo indica la metodología y se realizó lo mismo que con la muestra del extracto acuoso no hidrolizado de *P. oleraceae*.

Se corrió la muestra de estándares (Cuadro 5 y Figura 10) para comparar después con el cromatograma de la muestra (Figura 11) y así conocer los posibles ácidos fenólicos y flavonoides contenidos en el extracto acuoso de hidrolizado de *P. oleraceae* (Figura 12).

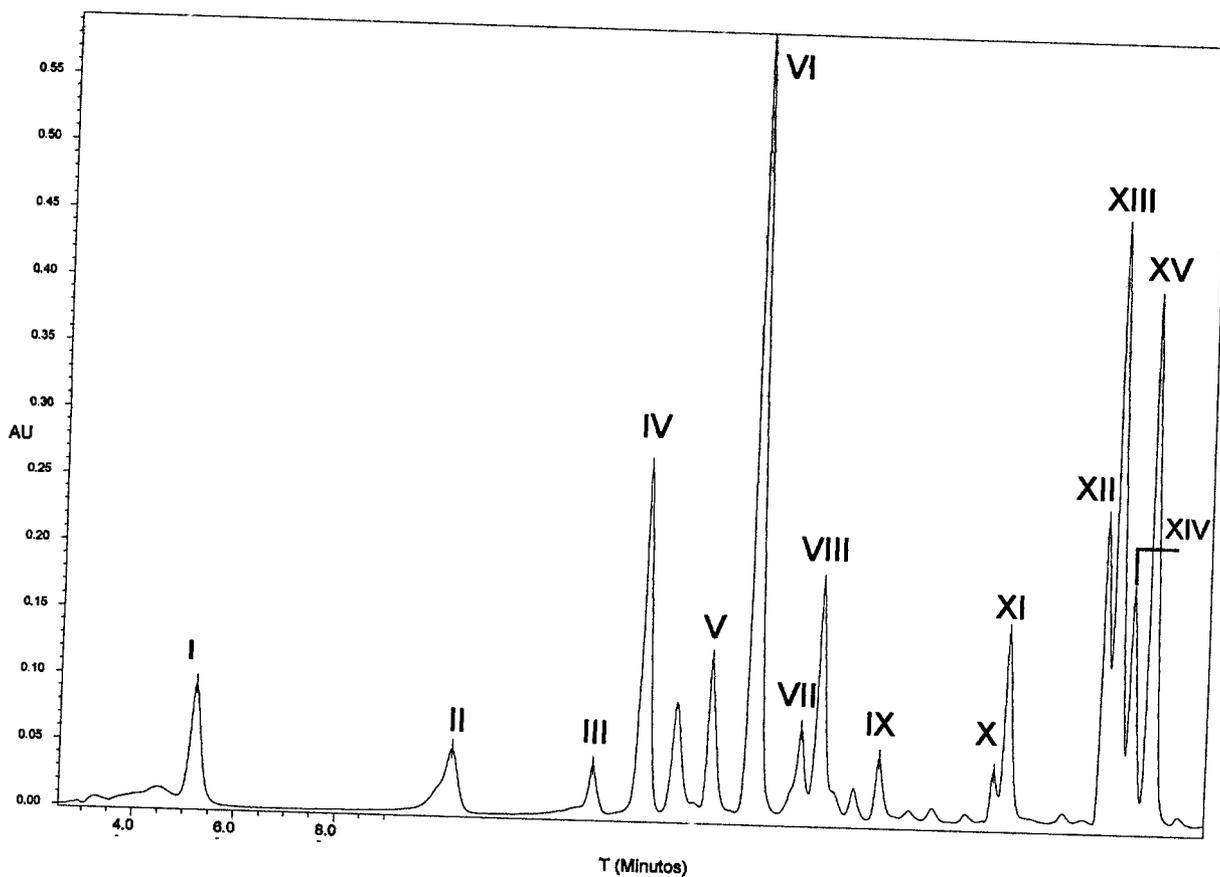


Figura 10. Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides, para el análisis del extracto acuoso hidrolizado de *P. oleraceae*.

Cuadro 5. Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso hidrolizado de *P. oleraceae*.

No. de estándar	Tiempo de retención (min)
I	5.230
II	10.309
III	13.115
IV	14.135
V	15.442
VI	16.298
VII	17.235
VIII	17.612
IX	18.790
X	21.057
XI	21.312
XII	23.202
XIII	23.440
XIV	23.746
XV	24.119

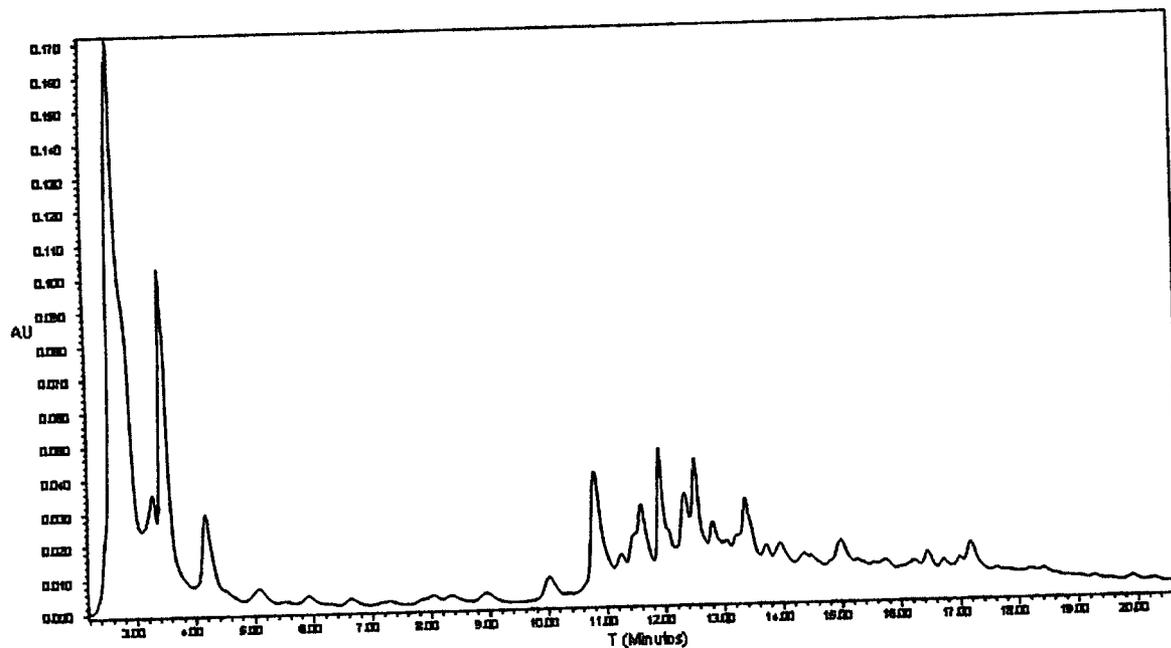


Figura 11. Cromatograma de extracto acuoso hidrolizado de *P. oleraceae*.

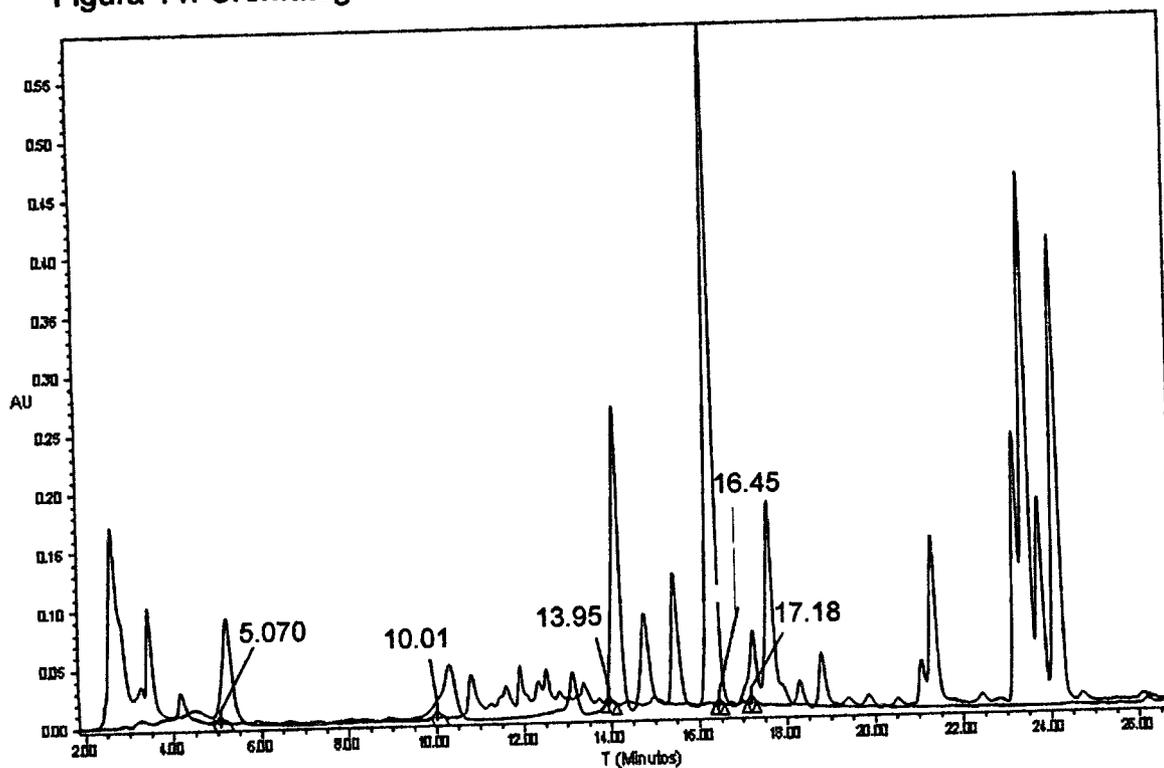


Figura 12. Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y del extracto acuoso hidrolizado de *P. oleraceae* (negro).

Se realizaron las coeluciones pertinentes y se obtuvo como resultado que el ácido protocatéuico (Figura 13) está presente en el extracto acuoso hidrolizado de *P. oleraceae* en la concentración que se muestra en el Cuadro 6, obtenida a partir de la curva estándar de Bah y col. (2008).

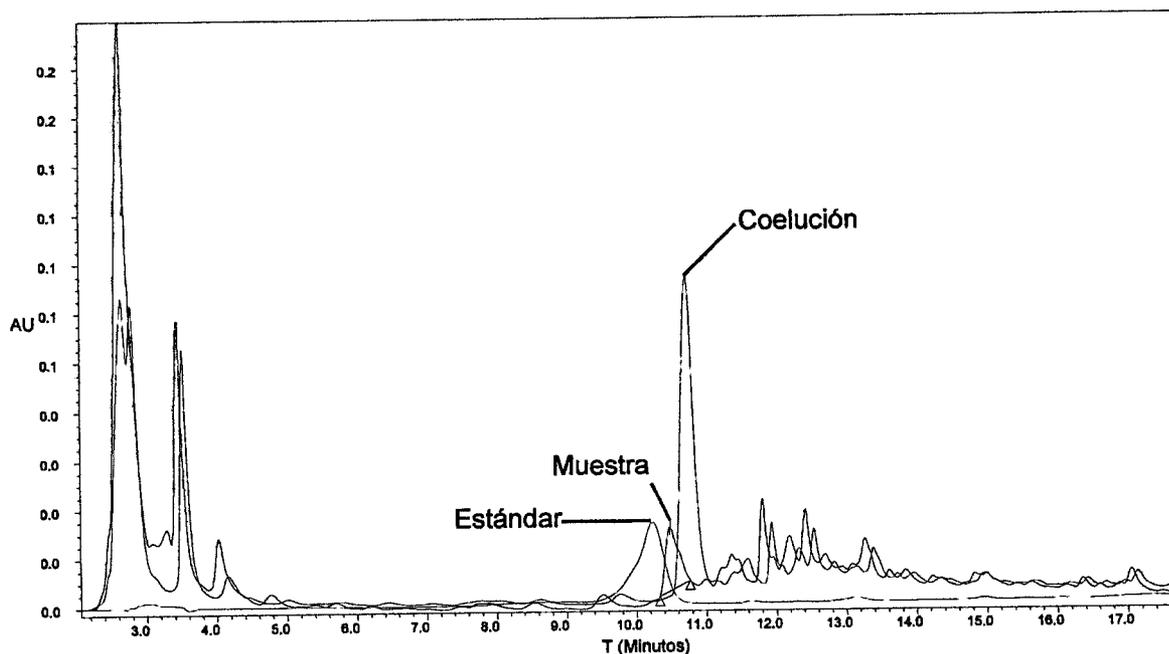


Figura 13. Cromatogramas de extracto acuoso hidrolizado de *P. oleraceae* (negro), de ácido protocatéuico (verde) y la coelución de extracto acuoso de *P. oleraceae* con el ácido protocatéuico (azul).

Cuadro 6. Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso hidrolizado de *P. oleraceae*.

Extracto	Estándar	µg de estándar/mg de extracto
Extracto acuoso hidrolizado de <i>P. oleraceae</i>	Ácido Protocatéuico	8.92

VI. 1. 3 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides para extracto acuoso de *Malva parviflora*

VI. 1. 3.1. Extracto acuoso no hidrolizado de *Malva parviflora*

En la Figura 14 y Cuadro 7 se muestran la mezcla de estándares correspondiente para el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *Malva parviflora*, con sus respectivos tiempos de retención

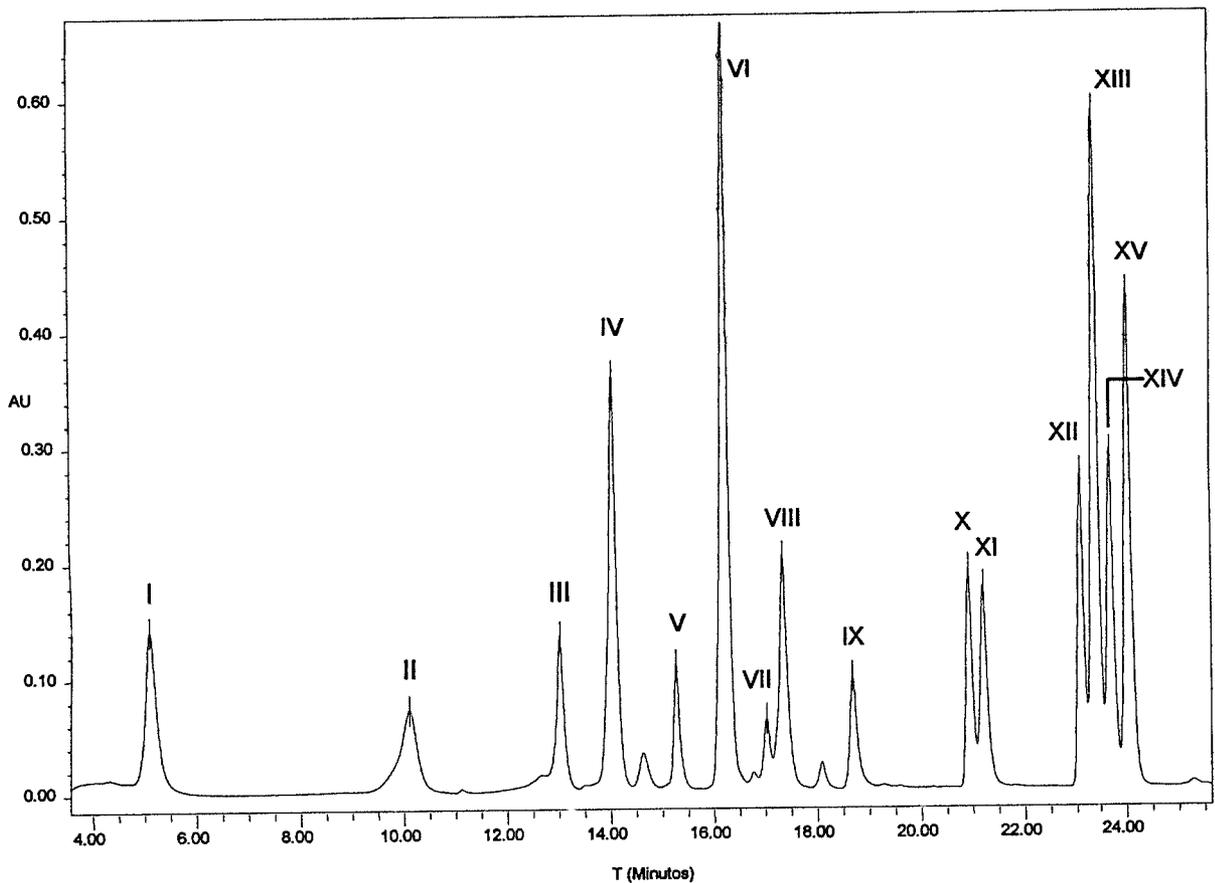


Figura 14. Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides, para el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora*.

Cuadro 7. Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora*.

No. de Estándar	Tiempo de retención (min)
I	5.093
II	10.107
III	13.021
IV	14.048
V	15.273
VI	16.217
VII	17.019
VIII	17.336
IX	18.682
X	20.916
XI	21.199
XII	23.067
XIII	23.342
XIV	23.637
XV	23.974

En la Figura 15 se muestra el perfil del extracto acuoso no hidrolizado de de la *M. parviflora*.

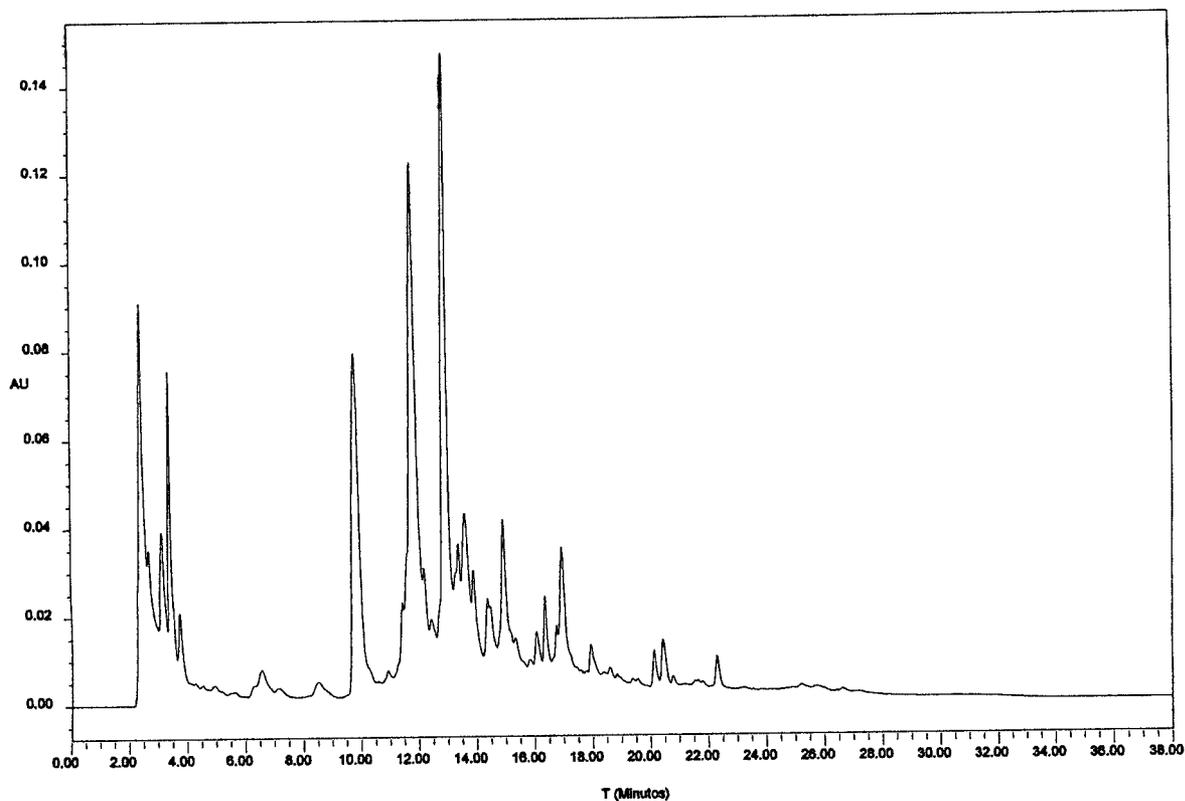


Figura 15. Cromatograma de extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora*.

Se compararon los cromatogramas de la mezcla de estándares con el del perfil del extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora* para saber que posibles ácidos fenólicos y/o flavonoides presentaba la muestra (Figura 16).

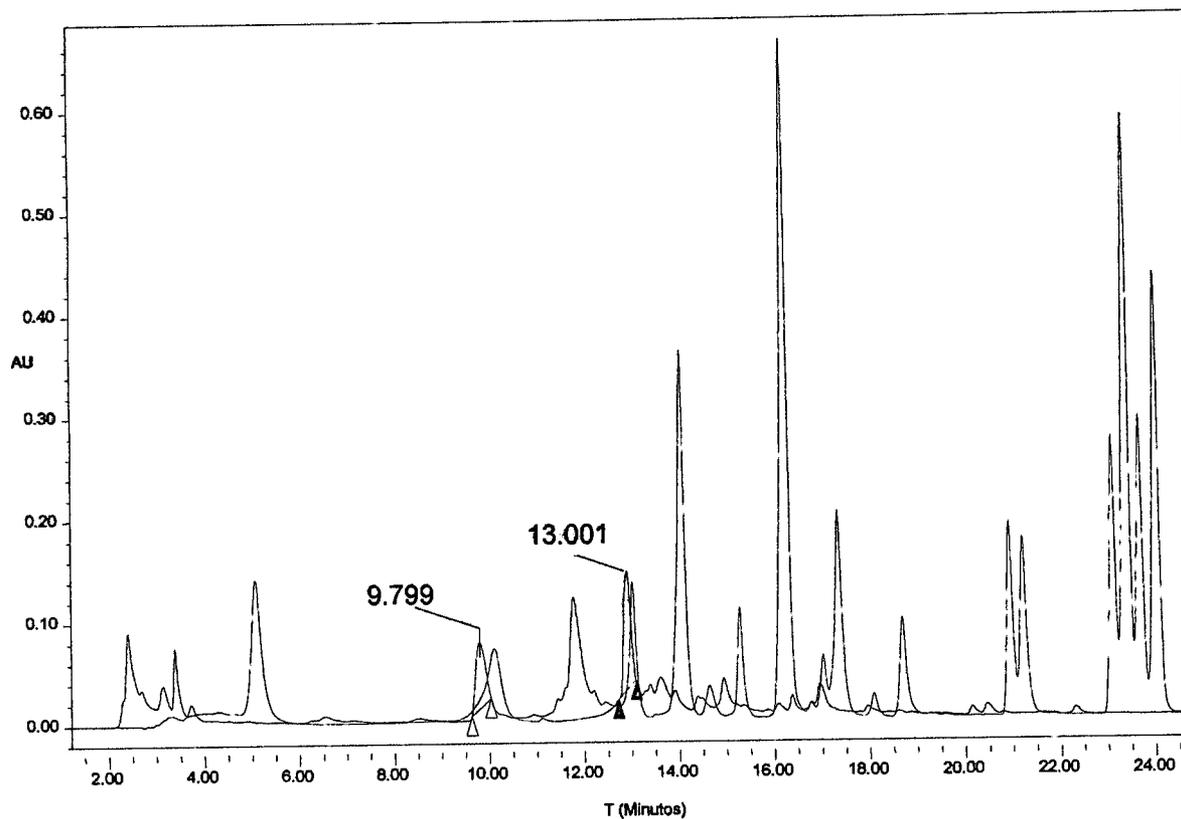


Figura 16. Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y del extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora* (negro).

Después de analizar los posibles ácidos fenólicos y flavonoides presentes en la muestra sólo se pudo identificar (Figura 17) y cuantificar uno de ellos, el ácido protocatéuico, cuya concentración se muestra en el Cuadro 8, obtenida en base a la curva estándar de Bah y col. (2008).

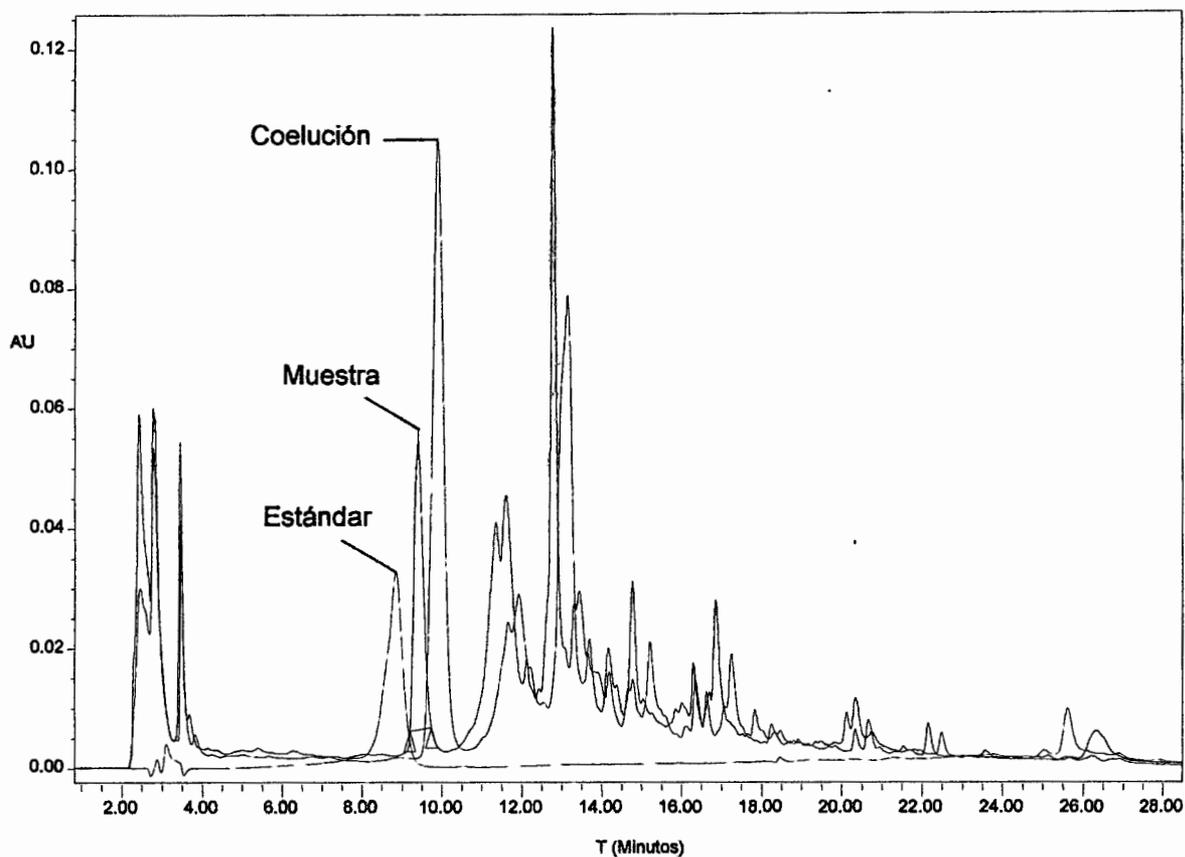


Figura 17. Cromatogramas del extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora* (negro), de ácido protocatéuico (verde) y la coelución del extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora* con el ácido protocatéuico (azul).

Cuadro 8. Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso de *M. parviflora* sin hidrolizar.

Extracto	Estándar	μg de estándar/mg de extracto
Extracto acuoso no hidrolizado de <i>M. parviflorar</i>	Ácido Protocatéuico	33.66

VI.1.3.2 Extracto acuoso hidrolizado de *Malva parviflora*

Se hidrolizó al extracto acuoso seco de *Malva parviflora* como lo indica la metodología y se realizó lo mismo que con la muestra del extracto acuoso no hidrolizado de *M. parviflora*.

Se llevó a cabo la corrida de los estándares para este extracto (Figura 18) y cuyos tiempos se pueden observar en el Cuadro 9, posteriormente se hizo la comparación con el perfil de la muestra del extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora* (Figura 19), con la de los estándares y así identificar los posibles componentes (Figura 20), obteniendo como resultado de la coelución (Figura 21) la identificación del ácido protocatéuico, cuya concentración, obtenida a partir de la curva estándar de Bah y col. (2008), se muestra en el Cuadro 10.

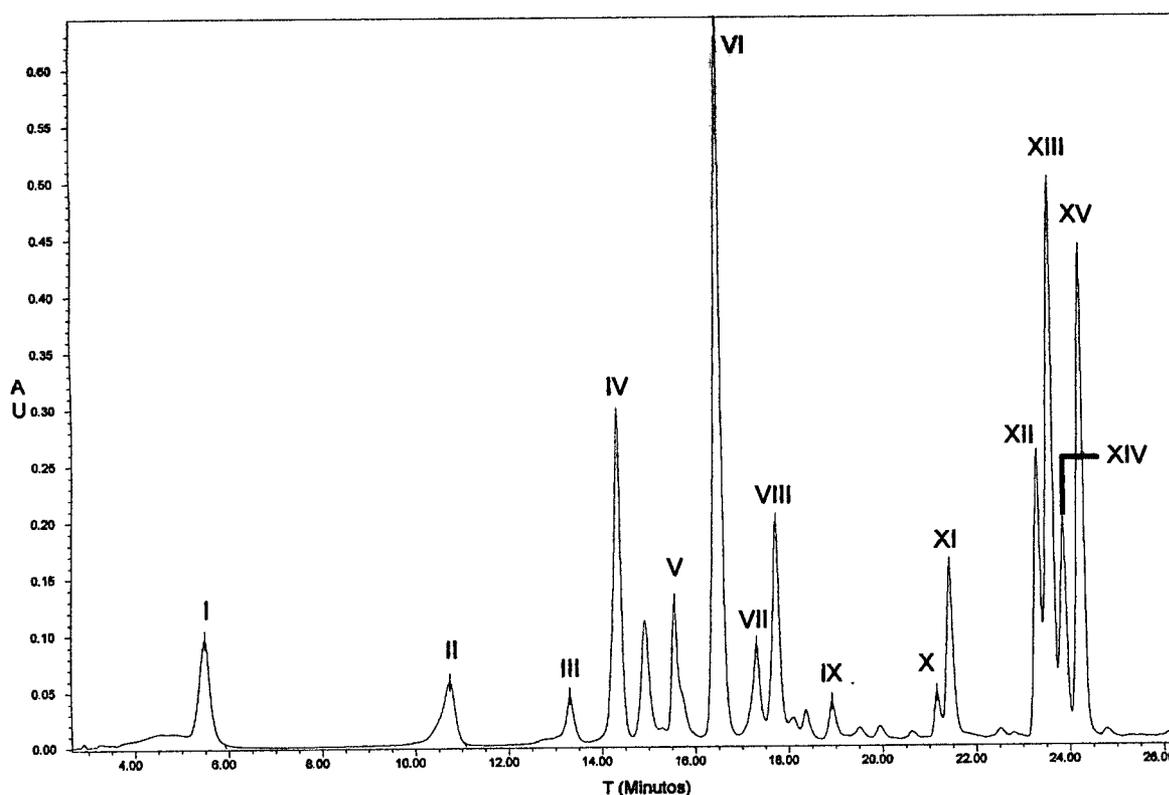


Figura 18. Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides, para el análisis del extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora*.

Cuadro 9. Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora*.

No. de Estándar	Tiempo de retención (min)
I	5.481
II	10.729
III	13.3
IV	14.321
V	16.466
VI	17.301
VII	17.711
VIII	18.909
IX	21.145
X	21.413
XI	23.277
XII	23.534
XIII	23.4834
XIV	24.187
XV	25.481

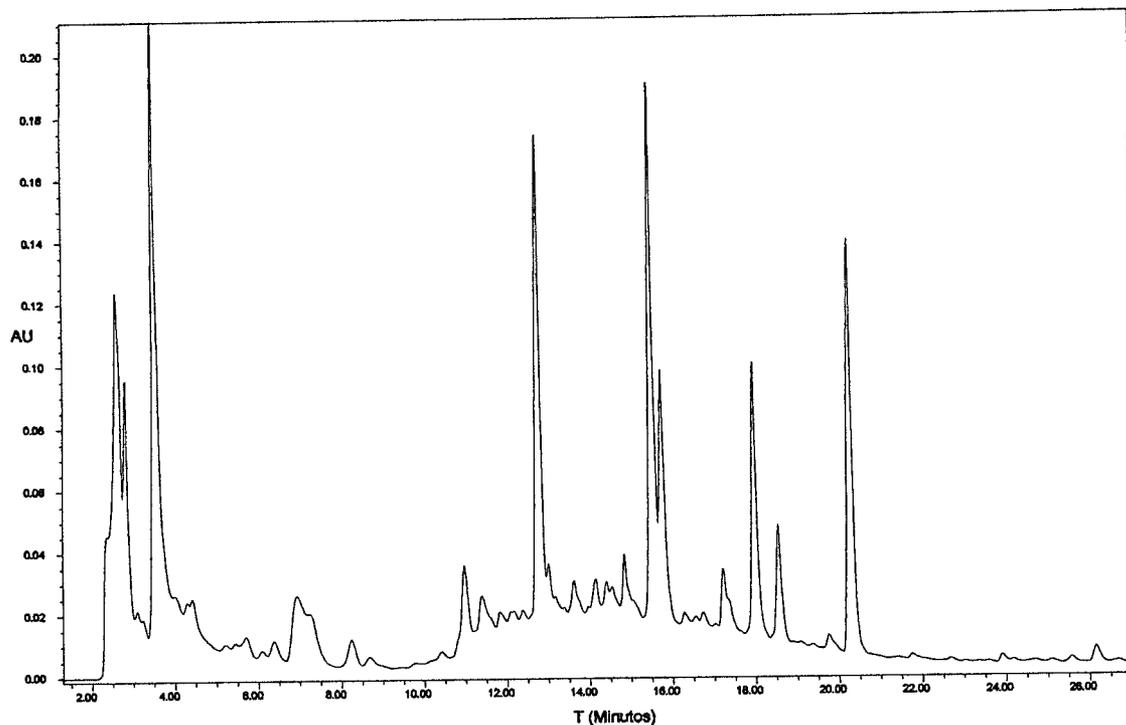


Figura 19. Cromatograma de extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora*.

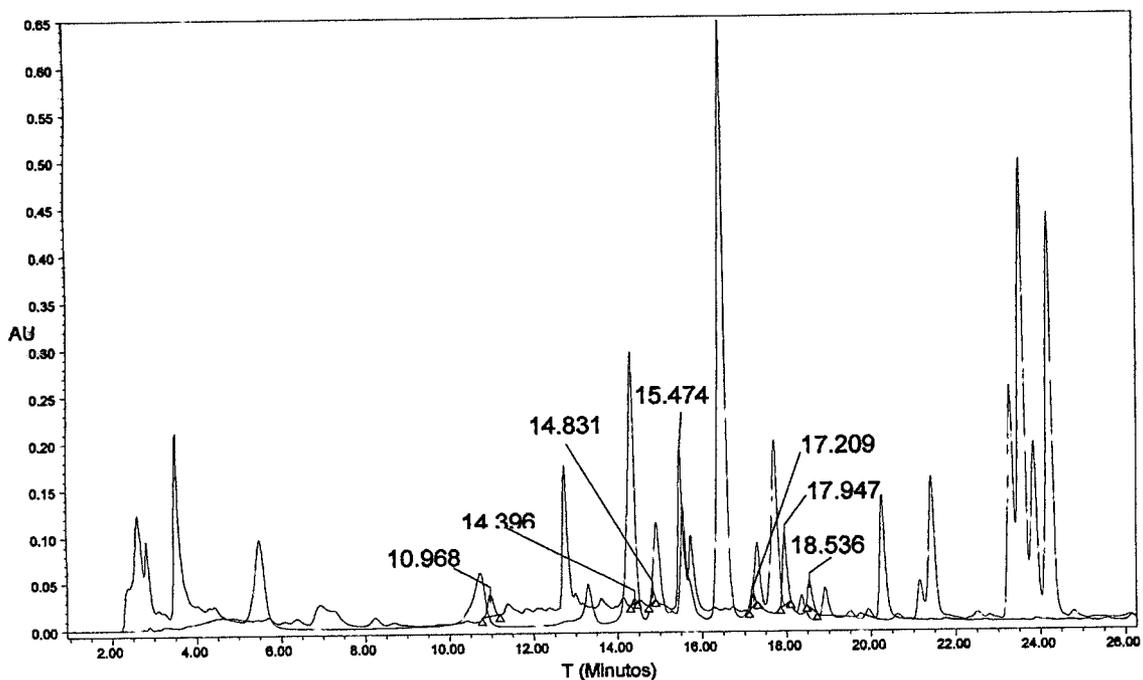


Figura 20. Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y del extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora* (negro).

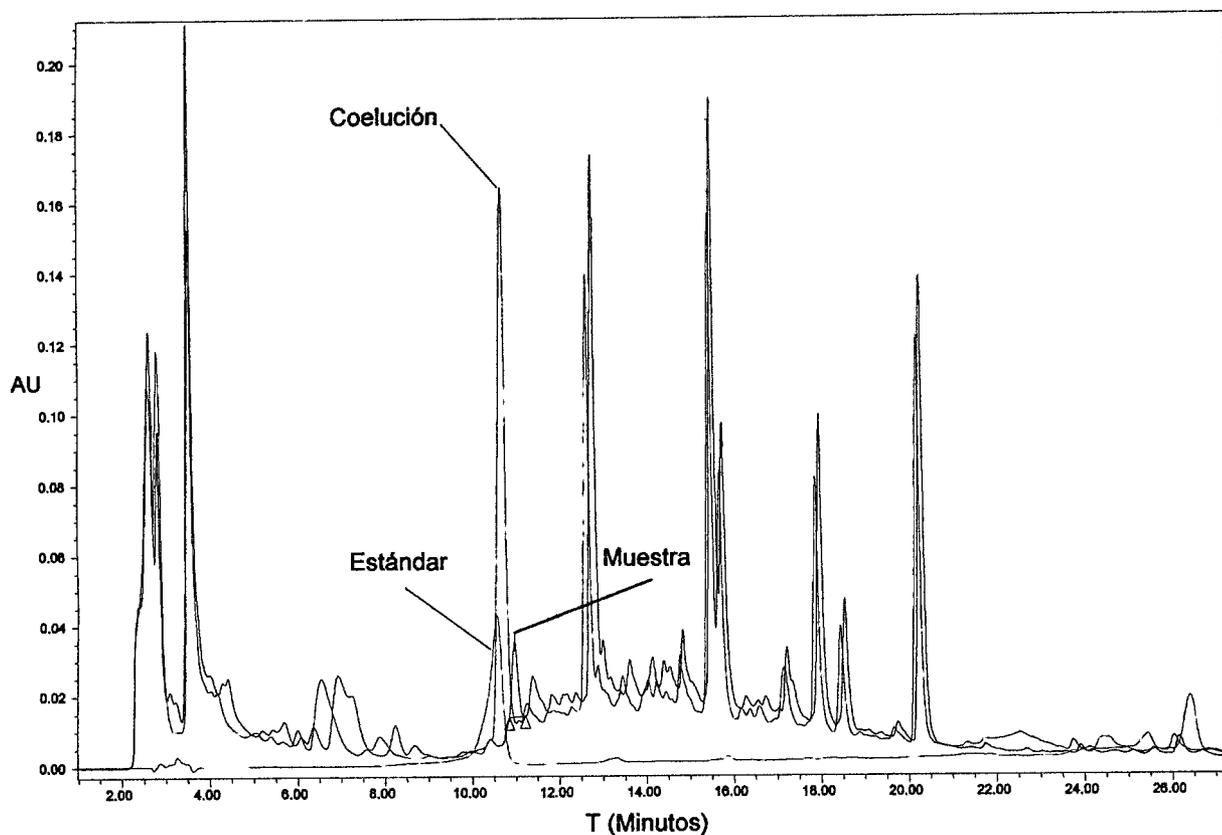


Figura 21. Cromatogramas de extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora* (negro), del estándar ácido protocatéuico (verde) y la coelución del extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora* con el Ácido protocatéuico (azul).

Cuadro 10. Concentración de ácido protocatéuico en el extracto acuoso hidrolizado de *M. parviflora*.

Extracto	Estándar	μg de estándar/mg de extracto
Extracto acuoso hidrolizado de <i>M. parviflora</i>	Ácido Protocatéuico	9.29

VI.1.4 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides para extracto acuoso de *Chenopodium murale*

VI. 1. 4. 1 Extracto acuoso no hidrolizado de *Chenopodium murale*

Se llevó a cabo el análisis de los estándares para el correspondiente extracto como se muestra en la Figura 22, y los tiempos de retención para dicho extracto se pueden observar en el Cuadro 11.

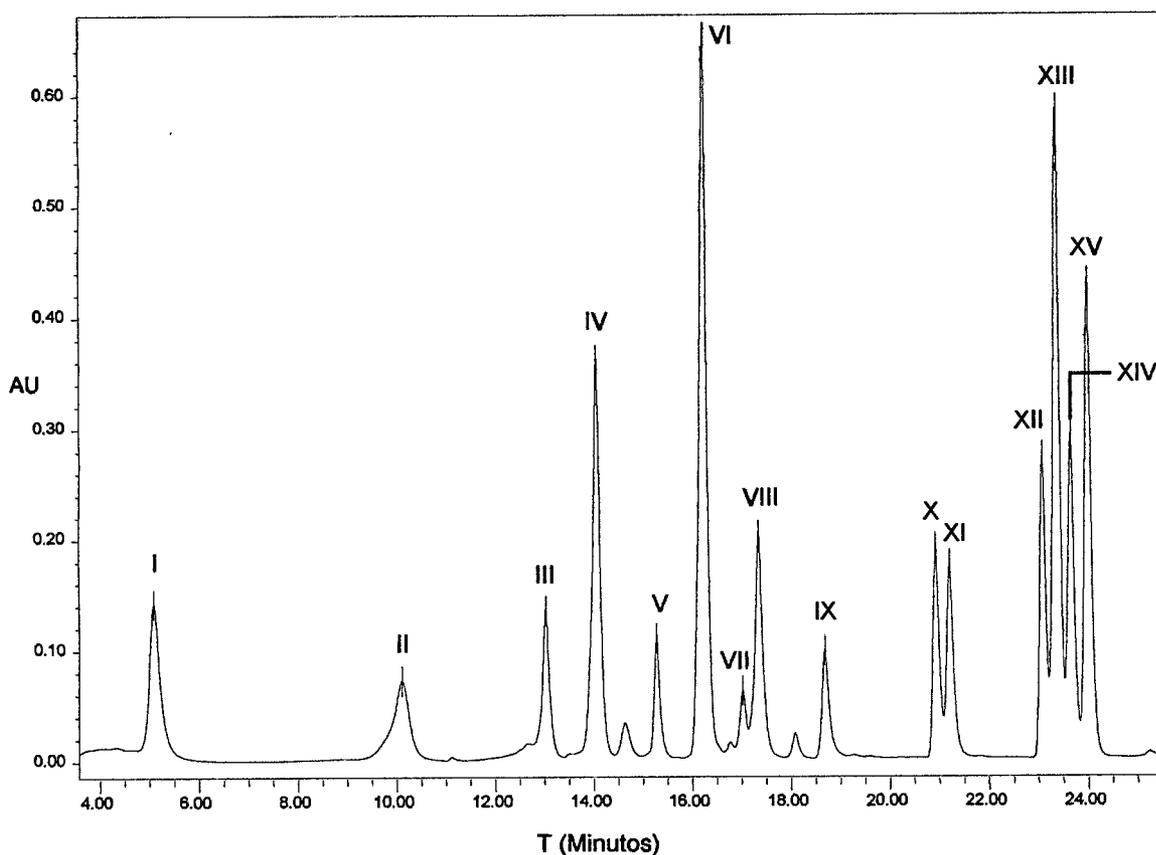


Figura 22. Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides, para el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale*.

Cuadro 11. Tiempos de retención para Ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale*.

No. de Estándar	Tiempo de retención (min)
I	5.093
II	10.107
III	13.021
IV	14.048
V	15.273
VI	16.217
VII	17.019
VIII	17.336
IX	18.682
X	20.916
XI	21.199
XII	23.067
XIII	23.342
XIV	23.637
XV	23.974

Después se realizó el análisis para extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale*, como se muestra en la Figura 23.

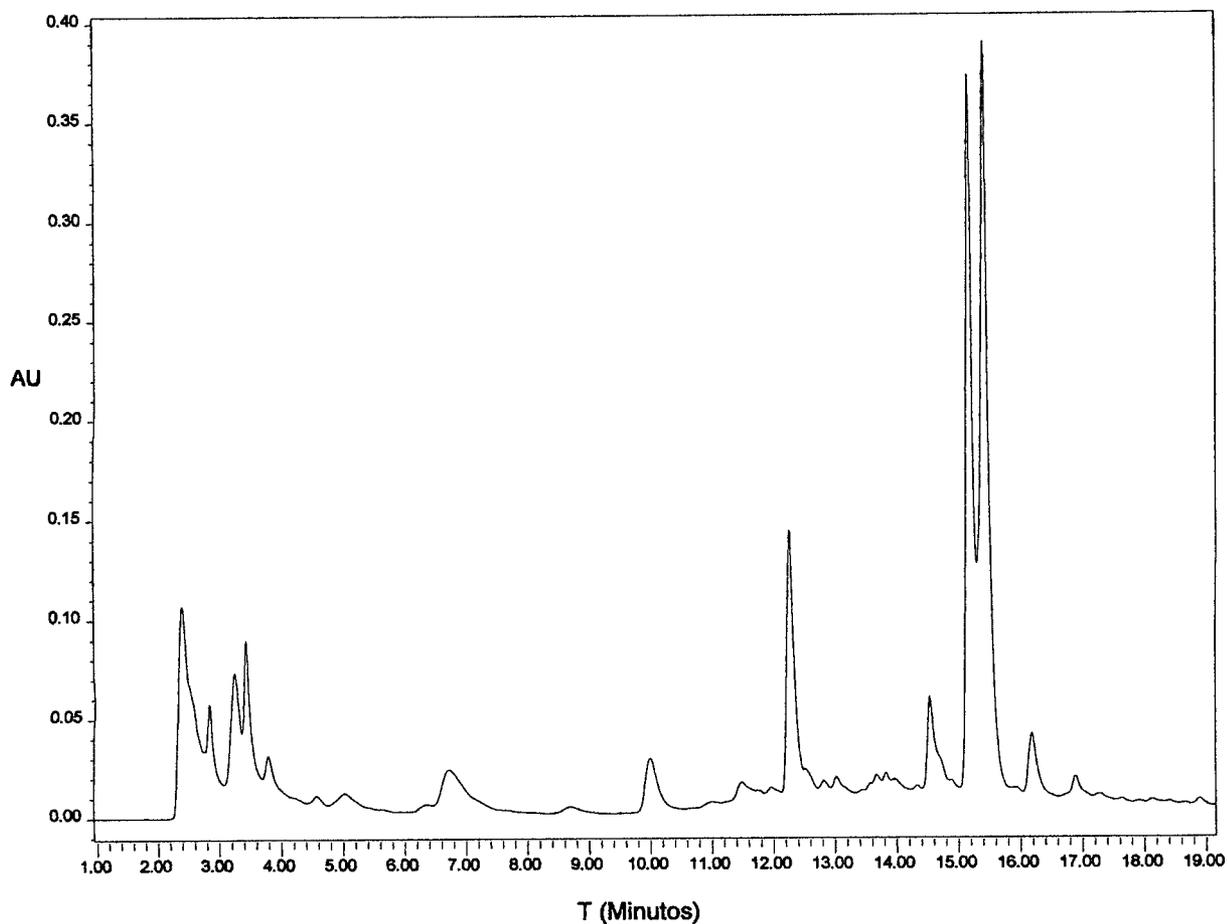


Figura 23. Cromatograma del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale*

Se realizó la comparación entre la mezcla de los estándares con el cromatograma del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale* para poder identificar los posibles componentes que se encontraban en dicho extracto (Figura 24).

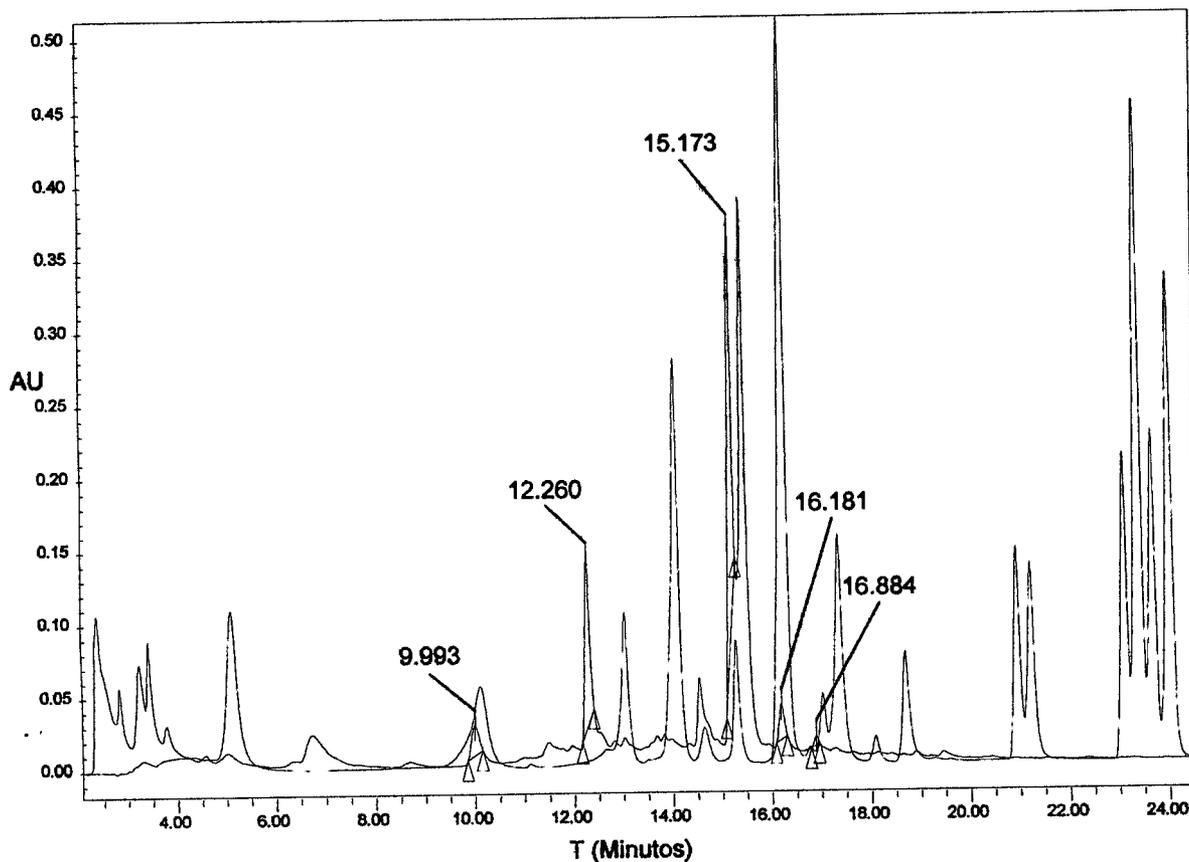


Figura 24. Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale* (negro).

Se realizaron las coeluciones, obteniéndose como resultado la identificación del ácido protocatéuico y la rutina, ésta última en mayor cantidad (Figura 25 y Cuadro 12). Las concentraciones de los estándares se obtuvieron a partir de las curvas estándares de Bah y col. (2008).

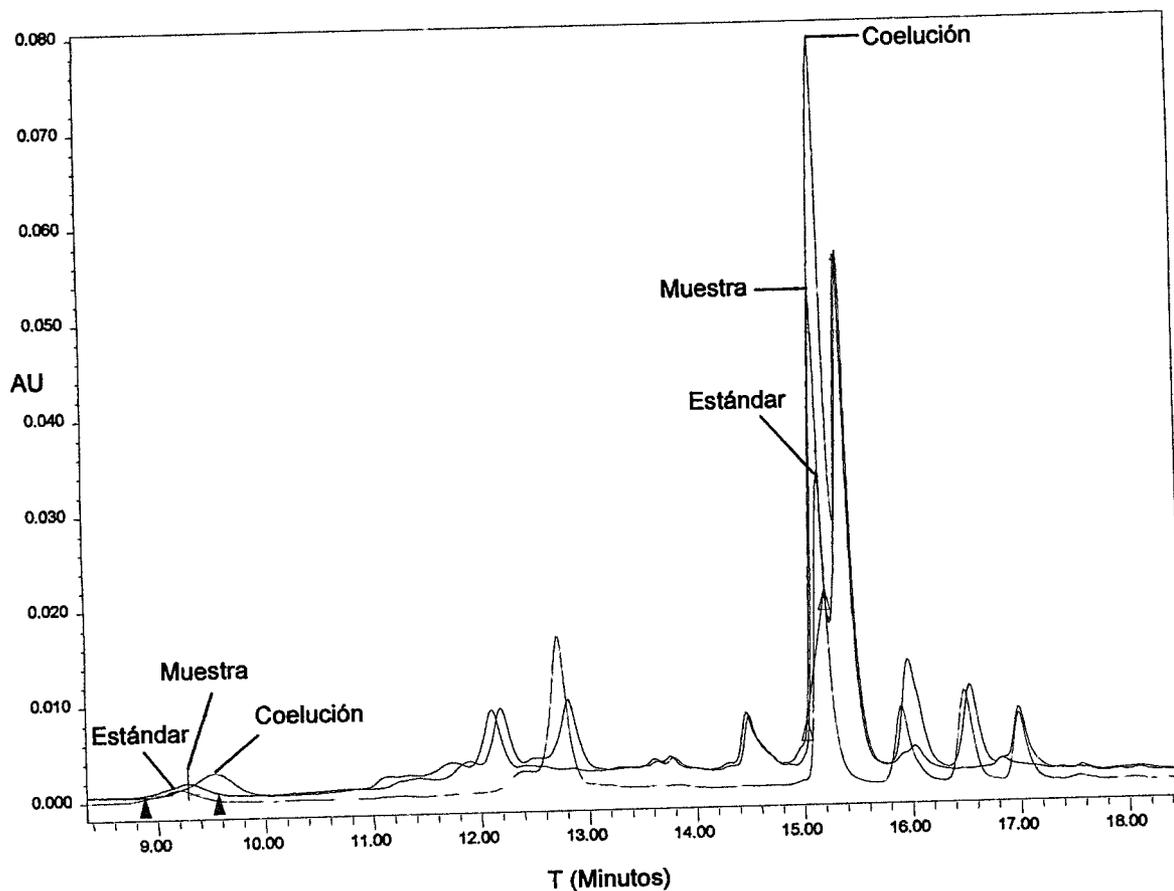


Figura 25. Cromatogramas del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale* (negro), de ácido protocatécúico (verde) y la coelución del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale* con el ácido protocatécúico y rutina (azul).

Cuadro 12. Concentración de ácido protocatécúico en el extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale*.

Extracto	Estándar	μg de estándar/mg de extracto
Extracto acuoso no hidrolizado de <i>C. murale</i>	Ácido Protocatécúico	20.810
	Rutina	25.32

VI.1.4.2 Extracto acuoso hidrolizado de *Chenopodium murale*

Se hidrolizó al extracto acuoso seco de *Chenopodium murale* como lo indica la metodología y se realizó lo mismo que con la muestra del extracto acuoso no hidrolizado de *C. murale*.

La mezcla de estándares correspondiente a este análisis (Figura 26) se corrió obteniendo los tiempos de retención que se muestran en el Cuadro 13.

Al igual que los demás extractos se realizó el perfil de la muestra del extracto acuoso hidrolizado de *C. murale* (Figura 27), se comparó con los estándares específicos, identificando cada uno de los posibles componentes encontrados en la muestra (Figura 28), sin embargo esta vez las coeluciones no dieron ningún resultado, como se puede observar en la Figura 29.

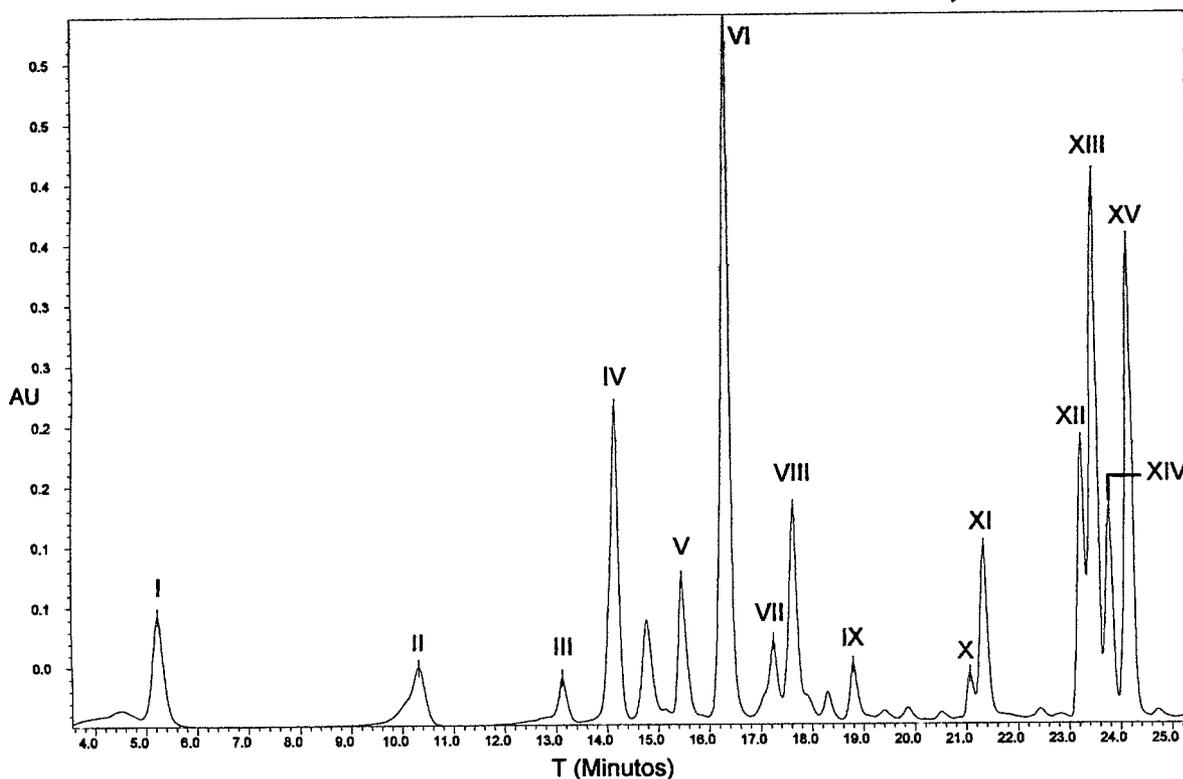


Figura 26. Cromatograma de mezcla de ácidos fenólicos y flavonoides, para el análisis del extracto acuoso hidrolizado de *C. murale*.

Cuadro 13. Tiempos de retención para ácidos fenólicos y flavonoides en el análisis del extracto acuoso hidrolizado de *C. murale*.

No. de Estándar	Tiempo de retención (min)
I	5.230
II	10.309
III	13.115
IV	14.135
V	15.442
VI	16.298
VII	17.235
VIII	17.612
IX	18.790
X	21.057
XI	21.312
XII	23.202
XIII	23.440
XIV	23.746
XV	24.119

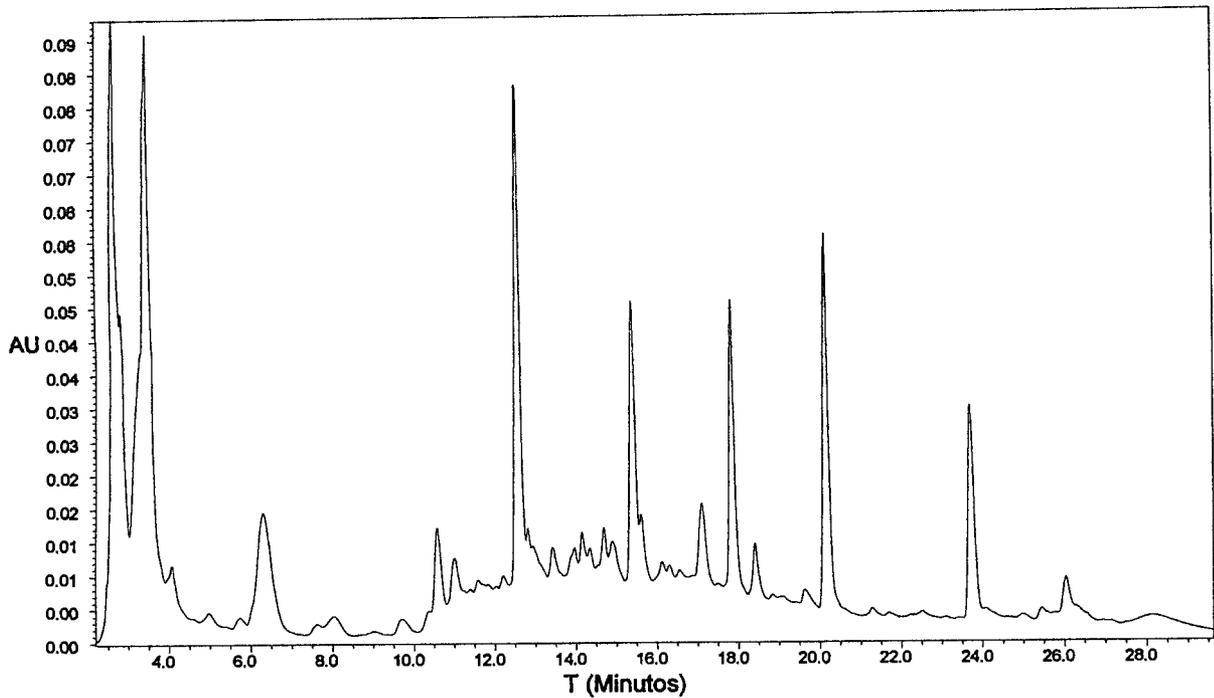


Figura 27. Cromatograma de extracto acuoso hidrolizado de *C. murale*.

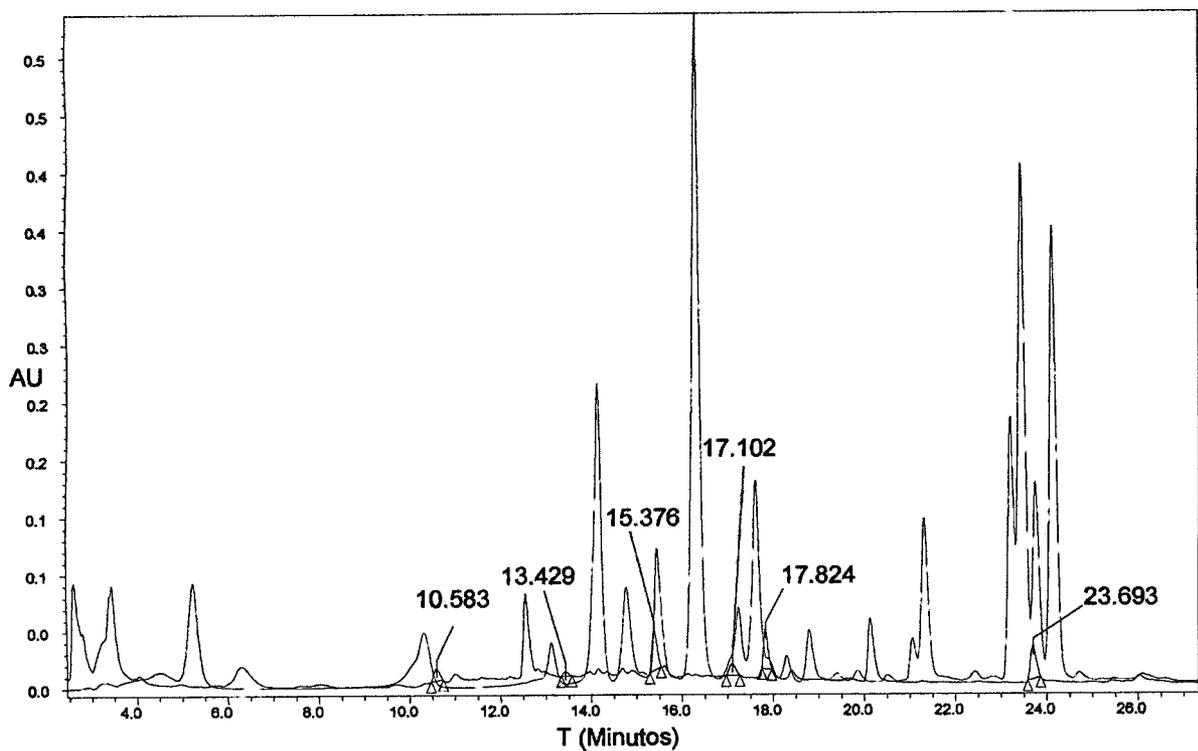


Figura 28. Cromatogramas de mezcla de estándares (azul) y del extracto acuoso hidrolizado de *C. murale* (negro).

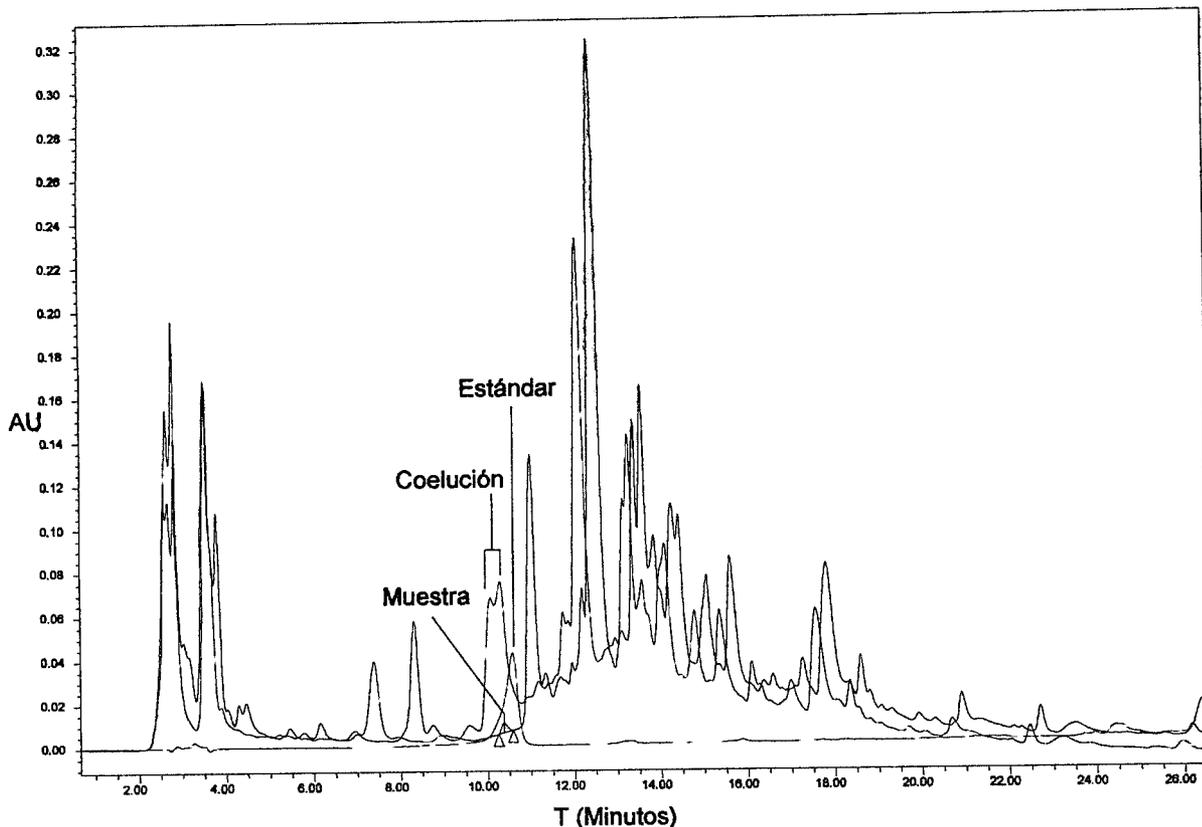


Figura 29. Cromatogramas de extracto acuoso hidrolizado de *C. murale* (negro), de ácido protocatéuico (verde) y la coelución del extracto acuoso hidrolizado de *C. murale* con el ácido protocatéuico (azul).

VI. 2. Ensayo FRAP

Se realizó el ensayo ferric reducing antioxidant power (FRAP), utilizando como solución patrón $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en el Cuadro 14 y la Figura 30 se muestran los cambios de absorbancia para las lecturas del blanco y la solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a $100 \mu\text{M}$.

Se observa que la solución patrón alcanza 4 min su máxima absorbancia y se mantiene relativamente constante durante todo el tiempo del ensayo.

Cuadro 14. Lecturas y solución patrón de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($100 \mu\text{M}$).

T (min)	Blanco	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($100 \mu\text{M}$)
0	0.0081 ± 0.0020	0.17496 ± 0.0020
4	0.0103 ± 0.0054	0.19033 ± 0.006
10	0.0142 ± 0.0082	0.1909 ± 0.003
30	0.0183 ± 0.0023	0.19044 ± 0.004
60	0.0193 ± 0.0067	0.190543 ± 0.0053

Los valores representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

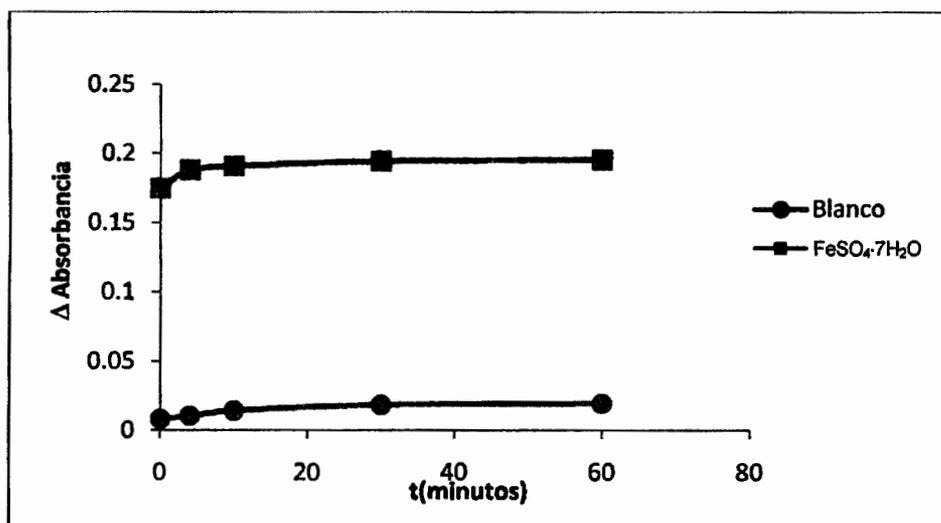


Figura 30. Gráfica de cambio de absorbancia del blanco y solución patrón de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($100 \mu\text{M}$).

En el Cuadro 15 se indican los cambios de absorbancia de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a diferentes concentraciones, tanto a los 4 como a los 30 minutos de haberse iniciado el ensayo y se representan en la Figura 31.

Cuadro 15. Cambio de absorbancia con respecto a la concentración a los 4 y 30 min de haber empezado la reacción de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

μM	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 4 min	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 30 min
0	0.01033 \pm 0.0006	0.01833 \pm 0.0015
100	0.18803 \pm 0.0172	0.19443 \pm 0.0193
600	1.00526 \pm 0.1025	1.02186 \pm 0.0091
1000	1.6249 \pm 0.0134	1.6279 \pm 0.0090
1600	2.38906 \pm 0.0268	2.4268 \pm 0.0091
2000	3.02016 \pm 0.0029	3.02316 \pm 0.0280
2600	3.51493 \pm 0.1134	3.51793 \pm 0.0334
3000	3.95346 \pm 0.0293	3.95646 \pm 0.0102

Los valores representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

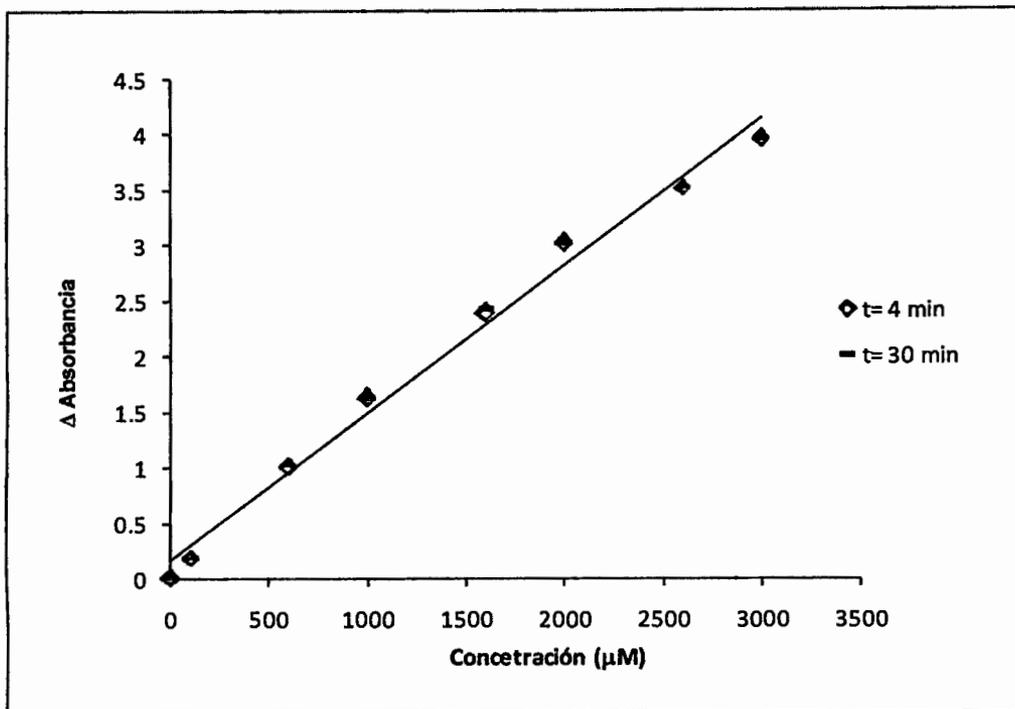


Figura 31. Gráfica que representa el cambio de absorción con respecto a la concentración a los 4 y 30 minutos para la solución de FeSO₄·7H₂O.

El Cuadro 16 muestra la regresión final, la pendiente, la ordenada al origen y la linealidad de la curva de FeSO₄·7H₂O a los 4 y 30 minutos de haber empezado en ensayo.

Cuadro 16. Regresión lineal FeSO₄·7H₂O a los 4 y 30 minutos.

	4 minutos			30 minutos		
	a	m	r ²	a	m	r ²
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1583	0.0013	0.9903	0.1704	0.0013	0.9897

a= ordenada al origen, m= pendiente y r² = linealidad. Los valores representan la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

En base a la curva del estándar ($\mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se graficaron (como lo muestra la Figura 32) los extractos acuosos con una concentración de 100 mg/mL de *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora* a los distintos tiempos de ensayo.

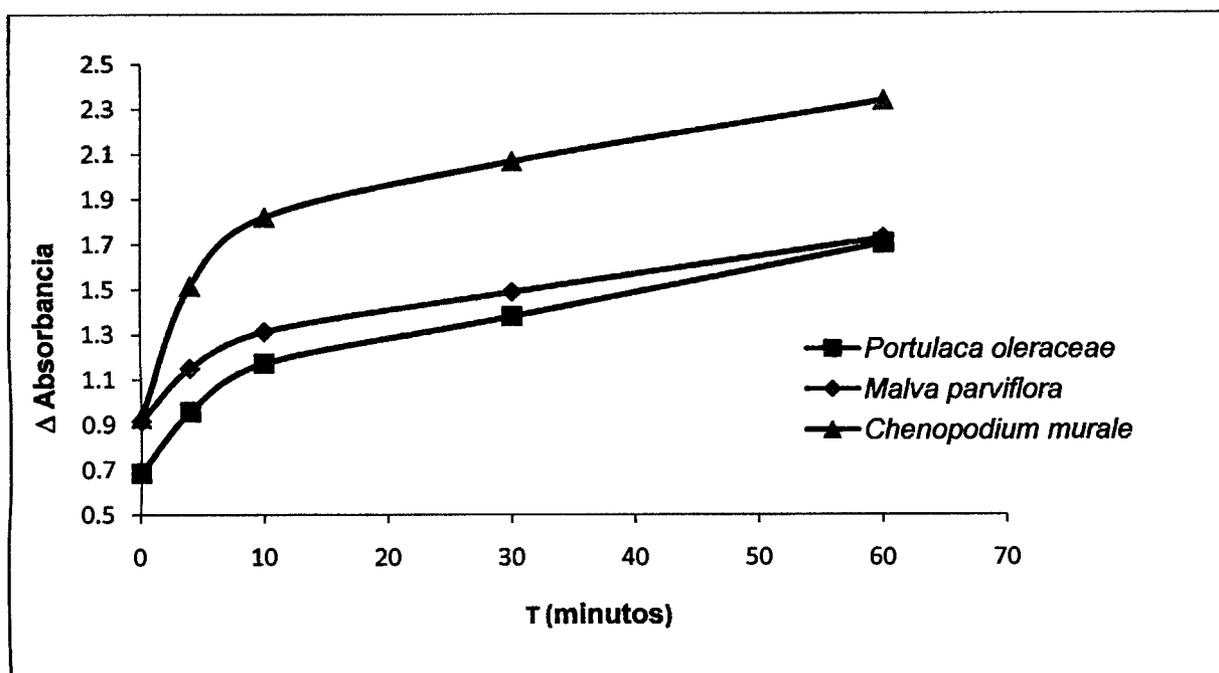


Figura 32. Cambio de absorbancia con respecto al tiempo de los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *C. murale* y *M. parviflora*. (100 mg/mL).

En el Cuadro 17 y representándose en las Figuras 33 y 34, se indican los cambios de absorbancia para los extractos acuosos de interés: *P. oleraceae*, *C. murale* y *M. parviflora*, tomando en cuenta tres concentraciones diferentes, a los tiempos de 4 y 30 minutos.

Cuadro 17. Cambio de absorbancia de los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *C. murale* y *M. parviflora* a los 4 y 30 minutos.

	ΔAbs 4 minutos		
mg/mL	<i>P. oleraceae</i>	<i>M. parviflora</i>	<i>C. murale</i>
10	0.175± 0.03	0.33±0.021	0.46±0.009
50	0.228±0.05	1.102±0.03	1.389±0.023
100	0.957±0.042	1.150±0.02	1.5156±0.03
	ΔAbs 30 minutos		
mg/mL	<i>P. oleraceae</i>	<i>M. parviflora</i>	<i>C. murale</i>
10	0.332±0.044	0.490±0.04	0.706±0.023
50	0.288±0.011	1.490±.02	1.928±0.04
100	1.3813±0.05	1.544±0.05	2.067±0.056

Los valores representan la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

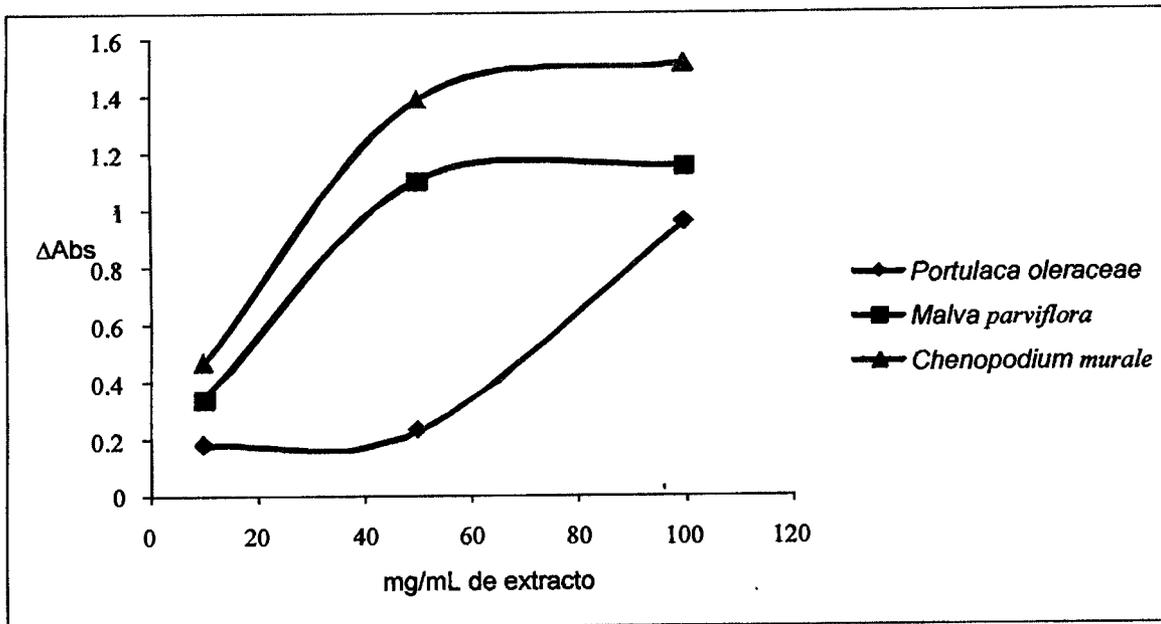


Figura 33. Gráfica que representa el cambio de absorbancia con respecto a la concentración de los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *C. murale* y *M. parviflora* a los 4 minutos.

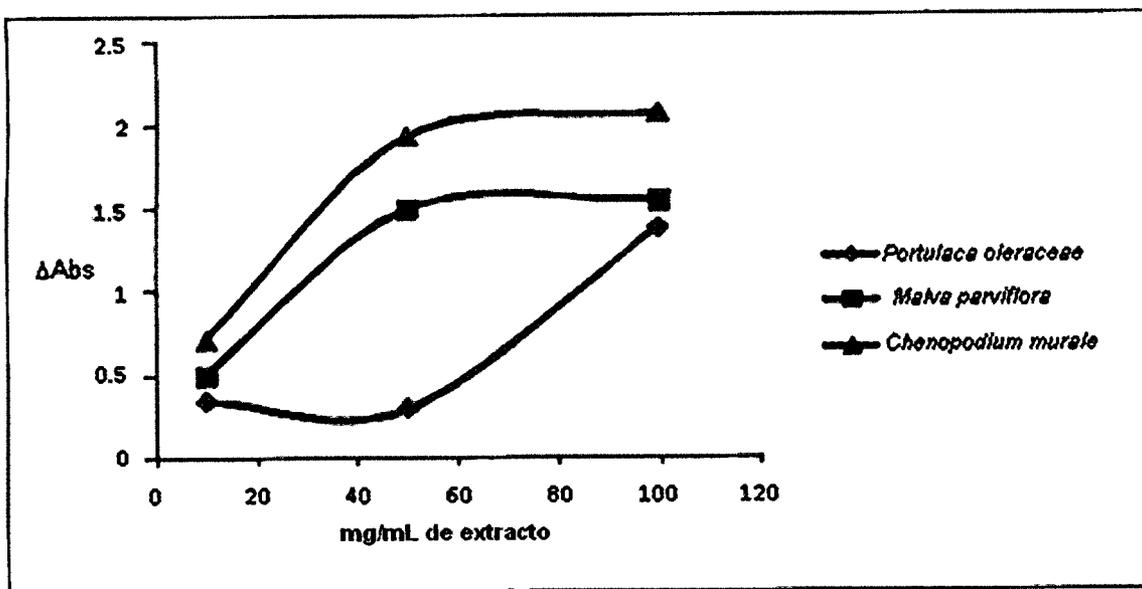


Figura 34. Gráfica que representa el cambio de absorbancia con respecto a la concentración de los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *C. murale* y *M. parviflora* a los 30 minutos.

Utilizando la curva del estándar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a los 4 y 30 minutos, se calculó la concentración equivalente para los extractos acuosos de interés: *P. oleraceae*, *C. murale* y *M. parviflora*, tomando en cuenta tres concentraciones diferentes, mostrándose los resultados en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Equivalentes de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para los extractos acuosos a los tiempos de 4 y 30 minutos.

μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /4 minutos			
mg/mL	<i>P. oleraceae</i>	<i>M. parviflora</i>	<i>C. murale</i>
10	3.769±2.1	129.794±0.9	227.487±2.9
50	44.974±3.2	717.076±1.2	937.384±3.5
100	605.615±3.5	754.153±1.2	1034.769±3.2
μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /30 minutos			
mg/mL	<i>P. oleraceae</i>	<i>M. parviflora</i>	<i>C. murale</i>
10	90.461±1.9	246.564±1	412.307±2.5
50	124.641±3.4	1015.61±1.5	1352.513±3.2
100	931.512±2.8	1056.72±1.2	1459.179±3

Los valores representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

En el Cuadro 19 se reporta el valor del FRAP siguiendo la metodología propuesta por Beinsie y Strain, utilizando la curva del $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{mol/g}$ extracto).

Cuadro 19. Valor calculado de FRAP en unidades $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de los extractos acuosos.

	FRAP 4 min	FRAP 30 min
Extracto acuoso	$\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g extracto}$	$\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g extracto}$
<i>P. oleraceae</i>	302.81 \pm 3.5	465.76 \pm 2.8
<i>M. parviflora</i>	377.08 \pm 1.2	528.36 \pm 1.2
<i>C. murale</i>	517.38 \pm 3.2	729.59 \pm 3.0

Los valores representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

VI. 3 Ensayo ABTS

Se realizó el ensayo ABTS utilizando como solución patrón Trolox. En el Cuadro 20 se indican los cambios de absorbancia y el porcentaje de inhibición para las distintas concentraciones de la solución estándar, mientras que en las Figuras 35 se observa la representación de los porcentajes de inhibición a los 6 minutos.

Cuadro 20. Cambio de absorbancia y porcentaje de inhibición a los 6 minutos de haber empezado el ensayo de ABTS tomando como estándar una solución de Trolox.

Trolox μM	Abs a 6 min	% de inhibición a 6 min
50	0.617 \pm 0.019	14.066% \pm 0.019
100	0.596 \pm 0.023	16.991% \pm 0.0235
200	0.497 \pm 0.011	30.779% \pm 0.011
300	0.405 \pm 0.008	43.593% \pm 0.0080
400	0.332 \pm 0.009	53.760% \pm 0.009
500	0.232 \pm 0.01	67.688% \pm 0.01
600	0.17 \pm 0.014	76.323% \pm 0.014
700	0.102 \pm 0.0132	85.793% \pm 0.0132
800	0.046 \pm 0.046	93.59% \pm 0.046

Los valores representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

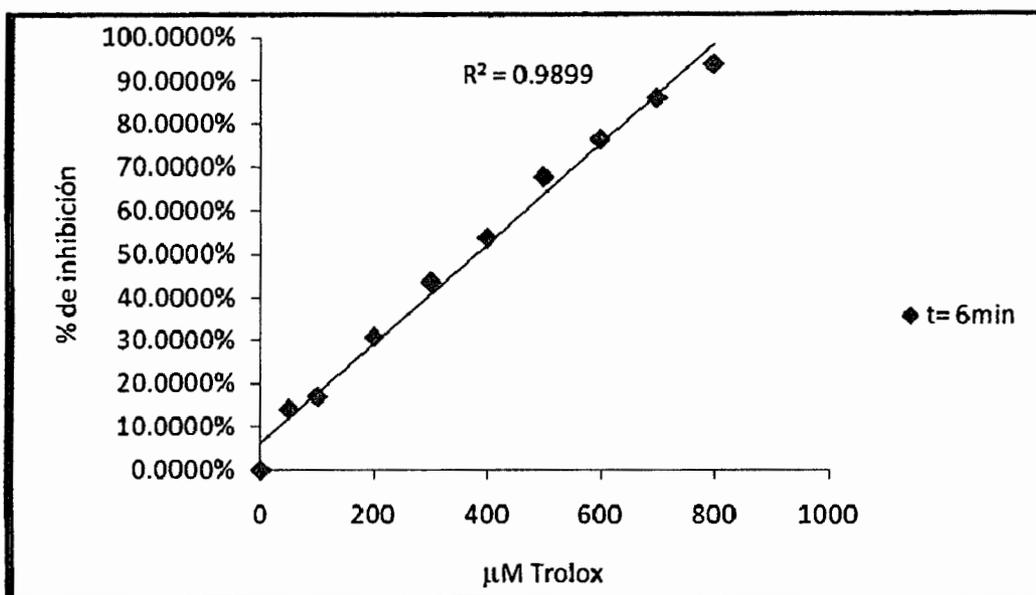


Figura 35. Gráfica que representa la curva estándar de Trolox a 6 minutos.

En el cuadro 21 se muestra la linealidad, la pendiente, ordenada al origen para la curva estándar Trolox 6 minutos.

Cuadro 21. Linealidad de la curva estándar de Trolox.

6 min	a	m	r ²
Trolox	6.3433	0.1148	0.9899

a= ordenada al origen, m= pendiente y r² = linealidad. Los valores representan la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

Se utilizó el ensayo de ABTS para obtener, a partir de la curva estándar el porcentaje de inhibición de los extractos acuosos de interés: *Portulaca oleraceae*, *Chenopodium murale* y *Malva parviflora*, manejando 3 distintas concentraciones para cada uno de dichos extractos, obteniendo como resultado que el extracto acuoso de *C. murale* cuenta con el mayor porcentaje de inhibición, como se puede observar en el cuadro 22 y la Figura 36.

Cuadro 22. Porcentaje de inhibición para los extractos acuosos a los 6 minutos.

	% de inhibición a 6 min		
mg	<i>P. oleraceae</i>	<i>M. parviflora</i>	<i>C. murale</i>
10	63.37±0.023	68.10±0.03	81.89±0.02
50	83.98±0.3	78.55±0.02	82.17±0.01
100	86.90±0.043	91.78±0.04	96.10±0.01

Los valores representan la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

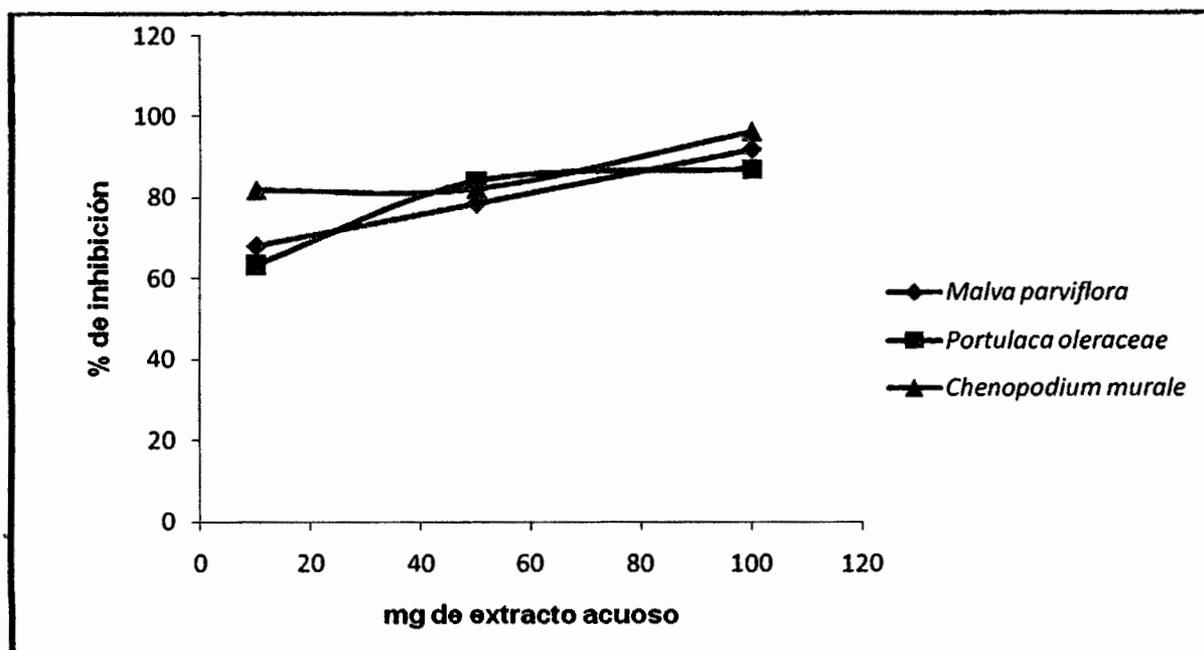


Figura 36. Gráfica comparativa del cambio del porcentaje de inhibición para los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *C. murale* y *M. parviflora*.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El método de la identificación de metabolitos secundarios utilizado fue el HPLC, analizando los extractos acuosos de forma no hidrolizada e hidrolizada. La forma no hidrolizada es de utilidad para conocer el perfil de la muestra y la forma hidrolizada permite conocer compuestos libres de unidades de azúcar, pues la reacción con el ácido clorhídrico a una temperatura de 90°C y con duración de 2 horas permite romper enlaces glucosídicos, todo lo anterior nos da la posibilidad de conocer el potencial de cada extracto. Tomando en cuenta lo anterior en las Figuras 37, 38 y 39 se presentan los cromatogramas comparando el perfil de la muestra hidrolizada y de la no hidrolizada para cada uno de los extractos vegetales.

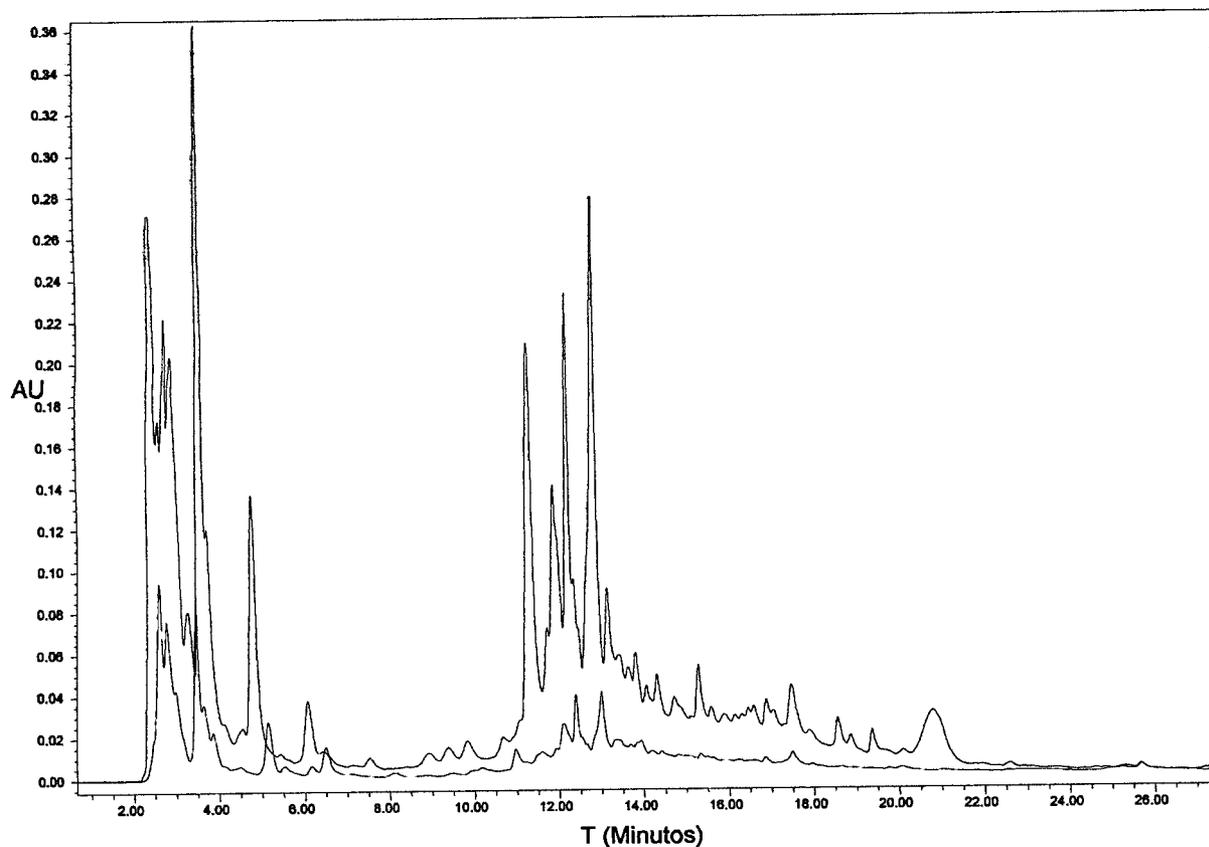


Figura 37. Comparativa de cromatogramas para el extracto acuoso no hidrolizado (Negro) e hidrolizado (Azul) de *Portulaca oleraceae*.

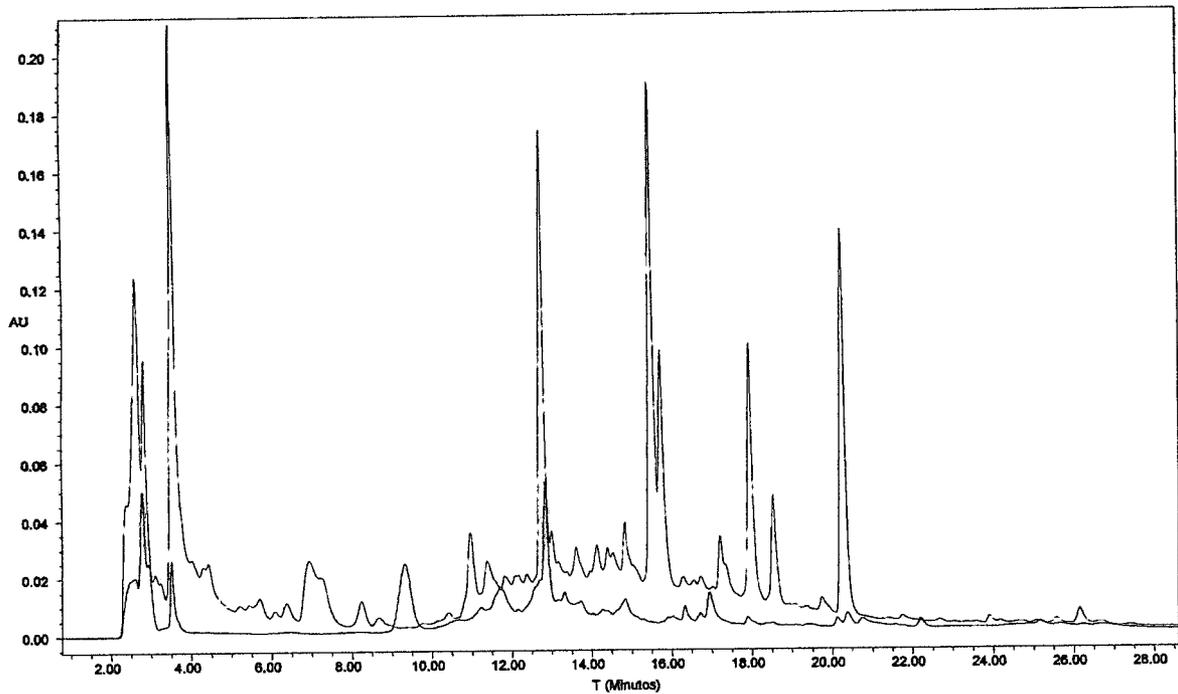


Figura 38. Comparativa de cromatogramas para extracto acuoso no hidrolizado (Negro) e hidrolizado (Azul) de *Malva parviflora*.

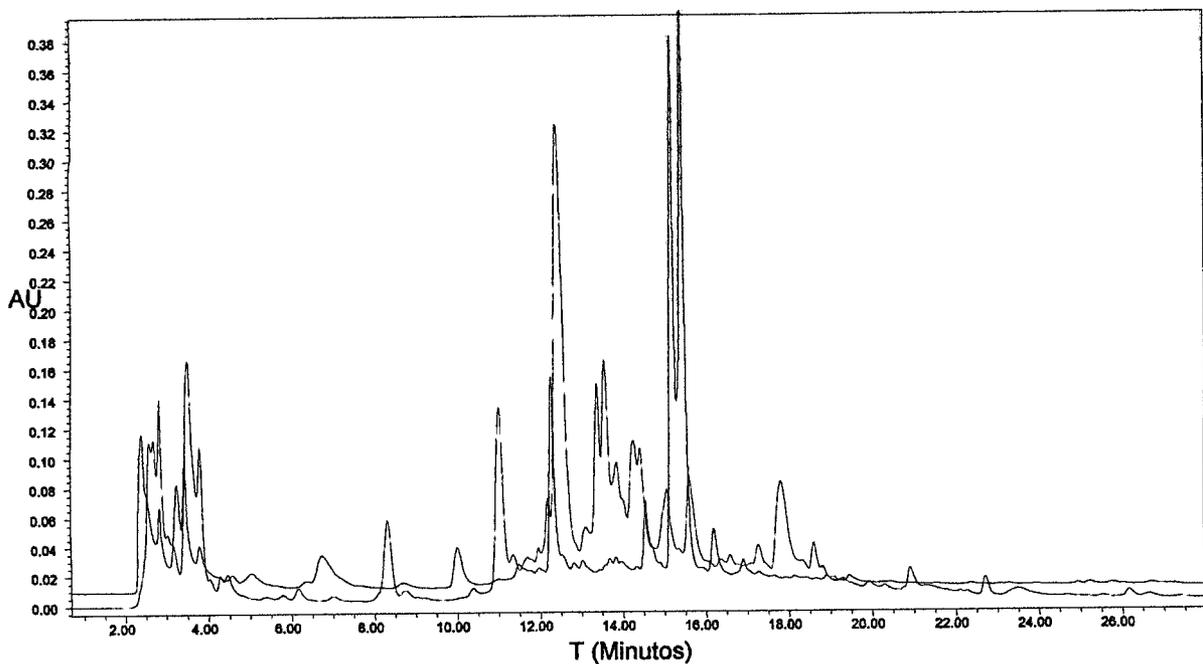


Figura 39. Comparativa de cromatogramas para extracto acuoso no hidrolizado (Negro) e hidrolizado (Azul) de *Chenopodium murale*.

Al terminar de conocer los perfiles, éstos fueron comparados con el cromatograma de la mezcla de estándares compuesta por ácidos fenólicos y flavonoides de interés; lo que nos permitió identificar los posibles componentes presentes en cada una de las muestras.

En el caso de las muestras hidrolizadas se obtuvieron como resultados que los extractos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* solo presentan ácido protocatéuico en las concentraciones de 64.3835 μg de estándar/g de extracto y 33.6606 μg de estándar/g de extracto, mientras que el extracto de *C. murale* presentó rutina en una concentración de 35.31 μg de estándar/g de extracto y ácido protocatéuico 20.81 μg de estándar/g de extracto.

En las muestras hidrolizadas se puede observar que la cantidad de ácido protocatéuico disminuye tanto en *M. parviflora* como en *P. oleraceae*, mientras que en *C. murale* desaparece completamente; esto se puede deber a dos posibles causas: la primera, que el ácido protocatéuico es degradado por la hidrólisis, convirtiéndose en otro compuesto que no identificamos y la segunda es que el componente que nosotros suponemos que es el ácido protocatéuico en el compuesto no hidrolizado realmente no es el mismo, tratándose de otro con semejante tiempo de retención, esto podría analizarse al reciclar el pico y tratar de separarlo para asegurarnos que es del compuesto que se piensa o simplemente es otro; por otra parte la rutina es degradada, dando la quercetina y rutinosa (sin embargo la quercetina al ser un compuesto termolábil se degrada por el proceso de hidrólisis no apareciendo así en el cromatograma de dicha muestra; por otra parte, la rutinosa se sigue transformando a ramnosa y glucosa como lo muestra la Figura 40).

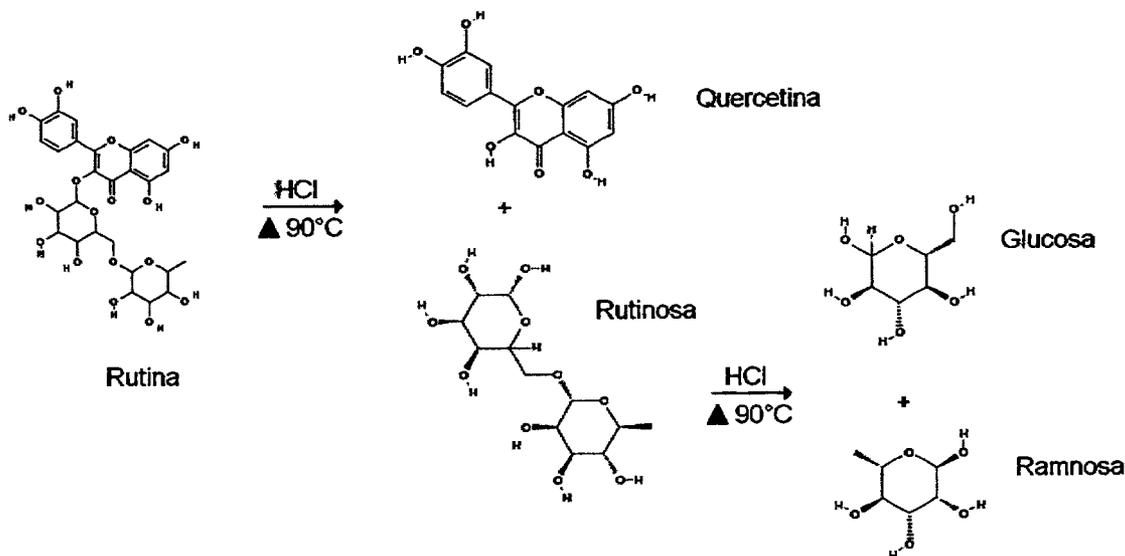


Figura 40. Esquema que indica la degradación de la Rutina por medio de una hidrólisis.

El Fundamento del ensayo FRAP va encaminado a determinar la capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos y flavonoides para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Este método fue propuesto en 1996 por Benzie y Strain (1996) para determinar la capacidad total antioxidante de los compuestos presentes en alimentos, bebidas y extractos de plantas ricas en compuestos fenólicos.

En la Figura 35 se puede observar la estabilidad de la reacción dada por el blanco y por el Sulfato Ferroso (FeSO_4), esto indica que no hay reducciones espontáneas de Fe^{3+} a lo largo del ensayo, lo que a su vez indica que el incremento de absorbancia, en el caso de una muestra, está directamente relacionado solo con la actividad antioxidante de los compuestos presentes en esta última. Así mismo, el cambio de color en la muestra es el resultado de la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} aportado por el FeCl_3 .

La evaluación de la capacidad reductora férrica de los compuestos antioxidantes en el método original presenta que en un intervalo de 0 a 4 minutos se alcanza la estabilidad de la reacción (de Fe^{3+} -TPTZ a Fe^{2+} -TPTZ). Sin embargo, en el presente trabajo dicha estabilidad no se alcanza sino hasta los 30 minutos;

para evidenciar este comportamiento se mantuvo el monitoreo hasta los 60 minutos (Arellano, 2007). La cinética de cada extracto se muestra en la Figura 37.

Todo lo anterior concuerda con lo reportado en los trabajos de Benzie y Strain (1996), Pulido y col. (2003), Firuzi y col. (2005) y Arellano (2007).

Para cada extracto, fueron analizadas tres concentraciones diferentes (10, 50 y 100 mg) obteniendo como resultado, un incremento de la absorbancia a mayor concentración del extracto. En cuanto a la cinética de la reacción, esta sigue el mismo comportamiento reflejado en la curva estándar (Cuadro 17, Figuras 38 y 39).

En el Cuadro 18, se muestran los equivalentes de sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) para los extractos acuosos de las diferentes plantas analizadas a los 4 y 30 minutos lo que sirvió como base para obtener el valor calculado de FRAP en unidades de $\mu\text{g FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ de extracto. Los valores de FRAP obtenidos para los extractos caen dentro de los valores reportados para otros extractos en el trabajo de Soong y Barlow (2004).

Todo esto arrojó como resultado que el extracto acuoso de *C. murale* fue el que presentó mayor concentración de $\mu\text{moles de FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ de muestra (Valor calculado de FRAP), seguido por el extracto de *M. parviflora* y encontrando menor concentración en el extracto de *P. oleraceae*. Los valores se muestran con más detalle en el Cuadro 19.

El fundamento del ABTS va encaminado a la generación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y la capacidad que se genera para inhibirlo, mostrándose una disminución en la absorbancia (el color está dado por la solución solvente-ABTS), como lo indica el método Van Den Berg y col. (1999).

Tomando en cuenta que el radical ABTS** no es estable, se considera que hasta los 6 minutos todo el porcentaje de inhibición reportado está directamente relacionado a la concentración, ya sea del estándar o al de los componentes en las diferentes muestras.

Para cada extracto se analizaron 3 diferentes concentraciones (10, 50 y 100 mg) y se utilizó la curva estándar de Trolox (Figura 40) para determinar el porcentaje de inhibición cuyos resultados mostraron que el extracto de *C. murale* es el que presenta mayor porcentaje de inhibición seguido nuevamente por el extracto de *M. parviflora* y después por el extracto de *P. oleraceae*; como se muestra en el Cuadro 22.

Los dos ensayos evaluados en el presente trabajo (FRAP y ABTS) nos indicaron que de los tres extractos el que tiene mayor capacidad reductora y antirradical es el *C. murale*, seguido por *M. parviflora* y por último la *P. oleraceae* (Cuadro 23).

Cuadro 23. Valores de FRAP y ABTS para los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *M. parviflora* y *C. murale*.

Extracto acuoso	ABTS μmol Trolox/g de planta	FRAP μmol FeSO ₄ ·7H ₂ O /g extracto
<i>P. oleraceae</i>	696.875±0.043	232.878±2.8
<i>M. parviflora</i>	766.875±0.04	266.506±1.2
<i>C. murale</i>	805.625±0.01	676.256±3.0

VIII. CONCLUSIÓN

Por medio de HPLC se logró identificar y cuantificar ácido protocatéuico en los extractos acuosos no hidrolizados e hidrolizados de *Portulaca oleraceae* y *Malva parviflora* mientras que para el extracto acuoso no hidrolizado de *Chenopodium murale*, fue el ácido protocatéuico y la rutina.

Durante el desarrollo de este trabajo se estandarizó la técnica de FRAP en un microensayo de placa de 96 pozos. Se evaluó la actividad reductora de los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *M. parviflora* y *C. murale*.

De los extractos evaluados, la especie vegetal con mayor potencial reductor expresado como FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ extracto) es *C. murale*, seguido por *M. parviflora* y por último *P. oleraceae*.

La técnica de ABTS se estandarizó al igual que el ensayo FRAP, y se evaluó la actividad antirradical de los extractos acuosos de *P. oleraceae*, *M. parviflora* y *C. murale*.

De los extractos evaluados, la especie vegetal con mayor porcentaje de inhibición es *C. murale*, seguido por *M. parviflora* y por último *P. oleraceae*.

Los métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante de las muestras (FRAP y ABTS) mostraron ser comparables en sus resultados, aunque los fundamentos de éstos son distintos entre sí.

Todo lo anterior nos indica que el extracto acuoso con mayor concentración de compuestos fenólicos, el *C. murale*, corresponde al que presenta mayor actividad reductora y antirradical (FRAP y ABTS).

Para futuros trabajos se recomienda realizar estudios fitoquímicos biodirigidos de estas especies para aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante y determinar sus mecanismos de acción *in vitro* e *in vivo*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M., Ortega, S., García, J. J., Martínez, E., Reiter, R. J., Millan ,S., Robinson, M. 2004.** Melatonin improves deferoxamine antioxidant activity in protecting against lipid peroxidation caused by hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *Neuroscience Letters*: Vol. 323: 55-59.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M. Altun, M. 2005.** Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Taylor & Francis Online Journals*: Vol. 39: 949-961.
- Arellano Romero, L. 2007.** "Evaluación de la capacidad reductora por el ensayo FRAP de extractos de plantas con alto contenido de flavonoides". Querétaro. UAQ. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo: 31-40.
- Awadh, A., Juelich, W. D., Kusnick, C. 2001.** Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacol*: Vol. 74: 173-179.
- Bah, M., Castañeda, R., Deza, L. M. 2008.** [www.uaq.Mx/investigación/difusión/veranos/memorias2008/7VeranoUAQ/4DezaFlores.pdf](http://www.uaq.mx/investigación/difusión/veranos/memorias2008/7VeranoUAQ/4DezaFlores.pdf).
- Battaglia, V., Salvi, M., Tunnels, A. 2005.** Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*: Vol. 280: 33864-33872.
- Benzie, I., Strain, J. 1996.** The ferric Reducing Ability of plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power"; The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*: Vol. 239: 70-76.
- Bors, W., Stettmaier K. 1997.** Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*: Vol. 6: 399-402.
- Camacho, M. del R., Garza, E., Ramírez, M., González S., Palacios, I. de P., Luna, J. 2007.** Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytotherapy Research*: Vol. 22: 82-85.

- Chang, I. M., Oh, K. B., Hwang, K. J., Mar, W. 2000.** Detection of antifungal activity in *Portulaca oleracea* by a single-cell bioassay system. *Phototherapy Research*: Vol. 14: 329-332.
- Dhar, M., Carcamo, J. M., Golde, D. W. 2005.** Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radical Biology y Medicine*: Vol. 38: 1311–1322.
- Dewick, P. M. 2003.** *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 2da. ed., John Wiley and Sons, USA: 7-34, 455-458.
- Dugas, A. J., Castañeda, J., Bonin, G. C., Price, K. L., Fisches, N. H., Winston, G. W. 2000.** Evaluation of total peroxidyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*: Vol. 63: 327-331.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. 2005.** Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Science Direct*: Vol. 1721: 174-184.
- Fryxell, P. A., 1993.** *Malvaceae. Flora del Bajío y regiones adyacentes*. Instituto de Biología, Michoacán, México. Fascículo 16.
- Galati, G., Moridani, M. Y. Chan, T. S., O'Brien, P. J. 2001.** Peroxidative metabolism of apigenin and carigenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radical Biology and Medicine*: Vol. 30: 370-382.
- Gohara, Ahmed A., Maatooqa Galal T, Masatake N. 2000.** Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*: Vol. 53: 299-303.
- Guerra, M., Avarado, M., Liberado, D., Torres. A. 2003.** Relación entre la hemoglobina glicosilada, antioxidantes totales y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión controlados. *Universitas Scientiarum*: Vol. 10: 91-97.
- Jiménez, A., Meckes, M., Ramírez, R., Torres, J., Luna, J. 2003.** Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phototherapy Research*: Vol.17: 903-908.

- Juárez, E. 2007.** Rastreo de metabolitos secundarios de plantas usadas en la medicina tradicional Mexicana para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo. 59-68.
- Leder, B. Z: 2000.** Oral androstenedione administration and serum testosterone concentrations in young men. *Journal of American Medical Association*: Vol. 283: 779-782.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., Liu, R. H. 2002.** Antioxidant and antiproliferatives of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 50: 2926-2930.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J. M., Muñón, J. 2002.** Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria: Órgano Oficial de Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*: Vol. 6: 271-278.
- Mata, R., Rivero, J. F. 2007.** Curso Teórico de Farmacognosia. 2da. ED. Universidad Nacional de México. México. D. F: 44-63.
- Narayana R., Reddy, M., Chaluvadi, M. R. 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects of cancer therapy and restore mitochondrial function *Pathology Oncology Research*: Vol. 11: 139-144.
- Meyer, P. 2005.** Thiaminase activities and thiamine content of *Pteridium aquilinum*, *Equisetum ramosissimum*, *Malva parviflora*, *Pennisetum clandestinum* and *Medicago sativa*. *The Onderstepoort journal of veterinary research*: Vol.56: 145-146.
- Miller, N. J.; Rice, C. A. 1997.** Factores influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research*: Vol. 26: 195-199.
- Miranda, N., Mendoza, S., Singletary, K. 2005.** Estudio químico y evaluación del potencial quimioprotector de plantas comestibles en zonas rurales queretanas. *Memorias del II Congreso Nacional de Química*: 1-5.
- Nahrstedt , A. 1987.** Recent developments in chemistry, distribution and geology of the cyanogenic glycosides. *Biologically Active natural Products*: 213-234.

- Nicolson, G. 2005.** Lipid replacement/antioxidant therapy as an adjunct supplement to reduce the adverse effects of cancer therapy and restore mitochondrial function. *Pathology oncology Research*: Vol. 11: 139-144.
- Okwuasaba, F., Parry, O., Ejike, C. 1988.** Effect of an aqueous extract of *Portulaca oleracea* leaves on smooth muscle and rat blood pressure. *Journal of Ethnopharmacology*: Vol. 22: 33-44
- Pérez, G., Gómez, R. 2003.** www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.htm&usg=__StQQearcPVjV15EunGYLRueFNoU=&h=300&w=434&sz=16&hl=es&start=3&um=1&tbnid=1VkGqNb2AAoEDM:&tbnh=87&tbnw=126&prev=/images%3Fq%3Dflavonoide%26hl%3Des%26um%3D1.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura, F. 2003.** Antioxidant of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 24: 3392-3402.
- Quiles, J. 2009.** www.florasilvestre.es/mediterranea/index.htm.
- Radhakrishnan, R., Zakaria, M. N. M., Islam, M. W., Chen, H. B. 2001.** Neuropharmacological. Actions of *Portulaca oleraceae* L. V. Sativa (Howk). *Journal of Ethnopharmacol*: Vol. 76: 171-176.
- Rzedowski, G. C. de J. 2001.** Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México: Fascículo 34: 124-130.
- Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E. 1996.** Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Willims and Wikins, Usa: 108-120.
- Shale, T. L., Stirk, W. A., Van, S. J. 2005.** Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *Journal Ethnopharmacol*: Vol. 96: 325–330
- Skoog, D., Holler, J., Nieman, T. 2000.** "Principios de análisis instrumental", 5ª edición, Ed. McGraw-Hill: 236-245.
- Soong, Y., Barlow, P. 2004.** Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*: Vol. 20: 10-15.

- Suarez, R. G., Serrano, C. V., Balderas, A. P., Pelz, M. R. 2004.** Atlas de maleza arvenses del estado de Querétaro. Serie etnobiológica, México: 114-116, 170-192.
- Tahir, M. M., Foley, B., Pate, G., Crean, P., Moore, D., McCarroll, N., Walsh, M. 2005.** Impact of vitamin E and C supplementation on seum adhesion molecules in chronic degenerative aortic stenosis: a randomized controlled trial. American Heart Journal: Vol. 150: 302-306.
- Torsell, K. B. G. 1997.** Natural Product Chemistry A mechanistic, biosynthetic and ecological approach. 2da Ed. Apotekarsocieteten, USA: 218-227, 292-300.
- Tsimikas, S., Brilakis, E. S., Miller, E. R., McConnell, J. P., Lennon, R. J., Kornman, K. S., Witztum, J. L., Berger, P. B. 2005.** Oxidized phospholipids, Lp (A) lipoprotein, and coronary artery disease. The Englands Journal of Medicine: Vol. 353: 46-57.
- Van Den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., Van Den Berg, H., Bast, A. 1999.** Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chemistry: Vol. 66: 511-517.
- Wang, S. Y., Stretch, A. W. 2001.** Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. Journal of Agricultural and Food Chemistry: Vol. 49: 969-978.
- Willcox, J. K., Ash, S., Catignani G. L. 2004.** Antioxidant and prevention of chronic disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition: Vol. 44: 275-295.
- Xiang, L., Zheng, Y., Yang Z. 2005.** Phenolic alkaloids as a new class of antioxidants in *Portulaca oleracea*. Phytotherapy research: Vol. 42: 104-107.
- Zandi, P. P., Sparks, D. L., Khachaturian, A. S., Tschanz, J., Norton, M., Steinberg, M., Welsh, K. A., Breitner, J. C. 2004.** Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. Archives Gen. Psychiatry: Vol. 62: 217-224.
- Zhang, H., Weng, Q., Yuan, K., Xiong, J., Wang, C., Xu, G. 2005.** Determination of dopamine and norepinephrine in *Portulaca oleracea* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography with amperometric detection. Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui: Vol. 23: 18-21.