

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE TIMBE
(*Acaciella angustissima*) Y TEPAME (*Acacia pennatula*)”**

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTAN

MARCELA VARGAS HERNÁNDEZ

PERLA VALERIA MUNGUÍA FRAGOZO

DIRIGIDA POR

Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
TIMBE (*Acaciella angustissima*) Y TEPAME (*Acacia pennatula*)”**

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTAN

MARCELA VARGAS HERNÁNDEZ

PERLA VALERIA MUNGUÍA FRAGOZO

DIRIGIDA POR

Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ

SINODALES

Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ
DIRECTOR

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ
SINODAL

Dr. IRINEO TORRES PACHECO
SINODAL

Dra. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Generalidades	3
II.1.1 Timbe	4
II.1.2 Tepame	6
II.2 Compuestos fenólicos	7
II.2.1 Flavonoides	9
II.2.2 Contenido de compuestos fenólicos en especies del género <i>Acacia</i>	10
II.2.3 Capacidad antioxidante	11
II.2.4 Capacidad antimutagénica	13
II.2.5 Compuestos fenólicos como agentes antimutagénicos	15
II.2.6 Papel de los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas	15
II.2.6.1 Compuestos fenólicos y resistencia contra hongos	16
II.3 Respuesta de las plantas ante el estrés abiótico	17
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
IV.1 General	23
IV.2 Específicos	23
V. METODOLOGÍA	24
V.1 Detección e identificación de compuestos bioactivos	24
V.1.1 Material biológico	24

V.1.1.1	Material vegetal	24
V.1.1.2	Material microbiológico	24
V.1.2	Material químico	25
V.1.3	Extracción de compuestos fenólicos	25
V.1.3.1	Maceración	25
V.1.3.2	Soxhlet	26
V.1.3.3	Infusión	26
V.1.4	Determinación de fenoles totales	26
V.1.5	Determinación de flavonoides totales	27
V.1.6	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides mediante HPLC	28
V.2	Evaluación de la capacidad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana <i>in vitro</i> .	29
V.2.1	Evaluación de la capacidad antioxidante	29
V.2.1.1	Método ABTS (azino-bis 2-2 (ácido-3-etilbenzthiazolins-6-sulfónico))	29
V.2.1.2	Técnica de DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)	30
V.2.1.3	Método FRAP	30
V.2.2	Evaluación de la capacidad mutagénica y antimutagénica	31
V.2.2.1	Ensayo de microsuspensión de Kado y col. (1983 y 1986)	31
V.2.2.1.1	Curva dosis-respuesta	31
V.2.2.1.2	Crecimiento de la bacteria	31
V.2.2.1.3	Preincubación	32
V.2.2.1.4	Preparación del agar de superficie y vaciado en placa	32
V.2.2.1.5	Mutagenicidad y/o toxicidad de los compuestos presentes en los extractos metanólicos	32
V.2.2.1.6	Preincubación con extractos	33
V.2.2.1.7	Actividad antimutagénica de los compuestos presentes en los extractos metanólicos	33
V.2.3	Evaluación de la capacidad antimicrobiana	34
V.2.3.1	Preparación del medio	34

V.2.3.2	Inoculación y crecimiento del hongo fitopatógeno	34
V.2.4	Análisis estadísticos	35
V.2.5	Perfil transcriptómico de timbe crecida bajo condiciones protegidas	35
V.2.5.1	Banco de genes de Hibridación Sustractiva por Supresión (HSS)	35
V.2.5.2	Aislamiento de ARN	35
V.2.5.3	Síntesis, amplificación y purificación del ADN complementario (ADNc) ..	36
V.2.5.4	Aislamiento de fragmentos de ADNc expresados diferencialmente	36
V.2.6	Secuenciación del ADNc y comparación con bases de datos	37
VI.	RESULTADOS	39
VI.1	Detección e identificación de compuestos bioactivos	39
VI.1.1	Concentración de compuestos fenólicos	39
VI.1.2	Perfil de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de timbe y tepame	40
VI.2	Evaluación de la capacidad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana <i>in vitro</i> .	43
VI.2.1	Capacidad antioxidante	43
VI.2.1	Evaluación de la capacidad antimutagénica y mutagénica	43
VI.2.1	Evaluación de la capacidad antifúngica	48
VI.3	Perfil transcriptómico de timbe crecida bajo condiciones protegidas	49
VI.3.1	Banco de genes de Hibridación Sustractiva por Supresión (HSS)	49
VI.3.1.1	Extracción y purificación de ARN	49
VI.3.1.1	Síntesis, amplificación y purificación de ADN complementario (ADNc) ..	49
VI.3.1.2	Aislamiento de fragmentos de ADNc expresados diferencialmente	51

VII. DISCUSIÓN	56
VII.1 Detección e identificación de compuestos bioactivos en los extractos de vaina de ambas especies	56
VII.1.1 Concentración de compuestos fenólicos	56
VII.1.1 Perfil de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de timbe y tepame	58
VII.2 Evaluación de las características bioactivas de los extractos metanólicos	59
VII.2.1 Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos	59
VII.2.2 Evaluación de la capacidad antimutagénica	62
VII.2.3 Evaluación de capacidad antifúngica <i>in vitro</i>	64
VII.3 Detección de los genes que producen los compuestos bioactivos en las diferentes condiciones de manejo	66
VIII. CONCLUSIÓN	71
IX. BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Rendimiento de los extractos por cada 100 g de muestra (tepame) y por cada 50 g de muestra (timbe).	39
2 Contenido total de fenoles y flavonoides por gramo de extracto.	40
3 Contenido de los diferentes compuestos fenólicos en los extractos metanólicos.	42
4 Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos para las técnicas evaluadas.	44
5 Capacidad antimutagénica y mutagénica de los extractos metanólicos de tepame.	45
6 Capacidad antimutagénica y mutagénica de los extractos metanólicos de timbe.	47
7 Efecto de los extractos metanólicos en la inhibición del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos.	49
8 Secuencias de genes con mayor interés según las condiciones evaluadas, obtenidas de la base de datos del NCBI.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Distribución geográfica del género <i>Acacia</i> en México, con base en registros de ejemplares provenientes del Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB, CONABIO) (Rico, 2005).	4
2 Arbusto de timbe (<i>Acaciella angustissima</i>).	5
3 Arbusto de tepame (<i>Acacia pennatula</i>).	7
4 Estructura básica del fenol, C ₆ H ₆ O.	7
5 Ejemplos de algunos compuestos fenólicos a) quinonas, b) flavona, c) ácidogálico, d) cumarinas, e) harmano.	8
6 Estructura básica de los flavonoides.	9
7 Estructura de la quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇) (Khenouf y col., 2010).	10
8 Mecanismo de acción de los compuestos naturales sobre las bacterias (Silva y Fernández, 2010).	18
9 Mecanismo de respuesta al estrés celular en plantas (Wang y col., 2003).	21
10 Cromatograma de la mezcla de estándares.	41
11 Cromatograma de la muestra de tepame.	41
12 Cromatograma de la muestra de timbe.	42
13 Inhibición del crecimiento micelial de <i>A. angustissima</i> contra <i>P. capsici</i> por la técnica del alimento envenenado, a) control con DMSO, b) control sin DMSO, c) tepame 25 mg CE/mL y d) timbe 400 mg CE/mL.	48
14 Integridad del ARN de timbe, donde m) marcador, a) timbe control y b) timbe problema.	50
15 Gel de electroforesis que muestra la optimización de ciclos, se muestra en las columnas a) y 1) el ciclo 15, en b) y 2) el ciclo 20, en c) y 3) el ciclo 25, en d) y 4) el ciclo 30, en e) y 5) el ciclo 35, en f) y 6) el ciclo 40; de las columnas a) - f) es timbe normal y de	

1) – 6) timbre protegido, la columna m) corresponde al marcador de tamaño.	50
16 Gel de electroforesis mostrando la purificación del ADNc, donde m) corresponde al marcador de tamaño, a) lavado B, b) lavado C, c) lavado D y d) lavado E de tmC y e) lavado B, f) lavado C, g) lavado D y h) lavado E de tmP.	51
17 PCR de la segunda hibridación, se muestra m) marcador de tamaño de ADN a) tm 1/1, b) tm 2/1, c) control 1 y d) control 2. De este gel se cortaron los fragmentos que correspondían a 500, 750 y 1 000 pb.	52
18 Gel de electroforesis del miniprep de las colonias transformadas: m) marcador, 1 - 20) ADN plasmídico.	52
19 Gel de digestión con <i>Eco</i> -RI del vector de clonación 4-TOPO, m) marcador, 1 - 19) Inserto de 250 – 750 pb.	53
20 Clasificación de las proteínas encontradas en la base de datos del NCBI: estructurales, metabólicos, hipotéticas y desconocidas.	55

RESUMEN

Timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*) son dos plantas arbustivas del género *Acacia*. Este es utilizado ampliamente en la medicina tradicional, en la industria curtidora de pieles, entre otros y se sabe, es fuente importante de compuestos bioactivos los cuales les confieren actividades biológicas. El objetivo del trabajo fue evaluar la bioactividad de los extractos metanólicos de las vainas de ambas especies y la expresión de genes diferenciales para timbe en condiciones protegidas y a cielo abierto. Para esto, se realizó la identificación y perfil de compuestos fenólicos, la evaluación de la capacidad antioxidante, antimutagénica y antifúngica; además se construyó un banco de hibridación sustractiva por supresión (HSS) para timbe. En los extractos metanólicos, se encontraron niveles detectables de ácido gálico, (+)-catequina, luteolina y de ácido protocatecuico para timbe y sólo ácido protocatecuico para tepame. El extracto metanólico evaluado que mayor actividad antioxidante mostró fue timbe macerado. Los extractos metanólicos de ambas especies presentaron importante actividad antimutagénica contra 4-nitro-*o*-fenilendiamina y azida de sodio evaluados en las cepas TA 98 y TA 100 respectivamente. Para la evaluación antifúngica, el extracto metanólico que presentó mayor actividad fue timbe contra *F. oxysporum* y *P. capsici*. Por otro lado, se encontraron en timbe genes diferenciales (proteínas Sros, tipo I PKS, de shock al frío, ligasas de ubiquitina y Transportadores “Casetes de Unión a ATP”), que pudieran formar parte de cascadas de señalización y controles de transcripción, que activan mecanismos de respuesta al estrés. Los hallazgos de la presente investigación han generado mayor conocimiento e interés en ambas especies, por lo que estudios futuros permitirán generar nuevas posibilidades de explotación de éstas, tomando en cuenta aspectos de sustentabilidad en la misma.

I. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países con mayor biodiversidad por la extensión de su territorio y la variedad de climas que en él se distribuyen. Sin embargo, el aprovechamiento de sus recursos naturales en la producción de bienes para el ser humano es escaso, a pesar de que actualmente el uso de productos naturales ha ido en incremento en la industria.

Las plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos, con alto potencial de explotación y comercialización; dentro de los cuales incursionan los compuestos fenólicos, que por sus características físico-químicas, ayudan a proteger las células contra el estrés oxidativo que provocan los radicales libres. Por tal razón, se les atribuye capacidad antioxidante, antimutagénica, anti-inflamatoria, antialérgica, antibacteriana, entre otras. Estos compuestos pueden ser utilizados para reducir y prevenir enfermedades asociadas a estrés celular, las cuales son la principal causa de mortalidad a nivel mundial, entre las que destacan: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, disfuncionalidad del sistema inmune, entre otras.

Actualmente se ha encontrado otro uso a este tipo de compuestos, como inhibidores del ataque de un amplio espectro de organismos patógenos, entre los que se encuentran hongos, bacterias, parásitos y virus que dañan la salud humana. Además, ayudan a reducir el uso de sustancias químicas que propician el desequilibrio ambiental. Las especies del género *Acacia* pertenecen a la familia *Fabaceae*, dentro de ésta existen especies en las que se reportan cantidades importantes de compuestos fenólicos, siendo esta la razón por la cual es de esperar que las arbustivas timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*) sean una fuente alternativa de estos compuestos; lo que les da un valor agregado para que en el futuro, sean explotadas de una manera sustentable.

Por otro lado, la explotación desmedida de estas especies por los pobladores, que las utilizan como forraje, combustible y en la medicina herbolaria, ha propiciado la disminución del número de individuos. Por éste motivo, es de suma importancia

ampliar el conocimiento que se tiene sobre ellas y que se pueda en un futuro establecer estrategias de reproducción y de cultivo que permita incrementar el número de individuos, como por ejemplo la reproducción en condiciones protegidas de invernadero aumentando los rendimientos en espacios reducidos.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades

El timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*) son dos especies arbustivas pertenecientes al género *Acacia*. Las especies del género *Acacia* forman parte de la familia *Fabaceae*, la cual está conformada por 700 géneros y 20 000 especies, lo que la posiciona como tercer lugar de diversidad floral en la naturaleza, después de las familias *Orchidaceae* y *Asteraceae* (Hong y Bhatnagar, 2007).

La familia *Fabaceae* actualmente se divide en tres subfamilias: *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* y *Mimosoideae*, a esta última pertenecen el género *Acacia*, compuesta por 1 200 – 1 300 especies (Brockwell y col., 2005).

La diversidad biológica de la familia *Fabaceae* se distribuye en América (185 especies), África (144 especies), Eurasia y Australia (995 especies); América alberga los géneros *Caesalpinioideae* y *Mimosoideae*, en Australia y Eurasia se desarrolla el género *Papilionoideae* (Brockwell y col., 2005; Stone y col., 2005).

La distribución de estas especies depende de los factores ambientales, que dan como resultado una gran variedad de fenotipos, que van desde pequeños arbustos, hasta grandes árboles perennes, algunas hermafroditas u otras que son puramente masculinas (Stone y col., 2005), además los insectos se han adaptado a estas diversas características para llevar a cabo el proceso de polinización (Piluk y col., 2001).

Gracias a que México posee climas tropicales y subtropicales, tan sólo en el territorio se encuentran 70 especies del género *Acacia*, 30 de ellas endémicas, sin tomar en cuenta las 15 reconocidas dentro del género *Acaciella* (Figura 1) (Rico, 2005).

Las *Acacias* poseen alta concentración de compuestos fenólicos como taninos y alcaloides, producto del metabolismo secundario, los cuales son utilizados principalmente en la industria curtidora de pieles, así como la farmacéutica y para la elaboración de perfumes (Terrones-Rincón, 2006).

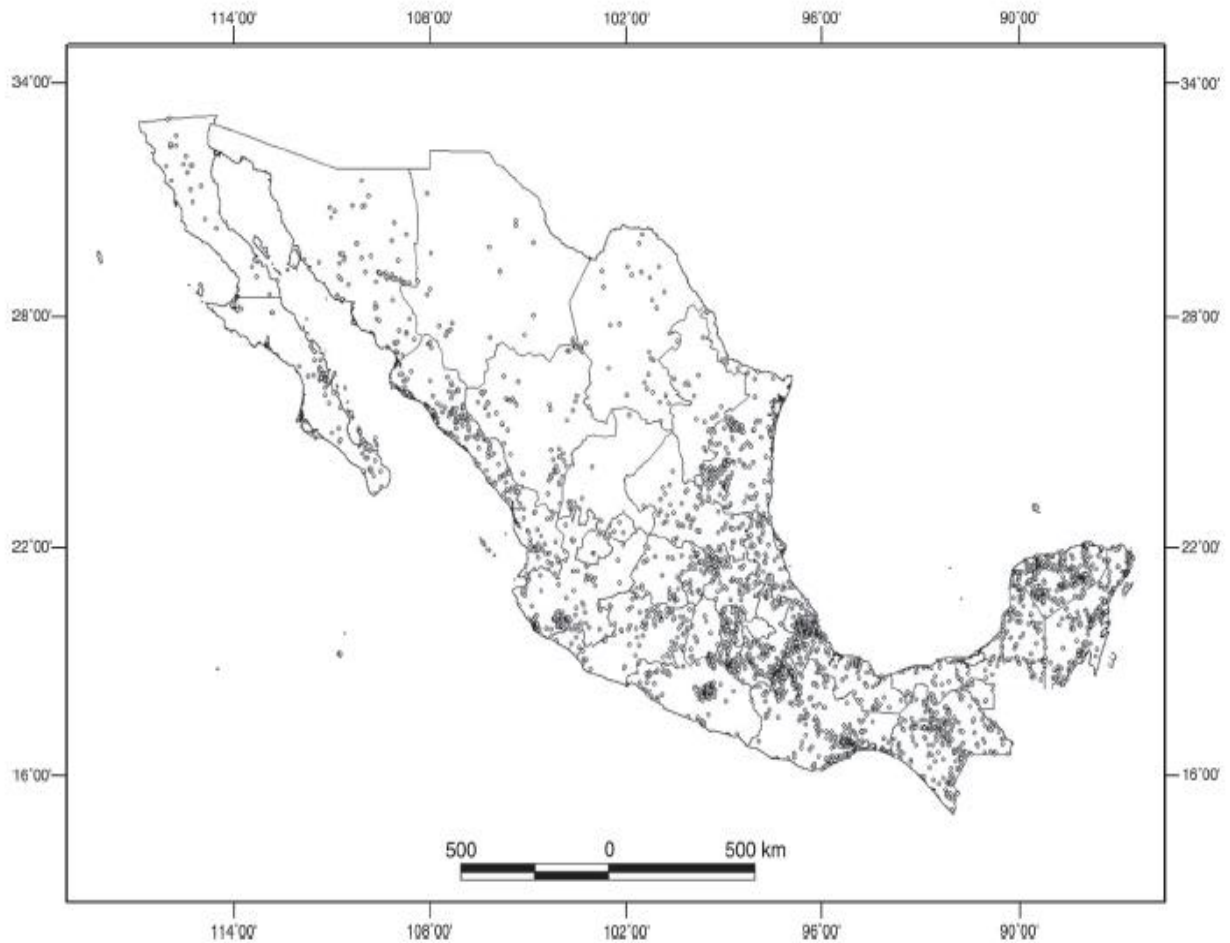


Figura 1. Distribución geográfica del género *Acacia* en México, con base en registros de ejemplares provenientes del Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB, CONABIO) (Rico, 2005).

II.1.1 Timbe

El timbe de nombre científico *Acaciella angustissima* es la especie arbustiva que se desarrolla en México, Centroamérica y parte de Estados Unidos, aunque se ha reportado su presencia en la India y Pakistán (Csurhes y Navie, 2009).

Esta especie que crece en bosques de encinos en la parte baja caducifolia y en los matorrales espinosos, se asienta en suelos someros, calizos, arenosos, pedregosos y bien drenados a 1 400 – 2 600 m de altitud (Terrones-Rincón, 2006).

El arbusto mide de 2 a 5 m de alto, posee ramas sin espinas, pubescentes o hirsutos donde se desarrollan hojas alternas compuestas y bipinadas de 8 a 10 cm de largo, posee flores blancas y pequeñas que se agregan en capítulos auxiliares o en racimos terminales y su vaina de color café mide aproximadamente de 3.5 a 8 cm de largo (Terrones-Rincón, 2006; USDA. 2009). En su interior alberga semillas ovaladas y miden 0.3 cm de diámetro, la producción de semillas va de 90 000 a 100 000 semillas/kg, la época de florecimiento va de julio a noviembre (Figura 2) (Csurhes y Navie, 2009).

Acaciella angustissima sintetiza taninos principalmente en la corteza, estos funcionan como un modo de defensa contra hongos y bacterias. El contenido de taninos puede ser afectado por la fertilización dando lugar a un efecto negativo en la nodulación, fijación de nitrógeno y crecimiento de plántulas (Ruíz-Valdiviezo y col., 2009).

El uso indiscriminado de esta planta la ha convertido en una especie vulnerable, a pesar de que juega un papel importante en la naturaleza ayudando a infiltrar agua. Además sirve como alimento para la fauna, seto vivo, rompe vientos y de mayor importancia aún, fija nitrógeno gracias a su asociación con *Rhizobium* formando islas de fertilidad (Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2006).



Figura 2. Arbusto de timbe (*Acaciella angustissima*).

II.1.2 Tepame

También conocido como huizache y de nombre científico *Acacia pennatula*, es una especie arbustiva originaria de México y Centroamérica, aunque actualmente también se ha desarrollado en algunas zonas de Australia y el sur de Asia. Este arbusto se desarrolla en la selva baja caducifolia, matorral xerófilo y encinares, en suelos someros, calizos, arenosos y a la orilla de los drenajes, entre 1 400 – 2 500 m de altitud (Terrones-Rincón, 2006).

Son arbustos perennifolios que miden de 2 a 6 m de altura, en sus ramas poseen espinas de 1 a 1.5 cm de largo, hojas bipinadas y de peciolos cortos, desarrolla inflorescencias color amarillo en una cabezuela globosa sésil, posee vainas cilíndricas de 10 cm de largo y semillas de 0.7 - 0.8 cm de diámetro (Figura 3) (Terrones-Rincón, 2006; USDA, 2009).

Debido a sus características se explota como forraje, combustible y para la extracción de madera. También se utiliza en la industria cosmética y farmacéutica, en Europa por ejemplo, las flores se utilizan para la producción de perfumes (Terrones-Rincón, 2006).

Su explotación desmedida ha propiciado su desaparición, por lo que si se sigue usando desmesuradamente, su extinción provocaría un desequilibrio ambiental, ya que ayuda a controlar la erosión, la infiltración de la lluvia, fijación de nitrógeno, mejora el suelo con su hojarasca, conforman y sirven de alimento de otras especies (Greenberg y Biecher, 2005).

En el estado de Querétaro existe una amplia variedad de plantas endémicas que juegan un importante papel dentro del nicho en que se desarrollan. Lo anterior las convierte en la mejor opción para la reforestación de esta región, tal es el caso del timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*).

Estas especies han sido explotadas por el hombre disminuyendo así el número de individuos a tal magnitud que ambas especies se encuentran actualmente en amenaza de extinción (Terrones-Rincón, 2006). La reforestación con este tipo de arbustos permitiría al ecosistema disminuir la erosión y favorecer la fijación de nitrógeno (Brockwell y col., 2005).



Figura 3. Arbusto de tepame (*Acacia pennatula*).

II.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos tienen la estructura básica del fenol (Figura 4), el cual consta de un núcleo aromático que contiene un grupo hidroxilo libre o sustituido, se diferencian de otros compuestos que también tienen esta estructura fenólica (monoterpenos), por su origen biosintético (Vermerris y Nicholson, 2008).

Los compuestos fenólicos son un grupo de compuestos químicos amplio y diverso, y se clasifican de varias maneras, una de ellas es la propuesta por Harborne y Simmonds (1964), quienes los dividen en grupos basados en el número de carbonos de la molécula. Algunos de estos grupos son: fenoles simples, ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, cumarinas e isocumarinas, favones, flavonones, antocianinas, antocianidinas, benzofenones, quinones, entre otros. Algunos ejemplos de compuestos fenólicos se muestran en la Figura 5.

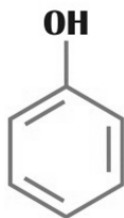


Figura 4. Estructura básica del fenol, C_6H_6O .

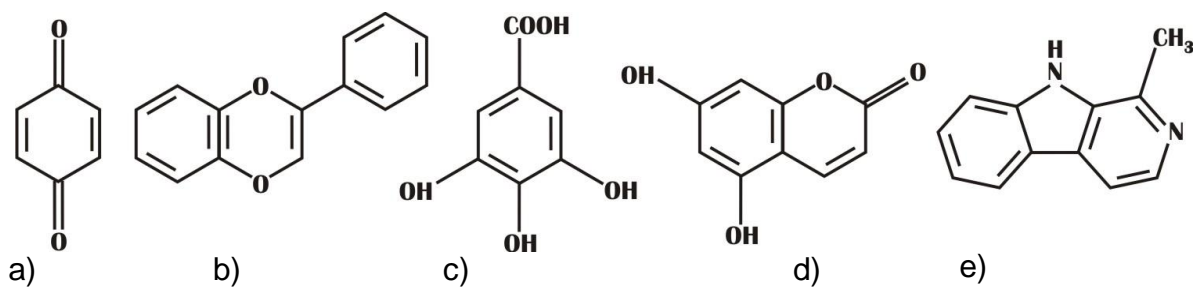


Figura 5. Ejemplos de algunos compuestos fenólicos a) quinonas, b) flavona, c) ácidogálico, d) cumarinas, e) harmano.

Las plantas biosintetizan gran cantidad de compuestos fenólicos se conocen aproximadamente 8 000 compuestos distintos (Wilfred y Ralf, 2007). Se generan a partir del metabolismo secundario de las plantas a través de la ruta del ácido shikímico, la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) a los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano), y la ruta de los poliacetatos por la cual se sintetizan quinonas, xantonas, orcinolos, etc. (Katare y col., 2009).

Los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en el ciclo de vida de las plantas, ya que desempeñan funciones estructurales y de protección. Forman parte de las estrategias de defensa contra patógenos y depredadores, funcionan como agentes alelopáticos, protegen contra los rayos UV y oxidantes, además son moléculas de señalización interna y externa en el medio ambiente en que se desarrollan (Lattanzio y col., 2006; Jaganath y Crozier, 2010). Pueden actuar como señalizadores químicos, indicando a los insectos que planta es o no apropiada para su alimentación, facilitando así la polinización, esta última a través de compuestos fenólicos sintetizados en las hojas (Lambers y col., 2008).

Se ha observado que en los arbustos y árboles la mayor cantidad de compuestos fenólicos se concentra en el tronco y raíz (Mihara y Barry, 2005).

Los compuestos bioactivos que poseen las plantas, principalmente los compuestos fenólicos, han incrementado su aceptación en la industria cosmética (como regeneradores de la piel, cremas antienvjecimiento, etc.) y farmacéutica (como

agentes antitumorales, laxantes, antimicrobianos, antidermatitis, anticancerígenas, antiradicales, entre otros) (Abdur y Moon, 2007; Marín-Martínez y col., 2008).

II.2.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos distribuido ampliamente en la naturaleza. Para las plantas estos compuestos son muy importantes siendo los responsables de la coloración de flores, frutos y hojas lo que les permite intervenir en la polinización atrayendo insectos. Además participan en la vida vegetal ejerciendo importantes funciones como por ejemplo, de protección contra los efectos nocivos de la radiación UV y pueden ejercer una eficaz actividad antioxidante. Estos compuestos poseen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono (Figura 6) y son denominados simplemente compuestos C₆-C₃-C₆ (Jaganath y Crozier, 2010).

Uno de los compuestos más comunes de la naturaleza es la quercetina identificado inicialmente en una planta del género *Quercus* (Khenouf y col., 2010) (Figura 7), otro ejemplo es la acacetina que se identificó por primera vez en una planta del género *Acacia* y se clasifica como una flavona (Marín-Martínez y col., 2009).

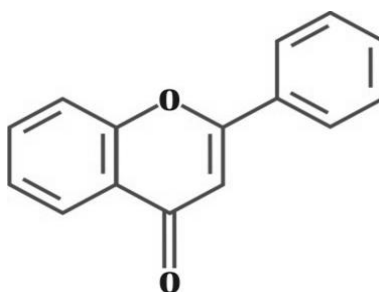


Figura 6. Estructura básica de los flavonoides.

Algunos ejemplos de flavonoides son los flavonoles, leucocianidinas, antiocianinas, procianidinas y los isoflavonoides.

Éstos compuestos poseen excelentes propiedades de quelación al hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello

desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tiene efectos terapéuticos en un elevado número de patologías como cáncer, cardiopatía isquémica, arteriosclerosis, entre otras (Martínez-Flórez y col., 2002).

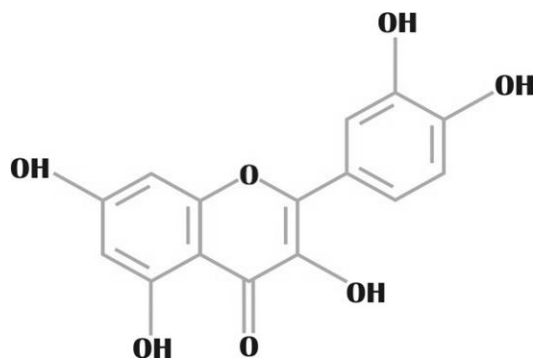


Figura 7. Estructura de la quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$) (Khenouf y col., 2010).

Han generado mayor interés para la industria farmacéutica, por su capacidad de unirse a polímeros biológicos como enzimas, transportadores de hormonas, atrapar iones metálicos transitorios (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) y radicales libres; además catalizan el transporte de electrones y depuran radicales libres (Martínez-Flórez y col., 2002). También poseen la capacidad de unirse al ADN formando aductos, lo que les confiere actividad antivírica (Nafisi, 2008).

II.2.2 Contenido de compuestos fenólicos en especies del género *Acacia*

Los metabolitos secundarios que se han reportado en las especies del género *Acacia* hasta el momento son: aminas y alcaloides, glicósidos cianogénicos, ciclitol, ácidos grasos, fluoroacetatos, gomas, aminoácidos no proteicos, terpenos, flavonoides y taninos, estos últimos de mayor importancia dado su uso comercial (Arias y col., 2004; Hong y Bhatnagar, 2007).

Algunas plantas por su peculiaridad de poseer compuestos fenólicos han sido estudiadas para evaluar su función como antirradicales, antimutagénicas,

anticarcinogénicas, para retardar la senescencia, anticancerígenas, antimicrobianas, antifúngicas, entre otras (Moongkarndia y col., 2004; Kusuma y col., 2005; Marín-Martínez y col., 2009; Khammuang y Sarnthima, 2011).

Los taninos son compuestos utilizados en la industria de las pieles como curtidores vegetales, ejemplo de ello es *Caesalpinia cacalaco* una especie endémica de México y que posee cantidades importantes de taninos hidrolizables, la producción anual de este arbusto asciende a 20 000 toneladas. Los extractos de las *Acacias* poseen la capacidad fungistática contra el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*, el cual causa la enfermedad de antracnosis en las plantas de frijol (Veloz-García y col., 2004).

Otras especies de este género contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante, como es el caso de *A. confusa* (Yank-Tzen y Jyh- Horng, 2001), *A. mangium*, *A. auriculiformis* (Mihara y Barry, 2005) y *A. aroma* que poseen actividad antibacteriana (Arias y col., 2004), por mencionar algunos, todos ellos con un gran potencial de aplicación.

II.2.3 Capacidad antioxidante

La producción de los radicales es un fenómeno inevitable de la respiración celular aerobia consecuencia de la producción de ATP (Yoon y col., 2008).

La mitocondria es el órgano responsable de la producción de energía a través de la cadena de transporte de electrones; los electrones pasan a través de diferentes moléculas y en cada paso produce energía química. El oxígeno ocupa la posición final de la cadena y aún en condiciones ideales algunos electrones se escapan de la cadena transportadora, interaccionando con el oxígeno para producir radicales superóxido (Valko y col., 2004).

Los radicales libres comprenden especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS por reactive oxygen species) como son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y los radicales hidroxilo (OH^{\bullet}), este último es el más potente agente citotóxico que oxida lípidos, enzimas y ácidos nucleicos. Por otro lado se

encuentran los compuestos no radicales que son agentes oxidantes o pueden convertirse rápidamente en radicales libres: ácido hipocloroso (HOCl), ozono (O₃), peroxinitrito (ONOO⁻), oxígeno libre (¹O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Valko y col., 2007).

En la actualidad, se ha encontrado que algunos metales tienen la capacidad de generar especies reactivas como son el hierro, cobre, níquel, vanadio, cromo, entre otros; los cuales son importantes para el buen funcionamiento de los organismos (Battin y Brumahim, 2009).

Existen factores físicos que pueden potenciar el estrés oxidativo como la luz UV, algunos compuestos químicos o el ataque de algunos patógenos (Michalak, 2006). El principal daño derivado de superóxido se produce en el ADN mitocondrial (ADNmt), el cual no puede ser reparado, a diferencia del ADN nuclear (Valko, 2004).

El deterioro producido por el daño oxidativo de las membranas y el material genético en la mitocondria es la principal fuente de enfermedades degenerativas: cáncer, disfunción inmune, deterioro cognitivo, enfermedades cardiovasculares y cerebro-vasculares (Ames, 2010).

En los alimentos el deterioro oxidativo puede causar olores y sabores rancios que disminuyen su calidad nutricional, además de que promueve la producción de compuestos tóxicos (Gaviria y col., 2007; Vásquez y col., 2007).

Las células se protegen contra este daño producto del estrés oxidativo, regulando su homeostasis gracias a la presencia de compuestos y enzimas antioxidantes, algunos pueden ser asimilados de una dieta rica en frutas y verduras (Yoon y col., 2008).

Los antioxidantes actúan interactuando directamente con los radicales libres o neutralizando el efecto de la cadena oxidativa antes de que alcancen a reaccionar con otras moléculas como el ADN, proteínas, lípidos, entre otros (Kaur y Bilaspuri, 2010).

Cabe destacar que no todos los agentes antioxidantes funcionan así, existen enzimas que son capaces de acelerar las reacciones que generan radicales libres,

que a su vez son utilizados para catalizar alguna otra reacción, a este proceso se denomina pro-oxidación (Foti, 2007).

Los antioxidantes son clasificados en 2 grupos, los enzimáticos y los no enzimáticos. Los sistemas no enzimáticos incluyen moléculas como Vitamina C, Vitamina E, carotenos, compuestos fenólicos, entre otros. Mientras que los enzimáticos que son sintetizados por las células, como superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT), peroxidasas (POX), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), polifenol reductasa (PPO), entre las más importantes (Mandal y col., 2009).

En la actualidad existen antioxidantes sintéticos pero tienen la desventaja de ser altamente inestables bajo condiciones de trabajo y en ciertos casos, ocasionan efectos adversos a la salud. Por lo anterior, diversas investigaciones se han enfocado a la búsqueda de antioxidantes naturales, entre los que destacan: carotenoides, Vitaminas C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides, licopenos, entre otros (Boussaada y col., 2008).

II.2.4 Capacidad antimutagénica

Mutación se refiere a un cambio de las secuencias de nucleótidos ocurrido por alteraciones de la secuencia del código genético, resultado de este cambio es un producto del gen alterado. Estas mutaciones pueden ser inducidas o pueden ocurrir espontáneamente (Bhattacharya, 2011).

Las mutaciones son producto de deficiencias en el metabolismo innato del sistema celular, lo que causa diversas enfermedades degenerativas (Aqil y col., 2008).

Los agentes que inducen las mutaciones actúan ya sea modificando el marco de lectura del ADN o causando daño al cromosoma; ocasionando mutaciones que derivan en diferentes tipos: deleciones, inserciones, transiciones, transversiones y/o translocaciones del cromosoma (Valko, 2004; Pecorino, 2008). Las reacciones que afectan directamente la modificación del AND son: oxidación, metilación, depurinación, deaminación, nitrosación, peroxidación de lípidos (Ping y col., 2010).

Por otro lado hay compuestos químicos que además de ser mutagénicos pueden ser carcinogénicos, por su capacidad de inducir cáncer, estos se clasifican en (Pecorino, 2008):

- Aminas aromáticas
- Hidrocarburos aromáticos
- Compuestos azo
- Nitrosaminas y nitrosaminas
- Compuestos hidrazo y azoxi
- Carbamatos
- Compuestos halogenados
- Productos naturales
- Carcinógenos inorgánicos
- Compuestos diversos

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) inducen mutaciones y daños en el ADN. Aún no se ha profundizado en el estudio del mecanismo de cómo ERN lleva a cabo este daño, pero se conoce el mecanismo en que se inducen mutaciones por acción de ERO. Por ejemplo, H_2O_2 y O_2^{\bullet} no se unen directamente al ADN, mientras que el radical OH^{\bullet} reacciona con los 4 tipos de pares de bases nitrogenadas generando múltiples productos y 1O_2 ataca selectivamente la base guanina (Wisseman, 1996).

Los principales mecanismos de acción identificadas de los antimutágenos son (Battacharya, 2011):

- Inactivación química o enzimática
- Previendo la acción de especies activas
- Atrapando radicales libres
- Atrapando mutágenos.

II.2.5 Compuestos fenólicos como agentes antimutagénicos

Los compuesto fenólicos, son compuestos bioactivos que pueden actuar como agentes antimutágenos y anticarcinógenos, el mecanismo por el cual disminuyen la velocidad de las mutaciones difiere por las características específicas de los compuestos. En el proceso de mutación se ha visto que estos compuestos pueden inactivar genotóxicos, sustancias que pueden ocasionar daño al ADN o inhibir la activación del metabolismo promutagénico, corregir el proceso de replicación y reparación en la síntesis del ADN. La eficiencia puede ser determinada por los agentes genoprotectores, en la corrección de algunos pasos clave del proceso de mutación (Alekperov y col., 2005).

Los flavonoides son compuestos que actúan como antimutágenos, ya sea neutralizando los radicales libres o capturando los compuestos mutágenos, inhibiendo su activación metabólica o interponiéndose entre el mutágeno y su blanco. La eficacia de su actividad depende del tipo de mutágeno y la estructura química del flavonoide (Álvarez y Orrallo, 2003).

Dentro de los flavonoides, la luteína y kaempferol muestran una potente actividad antimutagénica, en comparación con las chalconas y dihidrochalconas (Ishak y col., 2003).

II.2.6 Papel de los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas

Existen 2 tipos de compuestos que participan en la defensa de las plantas, los que participan en la pre-infección y los compuestos post-infección. En los primeros se encuentran las fitoanticipinas, estructuras constitutivas o que se sintetizan después de la infección a partir de compuestos ya presentes dentro del huésped; los derivados fenólicos pertenecen principalmente a este grupo. En los compuestos que participan en la post-infección se encuentran las fitoalexinas, que son sintetizadas de *novo* y se acumulan en las plantas después del proceso de infección, en éste también se encuentran las fitotoxinas. Se ha observado que algunos compuestos tienen la capacidad de inducir la respuesta de defensa de las

plantas, a estos se les denomina inductores, y comprende un variado espectro de compuestos químicos sin un motivo específico. Se ha reportado que las fitotoxinas tienen la capacidad de actuar como inductores, dependiendo del tipo de infección o del hospedero (Yang-Yu, 2008).

También se ha encontrado que los fenoles de las plantas producen ERO que median la fungitoxicidad y por tanto la defensa de las plantas (Aver'yanov y col., 2000).

A continuación se mencionan algunos compuestos fenólicos y su acción contra patógenos (Ciocan y Bara, 2007):

- Compuestos fenólicos simples y terpenoides: ácido cafeico es efectivo contra virus, bacterias y hongos, y los terpenoides además atacan parásitos.
- Quinonas y taninos: poseen la capacidad de unirse a proteínas por lo que se cree podrían unirse directamente a adhesinas, polipéptidos de la pared celular y enzimas de la pared celular.
- Flavonoides: son sintetizados en respuesta al ataque de patógenos, por lo que su espectro de acción es muy amplio, forman complejos con proteínas extracelulares y de la membrana. Los flavonoides lipofílicos rompen las membranas celulares de los patógenos.

II.2.6.1 Compuestos fenólicos y resistencia contra hongos

Los hongos son uno de los principales organismos patógenos que pueden infectar a las plantas, causando pérdidas de hasta 20% en la producción de cereales a nivel mundial. Entre los hongos patógenos más importantes en la agricultura, se encuentran *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassicola*, *Cochlibolus miyabeanus* y en el área de los alimentos *Aspergillum* sp. y *Penicillium* sp. (Kusuma y col., 2005). Más del 25% de los cereales en el mundo están contaminados con micotoxinas y se han reportado más de 300 metabolitos de hongos que son tóxicos tanto para humanos como para animales (Satish y col., 2007).

Los compuestos fitoquímicos pueden ser una alternativa para el control del desarrollo de patógenos en plantas de cultivo, disminuyendo así la toxicidad en el ambiente y los animales. Algunos compuestos con actividad antifúngica son las quinonas y el guayacol que se encuentran en plantas superiores, así como los fenoles de *Cryptomeria japonica* (Shin y col., 2007).

El mecanismo de acción de los fenoles contra los hongos fitopatógenos puede ser fungistático o fungicida, el primero detiene el crecimiento del organismo, mientras que el segundo lo mata (Veloz-García y col., 2010).

Los compuestos fenólicos presentan actividad antimicrobiana sobre los microorganismos mediante diversos mecanismos ya que pueden desintegrar la membrana celular, desestabilizan la bomba de protones, el flujo de electrones, la unión a enzimas, el transporte activo y la coagulación del contenido celular (Figura 8) (Silva y Fernández, 2010).

La forma en que dan respuesta los patógenos a este ataque es mediante la síntesis de glucoproteínas que se unen a los compuestos fenólicos por su alta afinidad (Yang-Yu, 2008). También, se ha encontrado que los fenoles de las plantas, producen especies reactivas del oxígeno (ERO) que median la fungitoxicidad y por tanto la defensa de las plantas (Gessler y col., 2007).

Aunque el uso de fungicidas en la agricultura es de gran ayuda en el control de plagas, estos tienen efectos contraproducentes para el medio ambiente y por otro lado, alta probabilidad de generar resistencia a sus límites de aplicación (Gasca-González, 2008).

II.3 Respuesta de las plantas ante el estrés abiótico

La expresión génica es el proceso mediante el cual la información genética contenida en el ADN es codificada a un producto funcional, por lo regular proteínas necesarias para el funcionamiento y desarrollo. Todos los genes contenidos dentro de la información genética, tanto de eucariontes y procariontes no se expresan en todas las células al mismo tiempo, ni en las mismas condiciones ambientales.

grupos de genes ligados y de esta manera poder elucidar sus funciones dentro de las rutas metabólicas. Los perfiles transcriptómicos proveen una herramienta para el análisis de los mecanismos del desarrollo de enfermedades, rutas de regulación y la función de los genes. Lo anterior permite la comparación de la expresión génica en condiciones normales y en condiciones anormales, tales como patologías en la planta en ciertos tejidos o células, grupos de genes, patrones de expresión temporales e identificación de genes río arriba o río abajo, entre otros (Pessino y Martelotto, 2004).

Las tecnologías con que se cuenta actualmente para el análisis de la expresión génica se dividen en dos: los sistemas cerrados, los cuales se encuentran limitados porque el análisis sólo se puede hacer si el genoma está bien caracterizado, y el sistema abierto, en el cual no se requiere de antecedentes del genoma o del transcriptoma. Las técnicas utilizadas en el sistema abierto son: el ADNc-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, por su nombre en inglés), la secuenciación de etiquetas expresadas o EST (por sus siglas en inglés), el análisis serial de la expresión de genes o SAGE (por sus siglas en inglés) y la hibridación de micro arreglos. Varios de estos estudios se han realizado para analizar sólo una variable de estrés y a pesar de que esto ha conducido a descubrimientos importantes sobre el mecanismo de respuesta de las plantas al estrés tanto biótico como abiótico, cabe aclarar que las plantas están expuestas a más de una variable de estrés y la combinación de estas variables es fundamental para entender el comportamiento en condiciones controladas y de campo abierto (Pérez-Torres y col., 2009).

Los receptores de las células de las plantas al ser estimulados, inician cascadas de señalización para activar factores de transcripción, que van a inducir la expresión de grupos de genes. Sin embargo, es muy complejo el mecanismo de la respuesta de las plantas en condiciones de estrés debido a que varios genes se encienden mientras que otros se apagan, realizando una gran cantidad de reacciones bioquímicas dentro de la célula. Muchos de estos genes son comunes en varias especies, los cuales son denominados genes homólogos (Hulhes-Fulford, 2004; Rodriguez y col., 2005).

Durante el estrés abiótico como la sequía, salinidad y temperaturas extremas, se presentan respuestas semejantes en donde se activan grupos de genes, que de manera general se clasifican en tres tipos: los que codifican para productos que protegen directamente a las células del estrés, como las proteínas de estrés al calor o HSP's (Hot shock proteins, por sus siglas en inglés), proteínas LEA (late embryogenesis abundant, por sus siglas en inglés) las cuales protegen al embrión durante la desecación, proteínas anticongelamiento, inhibidores de radicales libres, entre otros. Aquellas que participan en las cascadas de señalización y control transcriptómico (MAPK o Mitogen-activated protein kinase, por sus siglas en inglés, SOS quinasa, factores transcriptómicos, fosfolipasas, entre otros) y por último las que se encargan de la absorción y transporte de agua e iones como transportadores de iones y aquaporinas (Rodríguez y col., 2005).

La adaptación de las plantas a las condiciones ambientales son muy variables y rápidas, por lo que se debe poseer un sistema eficiente de control. La expresión de los genes es regulada a nivel tanto transcriptómico como post-transcriptómico, la primera ocurre a nivel en el que se forma el ARN pre-mensajero (ARNm) y sus modificaciones (capping, splicing y poliadenilación), y la post-transcriptómica a nivel de la síntesis de la proteína (Floris y col., 2009).

En la Figura 9 se muestra la complejidad de la respuesta de la planta en condiciones de estrés. Las principales causas de estrés primario (salinidad, sequía, temperatura y contaminación) están interconectados y causan daño celular y estrés secundario (estrés oxidativo y osmótico). Las señales iniciadoras prenden las cascadas de señalización y los controles de transcripción, que activan el mecanismo de respuesta al estrés para restablecer la homeostasis, reparar y proteger el daño de las proteínas y las membranas. Respuestas inadecuadas, pueden resultar en cambios irreversibles de la homeostasis y muerte celular (Wang y col., 2003).

La comprensión de estas rutas ayudan a la creación de estrategias de ingeniería genética basadas en la transferencia de material genético para la síntesis de protectores funcionales y estructurales que codifican proteínas que confieren tolerancia al estrés (Rodríguez y col., 2005).

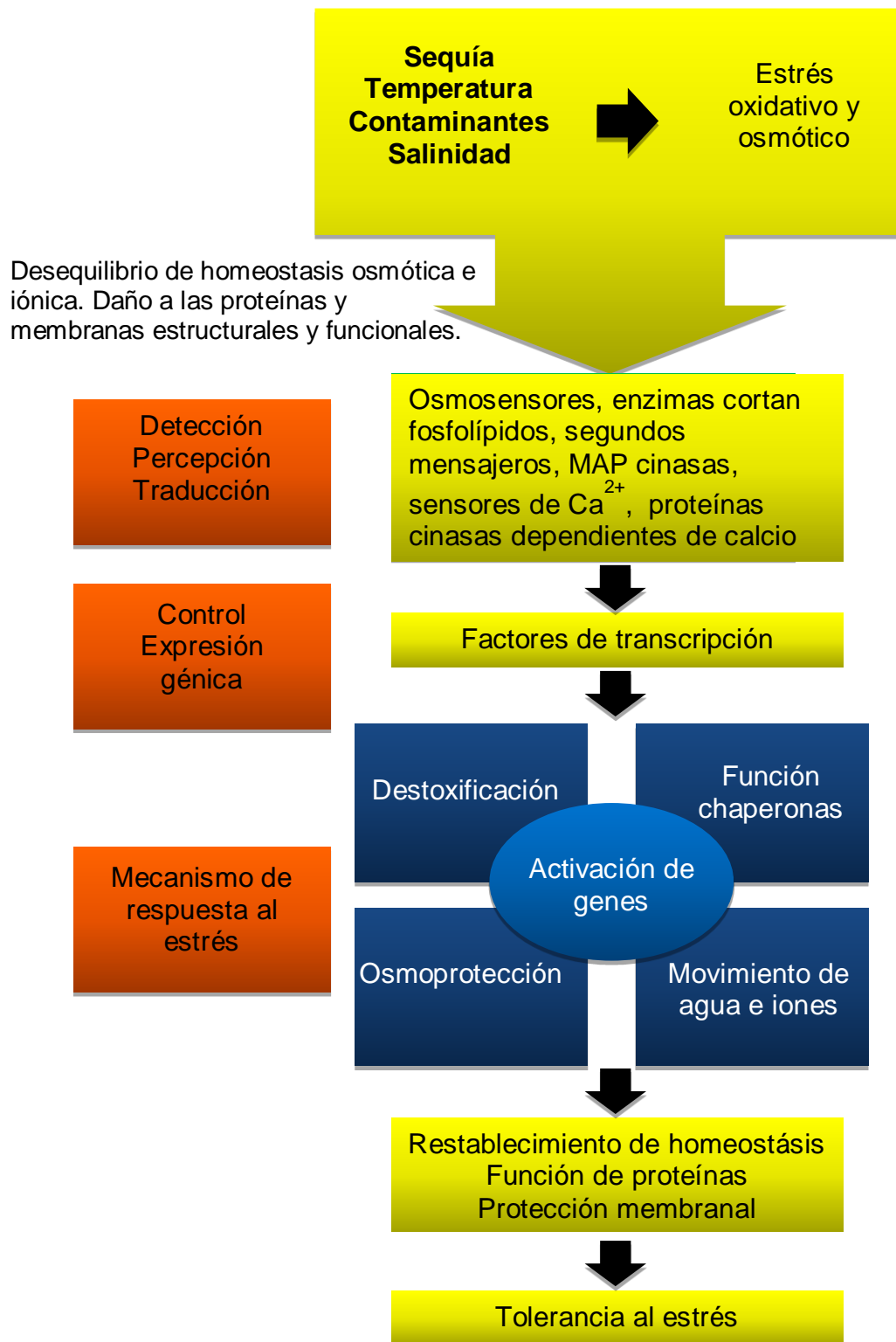


Figura 9. Mecanismo de respuesta al estrés celular en plantas (Wang y col., 2003).

III. HIPÓTESIS

Las especies timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*) dada su condición de *Fabaceas* que crecen en el semidesierto, contienen compuestos bioactivos y genes de respuesta a estrés ambiental, que les proporcionan actividad biológica de potencial aplicación industrial.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Estudiar el potencial biotecnológico de timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*), evaluando actividad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana, así como características genéticas de potencial aplicación industrial.

IV.2 Específicos

- Detectar e identificar compuestos bioactivos en extractos metanólicos de las vainas de timbe y tepame.
- Evaluar la capacidad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana *in vitro*, de los extractos metanólicos de ambas especies.
- Realizar un perfil transcriptómico de timbe crecida bajo condiciones protegidas.

V. METODOLOGÍA

V.1 Detección e identificación de compuestos bioactivos

V.1.1 Material biológico

V.1.1.1 Material vegetal

Se recolectaron las semillas de timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*) a fines del mes de Diciembre en base a los criterios empleados en muestreo de especies que presentan baja abundancia y posibilidad de extinción (Engels y col., 1995). Se muestrearon las regiones del Estado en donde se ha reportado la presencia de estos individuos. La colecta de las vainas se realizó en el parque nacional el Cimatarío a 20°31'44" N, 100°21'42" O a 2 379 m de altitud para timbe y la Cañada 20°36'34" N, 100°20'20" O a 1 875 m de altitud para tepame, una muestra de las plantas fue introducida en el Herbario Etnobotánico "Dr. Jerzy Rzedowski" (QMEX) de la facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Una vez que se obtuvieron las vainas, se procedió a extraer las semillas para ser germinadas y las vainas secas se molieron en un molino con la finalidad de obtener partículas con un diámetro de 0.5 μ m a 0.5 mm aproximadamente.

V.1.1.2 Material microbiológico

Las cepas TA 100 y TA 98 de *Salmonella typhimurium* se obtuvieron de Molecular Toxicology Inc. (MolTox). Los hongos fitopatógenos *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* se obtuvieron de la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Bajío del CIRCE-INIFAP en Celaya, Guanajuato. Para la realización del banco genético se utilizó la cepa TOPO 4 de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

V.1.2 Material químico

(+)-catequina, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido *p*-cumárico, quercetina, nearingenina, kaempferol, rutina, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, reactivo Folin, persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, sulfato ferrico (FeSO_4), EDTA, Na_2CO_3 , NaNO_2 , NaOH, HCl, ácido acético glacial, ácido sulfúrico, acetato de sodio, metanol, etanol, 4-nitro-*o*- fenilendiamina (4-N-O-P), azida de sodio (NaN_3), DMSO, histidina, biotina, sales Vogel-Bonner, caldo nutritivo No. 2, medio PDA, medio Luria Bertani, kanamicina, ampicilina, todos los reactivos descritos anteriormente fueron adquiridos por J.T. Baker y Sigma-Aldrich. Kit RNEASY (QIAGEN, Hilden, Alemania), kit SMART™ cDNA Synthesis (Clontech, Palo Alto, CA, USA), columnas CHROMA SPIN™ 1000 (Clontech, Palo Alto, CA, USA), kit Clontech PCR-select™ cDNA SUBTRACTION (Clontech, Palo Alto, CA, USA), kit QIAGEN - QIAEX II Gel Extraction, pCR4 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), enzimas de restricción *Eco*-RI y *Rsa* I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

V.1.3 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos de las vainas se llevó a cabo por 3 métodos distintos para cada especie, utilizando en cada uno de ellos 100 g de muestra de tepame y 50 g de timbe debido a que la cantidad de muestra vegetal de este último era menor.

V.1.3.1 Maceración

Se utilizó metanol grado reactivo como solvente; la técnica consistió en colocar las muestras en remojo en aproximadamente 200 mL de metanol, a temperatura

ambiente y diariamente se realizó un recambio del mismo volumen, agitando en el momento que el solvente es adicionado. El metanol resultante del remojo se almacenó en un recipiente ámbar y se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta su uso. Este proceso se realizó varias repeticiones, hasta que el metanol dejó de presentar una fuerte coloración (7 días).

V.1.3.2 Soxhlet

Se utilizó metanol grado reactivo como solvente y el método consistió en extraer los compuestos fenólicos de la muestra en un extractor Soxhlet, a una velocidad de condensación de 2 gotas por segundo. El procedimiento se detuvo hasta que se observó que el metanol ya no presentara coloración (aproximadamente 8 h). Al terminar se recuperó el metanol y se almacenó en refrigeración (4°C).

V.1.3.3 Infusión

Para este método se utilizó como solvente agua destilada, se calentó 1 L de agua hasta el punto de ebullición y se adicionó la muestra en el recipiente con agitación, se tapó y dejó reposar por 10 min. Posteriormente se filtró la muestra y se conservó en refrigeración (4°C).

Concentración de las muestras almacenadas. Ésta se llevó a cabo de dos maneras, en el rotoevaporador se concentraron las muestras metanólicas (maceración y Soxhlet) y las muestras acuosas (infusión) mediante liofilización.

V.1.4 Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrita por Dewanto y col. (2002), utilizando el ácido gálico como

estándar. Para esto se preparó una solución de ácido gálico a partir de la cual se realizó la curva estándar a una concentración de 0 – 16 μg ác. gálico/ mL. Las disoluciones que se emplearon para todos los ensayos de los extractos metanólicos de timbe y tepame fueron: 10, 50, 100, 250, 500, 1 000, 2 000, 2 500 y 5 000 μg extracto/ mL. Para esto se pesaron 5 mg de cada extracto, se aforó con 1 mL de solvente (metanol grado reactivo) y a partir de éste se realizaron las disoluciones. En una placa de 96 pozos se adicionó 100 μl de los extractos, estándares o metanol (blanco), 400 μL del solvente y se llevó a cabo la oxidación con 250 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (1 N), después de 5 min se adicionó 1.25 mL de una solución de Na_2CO_3 al 20%. Se dejó reposar por 2 h sin agitación y se midió la absorbancia contra el blanco a una longitud de onda de λ 760 nm en un lector de microplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Las concentraciones se reportaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por mL de extracto (mg EAC/ mL).

V.1.5 Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó mediante el método descrito por Liu y colaboradores (2002) y se utilizó como estándar (+)-catequina.

Primero se preparó una solución de (+)-catequina a partir de la cual se realizó la curva estándar a una concentración de 0 – 100 μg (+)-catequina /mL. El método consistió en mezclar en una placa de 96 pozos, 100 μL de los extractos o los estándares, con 75 μL de una solución de NaNO_2 al 5%, después de 6 min se adicionó 150 μL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente se adicionó una solución de 500 μL de NaOH (1M) y se aforó con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 2.5 mL, luego se mezcló la solución y se midió la absorbancia a una longitud de onda de λ 510 nm en un lector de microplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Las concentraciones fueron

reportadas como miligramos equivalentes de (+)-catequina por mL de extracto (mg EAG/ mL).

V.1.6 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides mediante HPLC

Los extractos metanólicos de las plantas de timbe y tepame obtenidos mediante maceración se sometieron a un análisis mediante un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) Waters System (Waters Corporation, Milford, MA, USA) el cual consiste en una bomba cuaternaria (modelo 600), un detector de arreglo de diodo (modelo 996), un desgasificador de vacío en línea (MetaChem Technologies Inc.) y por último un inyector Rheodyne (4793).

El control del equipo, así como el proceso y el manejo de la información cromatográfica se realizó con el programa Millennium (Waters).

Los extractos metanólicos de ambas plantas se filtraron a través de una membrana de 0.2 μm y 20 μL y se inyectaron dentro de la columna de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB-C18, 60 Å, 5 μm , 250x 4.6 mm).

La fase móvil se compuso del solvente A (acetonitrilo) y el solvente B (ácido acético 0.0125 N), esto se llevó a cabo por triplicado de la siguiente manera: condiciones isocráticas de 0 a 2 min con 5% de A y 95% de B, un gradiente de condiciones a partir del minuto 2 al 5 empezando con 5% de A y terminando con 15%, un gradiente de condiciones del minuto 5 al 20 empezando con 15% de A y terminando con 50%, un gradiente de condiciones del minuto 20 al 25 empezando con 50% de A y terminando con 5%, condiciones isocráticas del minuto 25 al 35 con 5% de A y 95% de B. La absorbancia se midió a una longitud de onda λ máx. 280 nm y se inyectaron 20 μL de muestra cada vez. La cuantificación se realizó mediante la estandarización externa con ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido *p*-cumárico, quercetina, naringenina, catequina, kaempferol y rutina. Todas las curvas estándar fueron hechas con los mismos compuestos.

V.2 Evaluación de la capacidad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana *in vitro*

V.2.1 Evaluación de la capacidad antioxidante

V.2.1.1 Método ABTS (azino-bis 2-2 (ácido-3-etilbenzthiazolins-6-sulfónico))

Este ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Nenadis y colaboradores (2004). Se utilizó una solución estándar de Trolox en metanol, a partir de la cual se realizaron las diluciones para obtener una concentración final de 50 a 800 μM , la primera dilución tenía una concentración de 50 μM , la segunda 100 μM y las siguientes se realizaron en intervalos de 100 μM . Para generar el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se adicionó a 5 mL de una solución acuosa, 88 μL de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 140 mM y se almacenó en oscuridad por 12 h, después la solución que contiene el radical fue diluida en etanol, hasta que el valor de la absorbancia fue menor a 1.0. Para medir la absorbancia se utilizó el lector de microplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA) a una longitud de onda de λ 734 nm. Se llevó a cabo el ensayo en una placa de 96 pozos, a los controles se les adicionó 20 μL de metanol (C1) y agua destilada (C2), por otro lado se adicionó 20 μL de cada muestra, de la misma manera se colocaron 20 μL de curva estándar de Trolox y finalmente a todas las soluciones anteriores se les adicionó 230 μL de $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A los blancos se les adicionó 20 μL de muestra y 230 μL de etanol. La medición de la absorbancia se llevó a cabo a 730 nm por un lapso de 0 - 6 min.

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de reducción/ decoloración del $\text{ABTS}^{\bullet+}$, usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción del } \text{ABTS}^{\bullet+} = (1 - A_{\text{muestras}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

Donde:

A_{muestra} = absorbancia del extracto metanólico, ácido gálico o Trolox.

A_{control} = absorbancia del control (metanol).

Se realizaron las respectivas curvas concentración-respuesta para obtener la concentración inhibitoria media (CI₅₀).

V.2.1.2 Técnica de DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

El ensayo descrito por Fukumoto y Mazza (2000), se llevó a cabo midiendo la capacidad del radical estable DPPH• de reducirse, observando una decoloración del color púrpura inicial de la solución. Las concentraciones de la curva estándar de Trolox fueron las mismas que las usadas para realizar el método de ABTS. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos de la siguiente manera: 20 µL de las disoluciones de los extractos o el estándar Trolox se mezclaron con 150 µL de DPPH• al 80% de metanol. Se incubó a temperatura ambiente en la obscuridad por 30 min y después se midió la absorbancia a 520 nm en un lector de microplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA).

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de reducción/ decoloración del DPPH•, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción del DPPH}^{\bullet} = (1 - A_{\text{muestras}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

Donde:

A_{muestra} = absorbancia del extracto metanólico, ácido gálico o Trolox.

A_{control} = absorbancia del control (metanol).

Se realizaron las respectivas curvas concentración-respuesta para obtener la concentración inhibitoria media (CI₅₀).

V.2.1.3 Método FRAP

Descrito por Firuzi y colaboradores (2005), el método determina la habilidad de reducción de los extractos. Para esto, se preparó una solución de FeSO₄ a partir de la cual se realizó la curva estándar a una concentración de 0 – 1 000 µg FeSO₄/mL.

El reactivo de FRAP se preparó con una mezcla de 10 mL de solución amortiguadora de acetato 300 mM (pH 3.6), 1 mL de FeCl₃ 20 mM, 1 mL de 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM, se disolvió en HCl 40 mM. Para el ensayo se adicionaron 25 µL de cada muestra o estándar FeSO₄, 175 µL de la solución FRAP a 37°C a cada muestra por triplicado y solución amortiguadora de acetato a la cuarta, la absorbancia a la que se midió fue λ 595 nm en un lector de microplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA), monitoreando las absorbancias a 0, 4, 10, 30 y 60 min. Los resultados se reportaron como mmol FeSO₄/g extracto.

V.2.2 Evaluación de la capacidad mutagénica y antimutagénica

V.2.2.1 Ensayo de microsuspensión de Kado y col. (1983 y 1986)

El procedimiento para la determinación de la capacidad antimutagénica se describe a continuación:

V.2.2.1.1 Curva dosis-respuesta

Se realizó una curva dosis-respuesta para fijar la concentración de los mutágenos 4-nitro-*o*-fenilendiamina y azida de sodio utilizados para el ensayo de mutagenicidad en las cepas TA 98 y TA 100 respectivamente. Las concentraciones de la curva de 4-nitro-*o*-fenilendiamina para TA 98 fueron de la siguiente manera: 0.125, 0.250, 1.00 y 2.00 mg/mL; mientras que para la azida de sodio para TA 100 fueron: 0.125, 0.250, 1.00 y 2.00 mg/mL.

V.2.2.1.2 Crecimiento de la bacteria

Las cepas de *Salmonella thyphimurium* TA 98 y TA 100 se hicieron crecer en caldo nutritivo No. 2, se incubaron por 16 h a 37°C con agitación constante a 120 rpm; hasta alcanzar una densidad final de $1 - 2 \times 10^9$ aproximadamente. Posteriormente las células se concentraron mediante centrifugación a 4 500 rpm,

4°C por 10 min. La pastilla se resuspendió en 2.5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos de sodio y potasio 0.15 M (PBS, pH 7.4) y se ajustó a una concentración celular de 1×10^{10} células/ mL.

V.2.2.1.3 Preincubación

De acuerdo al ensayo de microsuspensión de Kado y col. (1983 y 1986), brevemente en tubos de ensayo de 12 x 75 mm estériles y en baño de hielo, se adicionaron los siguientes ingredientes: 0.1 mL de la suspensión bacteriana (1×10^{10} células/mL PBS) y 0.01 mL del mutágeno para el control positivo y para el control negativo se adicionó DMSO. Se incubaron los tubos a 37°C, 120 rpm y 90 min, al final de la incubación los tubos se colocaron en baño de hielo.

V.2.2.1.4 Preparación del agar de superficie y vaciado en placa

El agar de superficie se preparó de acuerdo al método descrito por Ames y col., (1973). En tubos de ensayo estériles, se depositaron 2 mL de agar de superficie y se mantuvieron a 45°C. Al final de la preincubación a cada uno de los tubos que contienen la bacteria, se les agregaron los 2 mL de agar de superficie, se mezcló en vortex y se vaciaron a cajas de Petri con medio mínima glucosa (y sales de Voguel-Bonner). Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó a 37°C por 48 h. Al final de la incubación, se contó el número de colonias.

V.2.2.1.5 Mutagenicidad y/o toxicidad de los compuestos presentes en los extractos metanólicos

Se determinó si los compuestos presentes en los extractos metanólicos, a diferentes concentraciones, tenían la capacidad de inducir mutagenicidad o resultar tóxicos para TA 98 y TA 100, las concentraciones evaluadas fueron las siguientes:

0.62, 1.25, 2.5 y 5 mg en 10 μ L del vehículo (DMSO y NaCl 0.9% para TA 98 y TA 100 respectivamente). El crecimiento de la bacteria se realizó como se describe anteriormente.

V.2.2.1.6 Preincubación con extractos

En tubos de ensayo de 12 x 75 mm estériles mantenidos a 4°C en baño de hielo, se adicionaron los siguientes ingredientes: 0.1 mL de la suspensión bacteriana (1×10^{10} células/ mL PBS) y 0.01 mL de los extractos metanólicos a diferentes concentraciones: 0, 50,100, 200 y 400 mg equivalentes de (+)-catequina. Para el control negativo se utilizó DMSO. Posteriormente se incubaron los tubos a 37°C, 120 rpm y 90 min, después se colocaron nuevamente en baño de hielo. La preparación del agar de superficie y vaciado en placa se realizó como se describe anteriormente.

V.2.2.1.7 Actividad antimutagénica de los compuestos presentes en los extractos metanólicos

En tubos de ensayo de 12 x 75 mm estériles mantenidos a 4°C en baño de hielo, se adicionaron en el orden que se describe los siguientes compuestos: 0.1 mL de concentrado de bacterias (1×10^{10} células/mL PBS), 0.01 mL del mutágeno (concentración 0.2 μ g/tubo) y los extractos metanólicos a diferentes concentraciones 0, 50,100, 200 y 400 mg equivalentes de (+)-catequina, para el control se utilizó DMSO. Se incubaron los tubos a 37°C, 120 rpm y 90 min, después se colocaron de nuevo los tubos en baño de hielo. La preparación del agar de superficie y vaciado en placa se realizó como se describe anteriormente. Se contaron las colonias revertantes y se calculó el porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos contra la mutagenicidad inducida por los mutágenos 4-nitro-o-fenilendiamina y azida de sodio, en las cepas TA 98 y TA 100 respectivamente.

El porcentaje de inhibición se determinó en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = [1 - (T / M)] \times 100$$

Donde:

T = Número de revertantes por caja en presencia del mutágeno.

M = Número de revertantes por caja del control positivo.

V.2.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana

V.2.3.1 Preparación del medio

Se determinó la capacidad antimicrobiana de los extractos metanólicos, mediante la técnica del alimento envenenado, descrita por Veloz-García y col. (2010). Para llevar a cabo el ensayo, se preparó medio agar papa dextrosa (PDA), a este se le adicionó una determinada cantidad de extractos metanólicos disueltos en 4 mL de DMSO, para obtener una concentración final en el medio de 50, 100, 200, 300 y 400 mg equivalentes ácido gálico/ mL (mg EAG/ mL), al control positivo no se le adicionó extracto. Finalmente se vació el medio en cajas Petri y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

V.2.3.2 Inoculación y crecimiento del hongo fitopatógeno

Los hongos fueron crecidos en cajas Petri de tamaño estándar con medio PDA durante 7 días, estas muestras fueron utilizadas para el inóculo. En las cajas Petri que anteriormente se prepararon con los extractos metanólicos, se inocularon con discos de 5 mm de diámetro del micelio de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*. Estos se incubaron a temperatura ambiente y se llevó a cabo el monitoreo del crecimiento midiendo el diámetro del micelio cada 24 h. Se detuvo la medición cuando el control positivo creció hasta cubrir completamente la caja Petri.

El porcentaje de inhibición fue determinado en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición de crecimiento del micelio} = (g_c - g_t / g_c) \times 100$$

Donde:

g_t = Diámetro del micelio en la caja en presencia de los extractos metanólicos.

g_c = Diámetro del micelio en la caja control.

V.2.4 Análisis estadísticos

Todos los resultados de las pruebas anteriormente presentadas fueron expresados como el promedio de 3 ensayos independientes con su respectiva desviación estándar (\pm SD). La diferencia significativa fue calculada utilizando la prueba Turkey, los valores $\alpha < 0.05$ se consideran significativos.

V.2.5 Perfil transcriptómico de timbe crecida bajo condiciones protegidas

V.2.5.1 Banco de genes de Hibridación Sustractiva por Supresión (HSS)

V.2.5.2 Aislamiento de ARN

Las semillas de timbe se germinaron previamente en condiciones de invernadero (protegidas) y a cielo abierto (normales). Una vez que las plántulas alcanzaron una altura de 20 cm aproximadamente se colectaron y se llevó a cabo el procedimiento de extracción del ARN de acuerdo al protocolo de RNEASY (QIAGEN, Hilden, Alemania). La integridad y tamaño del ARN extraído se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa con formaldehído. La cuantificación y pureza del material genético se midió espectrofotométricamente mediante la relación de la absorbancia (260/280 nm).

V.2.5.3 Síntesis, amplificación y purificación del ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc con la transcriptasa reversa Superscript II (Life Technologies, Rockville, MD, USA) se partió de 1 µg de ARN total de cada condición en las plantas (normales y protegidas) siguiendo el protocolo de Síntesis de ADNc SMART™, y las instrucciones del proveedor (Clontech, Palo Alto, CA, USA). El ADNc se amplificó mediante la PCR de larga distancia (LD-PCR) de 15 - 45 ciclos separadamente (Diatchenko y col., 1995) y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2% para identificar el número de ciclos óptimos para tener la cantidad adecuada de productos de PCR para elaborar la biblioteca de ADNc. Como control se utilizó ARN total de placenta. Se realizó la purificación del ADNc a través de columnas CROMA-SPIN 1000 (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

V.2.5.4 Aislamiento de fragmentos de ADNc expresados diferencialmente

La hibridación substractiva por supresión (HSS) se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Clontech (Clontech PCR-Select™ ADNc subtraction kit, Clontech, Palo Alto, CA, USA). Los ADNc problema (protegida) y testigo (normales) se digirieron con la enzima de restricción Rsa I, la cual reconoce cuatro pares de bases (5'-GTAC-3') y deja extremos romos en el ADN digerido. El ADN problema se dividió en cuatro alícuotas, la primera alícuota de ADNc problema (protegida) y testigo (normales) se ligaron cada una al adaptador 1 y al adaptador 2, dando lugar a dos poblaciones de ADNc problema y 2 de ADNc testigo. Para llevar a cabo la primera hibridación, a una pequeña cantidad de cada población problema (reacción 1) con el adaptador 1 y 2 por separado se adicionó un exceso de ADNc testigo (5 µg) se llevaron a 68°C por 8 h. Después de esta primera hibridación se combinaron las 2 muestras e hibridaron con un excedente de ADNc testigo desnaturalizado, se dejó incubar toda la noche a 68°C, el mismo paso anterior se realizó pero a la población testigo (reacción 2) con el adaptador 1 y 2 se adicionó

un exceso de ADNc problema (5 μ g) y después se mezclan con un exceso de ADNc problema; luego se realizó un PCR para amplificar los ADNc que representaban genes expresados diferencialmente (la reacción 1 determina los genes que se expresan y la reacción 2 los genes que se apagan en condiciones protegidas). Un segundo PCR se realizó con oligonucleótidos anidados (1 R y 2 R) para reducir el nivel de amplificación inespecífica (Clontech PCR-Select™ ADNc subtraction kit). Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis y los fragmentos de 500, 750 y 1 000 pb se cortaron del gel de agarosa usando un bisturí estéril y se purificaron con un protocolo QIAEXII (Qiagen, Hilden, Alemania). Clonación y selección de fragmentos sustraídos de ADNc se ligaron 2 μ L de los fragmentos de ADNc amplificados por PCR con 1 μ L del vector de clonación pCR4-TOPO según las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se transformaron 2 μ L de estas reacciones de ligación en 50 μ L de células químicamente competentes de *Escherichia coli* cepa TOPO4. El cultivo de transformación se sembró en cajas de Petri en medio Luria Bertani (LB)/kanamicina y las colonias se cultivaron en medio LB/kanamicina/ampicilina, E incubaron 16 h a 37°C y 250 rpm. En los plásmidos se analizó la presencia de insertos usando la enzima de restricción *Eco*-RI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cada colonia modificada se cultivó separadamente en el mismo medio y las mismas condiciones, se preservaron en viales criogénicos conteniendo 500 μ L de cada cultivo y 500 μ L de glicerol 100% esterilizado. La colección de colonias modificadas (biblioteca de genes expresados diferencialmente) se almacenó a -80°C.

V.2.6 Secuenciación del ADNc y comparación con bases de datos

Las secuencias de nucleótidos de los genes inducidos en condiciones protegidas del timbe, se determinaron usando un secuenciador ABI PRISM 310 (Gene Analyzer; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Se analizaron inicialmente las secuencias en el VecScreen para delimitar el tamaño de los genes que se buscaban y eliminar secuencias que pudieran pertenecer al vector de clonación.

Posteriormente, se hizo el análisis de comparación de secuencias con bases de datos realizados con el algoritmo Blastx (Basic Local Alignment Search Tool, por su nombre en inglés) (Altschul y col., 1990), del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por su nombre en inglés).

VI. RESULTADOS

VI.1 Detección e identificación de compuestos bioactivos

VI.1.1 Concentración de compuestos fenólicos

En el Cuadro 1 se muestra el rendimiento de los extractos de las vainas de ambas especies, obteniéndose mejor rendimiento para los métodos de extracción de infusión y Soxhlet para timbe 7.17% y 7.89% respectivamente, mientras que para tepame 14.08% y 9.98% respectivamente.

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos por cada 100 g de muestra (tepame) y por cada 50 g de muestra (timbe).

Especie	Método de extracción	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
Tepame	Infusión	14.0842	14.08
	Soxhlet	9.9783	9.98
	Maceración	1.79648	1.80
Timbe	Infusión	3.58264	7.17
	Soxhlet	3.94704	7.89
	Maceración	3.182	6.36

De manera general, como se indica en el Cuadro 2, se observa que para ambas especies se obtuvo mayor concentración de fenoles totales en la extracción por maceración, con 37.8 ± 0.68 y 88.87 ± 5.65 mg GAE/g extracto para tepame y timbe respectivamente. También para flavonoides totales se reportó mayor concentración con el método de maceración con 76.49 ± 8.92 y 127.19 ± 5.28 mg CE /g extracto para tepame y timbe respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido total de fenoles y flavonoides por gramo de extracto.

Nombre científico/ nombre común	Método de extracción	Fenoles**	Flavonoides***
<i>Acacia pennatula</i> (Tepame)	Maceración	37.87 ± 0.68 ^a	76.49 ± 8.92 ^a
	Soxhlet	13.06 ± 1.3 ^b	51.75 ± 0.24 ^b
<i>Acaciella angustissima</i> (Timbe)	Maceración	88.87 ± 5.65 ^a	127.19 ± 5.28 ^a
	Soxhlet	99.10 ± 7.82 ^a	114.49 ± 2.95 ^a

** Concentración de fenoles expresada en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extracto.

*** Concentración de Flavonoides en mg equivalentes de (+)-catequina (CE)/g extracto.

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes ± SD. Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

VI.1.2 Perfil de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de timbe y tepame

El contenido de flavonoides y fenoles de cada extracto metanólico se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para esto lo primero que se hizo fue el análisis de los estándares (Figura 10), una mezcla de distintos compuestos fenólicos potencialmente importantes y con alta probabilidad de hallarse en los extractos metanólicos de timbe y tepame.

De todos los compuestos fenólicos que se analizaron se observó niveles detectables de ácido protocatecuico, ácido gálico, (+)-catequina, ácido *p*-cumárico y luteolina en las muestras de maceración de tepame, así como ácido protocatecuico, (+)-catequina y ácido cumárico para los extractos metanólicos de timbe (Figura 11 y 12). Estos compuestos se cuantificaron a excepción de ác. *p*-cumárico debido a su baja absorbancia (Tabla 4).

En la Figura 11 se observa en negro el cromatograma de la mezcla de estándares y de azul la muestra de tepame macerado, de la misma manera se observa en la Figura 12 en negro el cromatograma de la mezcla de estándares y en rojo la muestra de timbe macerado. La concentración y tipo de compuestos detectados en los extractos metanólicos de las vainas se muestran en el Cuadro 3.

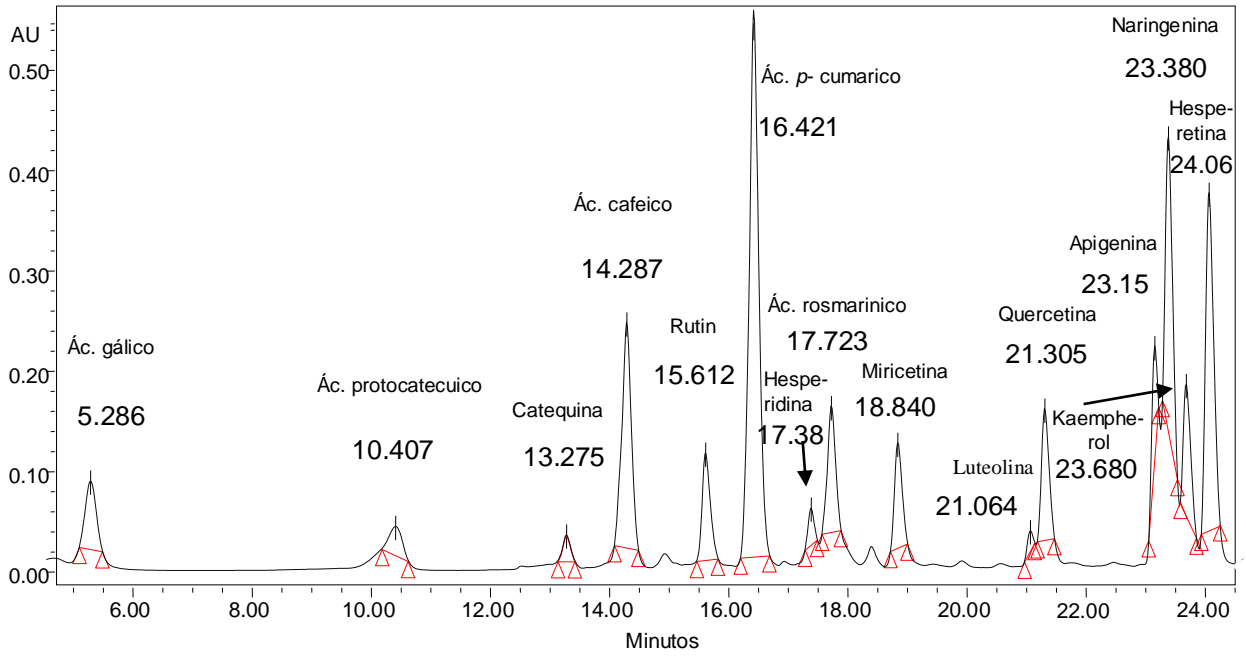


Figura 10. Cromatograma de la mezcla de estándares.

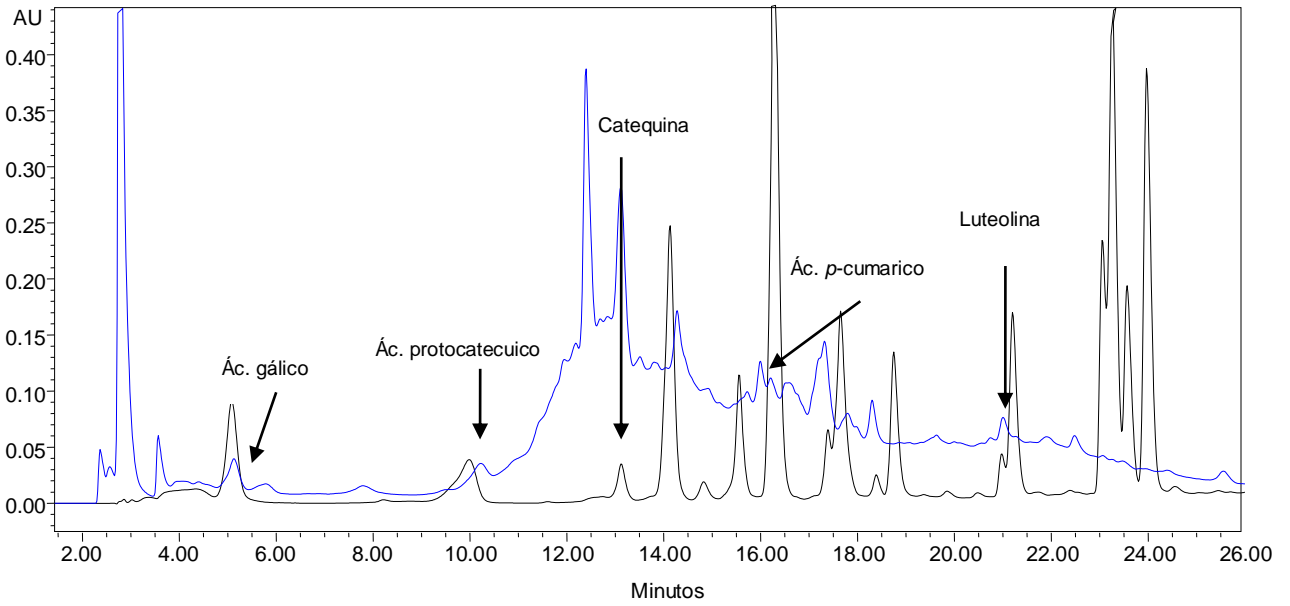


Figura 11. Cromatograma de la muestra de tepame.

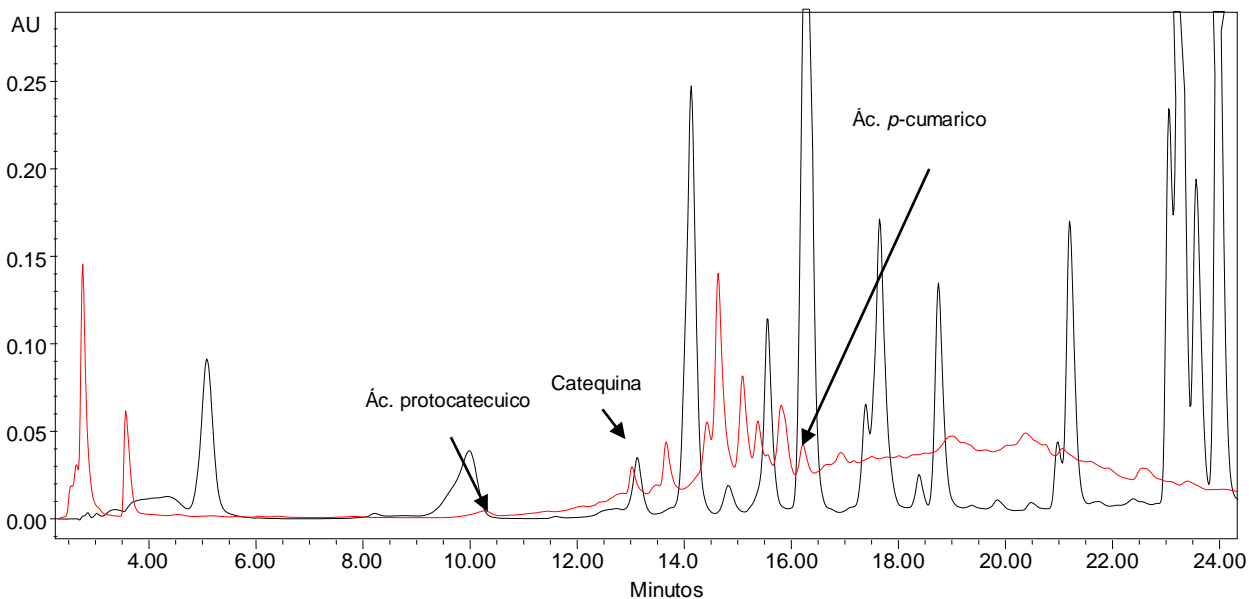


Figura 12. Cromatograma de la muestra de timbe.

El compuesto que se encontró en mayor concentración en las muestras de tepame extraídas por Soxhlet y maceración fue (+)-catequina con $23\,493.75 \pm 12.3$ y $1\,059.62 \pm 1.28 \mu\text{g/g}$ de extracto respectivamente. En timbe solamente se pudo cuantificar el ácido protocatecuico de las muestras metanólicas de Soxhlet y Maceración con 178.33 y $197.33 \mu\text{g/g}$ de extracto respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido de los diferentes compuestos fenólicos en los extractos metanólicos.

Extracto	Ácido protocatecuico*	Ácido Gálico*	(+)-catequina*	Luteolina*
Timbe Soxhlet	178.33	-	-	-
Maceración	197.33	-	-	-
Tepame Soxhlet	703.97 ± 0.88^b	674.77 ± 0.65^a	$23,493.75 \pm 12.38^a$	75 ± 0.47^a
Maceración	861.54 ± 1.10^a	625 ± 0.82^b	$1,059.62 \pm 1.28^b$	52.88 ± 0.84^b

* Concentración del compuesto fenólicos respectivo expresado en $\mu\text{g/g}$ de extracto. Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes \pm SD. Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

VI.2 Evaluación de la capacidad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana *in vitro*

VI.2.1 Capacidad antioxidante

La concentración inhibitoria media (CI_{50}) nos indica la concentración necesaria de muestra objeto de estudio, suficiente para inhibir a la mitad la respuesta evaluada; a valores mayores de CI_{50} disminuye la potencia de estos compuestos, pues es necesaria una alta concentración para observar el mismo efecto.

El ácido gálico y el Trolox, son potentes antioxidantes que se utilizaron como estándares en el ensayo y presentaron bajos valores de CI_{50} para las técnicas de ABTS y DPPH. En el caso de las muestras de timbe y tepame los valores más bajos de CI_{50} corresponden a las muestras obtenidas mediante maceración con $152.1 \pm 1.05 \mu\text{g/mL}$ para tepame y $110.3 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$ para timbe, pero en comparación con la CI_{50} de los estándares la diferencia es significativa (Cuadro 4).

Los extractos metanólicos fueron evaluados en la técnica de FRAP, ensayo que determina el poder reductor del extracto. Se determinó que el extracto con mayor capacidad reductora corresponde a la muestra de maceración con 1.85 ± 0.06 mmol de FeSO_4 / g extracto para tepame y 2.77 ± 0.08 mmol de FeSO_4 / g extracto para timbe. A mayor valor de mmol de FeSO_4 / g de extracto que se obtenga mejor es la capacidad del extracto para reducir el ion Fe^{3+} .

VI.2.1 Evaluación de la capacidad antimutagénica y mutagénica

Por último, los compuestos metanólicos de las vainas de timbe y tepame no presentan actividad antimutagénica o tóxica en las cepas TA 98 y TA 100, ya que el número de colonias revertantes fue similar al control negativo DMSO 100 ± 2.6 colonias revertantes/caja y NaCl (0.9%) 162 ± 2.58 colonias revertantes/caja para TA 98, por otro lado para tepame se observó una ligera disminución de colonias

revertantes frente al control negativo DMSO 100 ± 3.6 colonias revertantes/caja y NaCl (0.9%) 162 ± 2.48 colonias revertantes/caja.

Cuadro 4. Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos para las técnicas evaluadas.

Especie	Método de extracción	ABTS*	DPPH**	FRAP***
Tepame	Maceración	152.1 ± 1.05^b	411.8 ± 1.05^b	1.85 ± 0.06^a
	Soxhlet	194.6 ± 1.07^a	550.5 ± 1.04^a	1.77 ± 0.07^a
Timbe	Maceración	$110.3 \pm 1.09c$	$349.1 \pm 1.03b$	$2.77 \pm 0.08a$
	Soxhlet	$149.5 \pm 1.09d$	$364.6 \pm 1.04a$	$2.05 \pm 0.04b$
Ácido gálico		$15.39 \pm 1.04d$	$33.1 \pm 1.03d$	
TROLOX		$43.90 \pm 1.03c$	$104.2 \pm 1.02c$	

* Cl_{50} expresado en $\mu\text{g/mL}$.

** Cl_{50} expresado en $\mu\text{g/mL}$.

*** mmol FeSO_4/g extracto.

nd= no determinado.

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes \pm SD.

Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

El Cuadro 5 muestra los resultados obtenidos de la capacidad antimutágena de los extractos metanólicos de tepame contra los mutágenos 4-nitro-o-fenilendiamina y azida de sodio, evaluados en las cepas de *Salmonella thyphimurium* TA 98 y TA 100, respectivamente.

Extracto metanólico de tepame contra 4-nitro-o-fenilendiamina en la cepa *Salmonella thyphimurium* TA 98.

Se observa que la inhibición no fue dosis-dependiente en las concentraciones menores probadas donde 0.007, 0.155, 0.31 y 0.625 mg/mL de extracto, alcanzan porcentajes de inhibición de 71.04, 68.74, 70.70 y 69.85% respectivamente; mientras que para las concentraciones de 1.25 y 2.5 mg/mL de extracto muestran un incremento de aproximadamente 10 unidades con 78.41 y 77.87%. En la máxima concentración probada de 5 mg/mL extracto, la inhibición fue de 83.82%.

Cuadro 5. Capacidad antimutagénica y mutagénica de los extractos metanólicos de tepame.

		Flavonoides**	No. Colonias Revertantes	Inhibición (%)	
TA 98 4-nitro-o-fenilendiamina¹		-----	651± 33.06		
	TEPAME*	0.077	0.0059	189±3.5 ^a	71.04
		0.155	0.0118	204 ± 3.3 ^a	68.74
		0.31	0.024	191 ± 7.54 ^a	70.70
		0.625	0.048	196 ± 3.76 ^a	69.85
		1.25	0.096	141 ± 4.97 ^b	78.41
		2.5	0.191	119 ± 15.69 ^{bc}	81.77
		5.0	0.382	105 ±19.13 ^c	83.82
TA 100 Azida de sódio¹		-----	761 ± 6.34		
	TEPAME*	0.077	0.0059	334 ± 6.73 ^a	56.11
		0.155	0.0118	335 ± 2.75 ^a	55.9
		0.31	0.024	336 ± 6.37 ^a	55.8
		0.625	0.048	330 ± 10.35 ^a	56.66
		1.25	0.096	246 ± 4.32 ^b	67.67
		2.5	0.191	146 ± 9.53 ^c	80.81
		5.0	0.382	135 ± 6.14 ^c	82.22

¹Concentración del mutágeno 2 mg/mL

* mg de extracto/mL

** mg equivalentes de ácido gálico/extracto

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes ± SD.

Tres placas se evaluaron por dosis y por cada experimento.

Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Extracto metanólico de tepame contra azida de sodio en la cepa *Salmonella thyphimurium* TA 100.

Las primeras cuatro concentraciones al igual que para TA 100, no mostraron inhibición de una manera dosis-dependiente. Sin embargo, las siguientes concentraciones 1.25 y 2.5 mg/mL de extracto aumentaron 67.67 y 80.81%, para la máxima concentración probada 0.5 mg/mL extracto mostró una inhibición de 82.22%.

Por su parte el Cuadro 6 muestra los resultados de la capacidad antimutagénica de los extractos metanólicos de timbe contra los mutágenos 4-nitro-o-fenilendiamina y azida de sodio, evaluados en las cepas de *Salmonella thyphimurium* TA 98 y TA 100, respectivamente.

Extracto metanólico de Timbe contra 4-nitro-o-fenilendiamina en la cepa *Salmonella thyphimurium* TA 98.

Se mostró una dosis-dependencia después de la tercera concentración, las cuales fueron las siguientes 0.31, 0.625, 1.5 y 2.5 mg/mL de extracto, presentando capacidad de inhibición de 37.0, 46.74, 63.33 y 71.73% respectivamente. Por último, la máxima concentración evaluada 5 mg/mL alcanzó una inhibición de 80.33%.

Extracto metanólico de Timbe contra azida de sodio en la cepa *Salmonella thyphimurium* TA 100.

Al igual que en la cepa de *Salmonella thyphimurium* TA 98, se observa una dosis-dependencia en las concentraciones 0.31, 0.625, 1.5 mg/mL de extracto, con 37.9, 55.62, 63.56% de inhibición respectivamente. Las ultimas 2 concentraciones 2.5 y 5.5 mg/mL de extracto, fueron las que mejor capacidad antimutagénica mostraron y su comportamiento fue muy similar, con un 77.57 y 77.39% de inhibición respectivamente.

Cuadro 6. Capacidad antimutagénica y mutagénica de los extractos metanólicos de timbe.

		Flavonoides**	No. Colonias Revertantes	Inhibición (%)	
TA 98 4-nitro-o-fenilendiamina¹		-----	651 ± 33.06		
	TIMBE*	0.077	0.009	484 ± 8.5 ^a	25.72
		0.155	0.019	492 ± 12.98 ^a	24.42
		0.31	0.039	410 ± 34.89 ^{ab}	37.0
		0.625	0.0795	347 ± 21.85 ^b	46.74
		1.25	0.159	239 ± 11.85 ^c	63.33
		2.5	0.318	184 ± 6.11 ^{cd}	71.73
		5.0	0.636	128 ± 10.06 ^d	80.33
TA 100 Azida de sódio¹		-----	761 ± 6.34		
	TIMBE*	0.077	0.009	424 ± 6.65 ^a	44.34
		0.155	0.019	424 ± 11.09 ^{ab}	44.34
		0.31	0.039	473 ± 44.36 ^{ab}	37.9
		0.625	0.0795	338 ± 15.45 ^{bc}	55.62
		1.25	0.159	277 ± 33.65 ^{cd}	63.56
		2.5	0.318	171 ± 0.67 ^d	77.57
		5.0	0.636	172 ± 6.11 ^d	77.39

¹Concentración del mutágeno 2 mg/mL.

* mg de extracto/mL.

** mg equivalentes de ácido gálico/extracto.

Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes ± SD.

Tres placas se evaluaron por dosis y por cada experimento.

Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

VI.2.1 Evaluación de la capacidad antifúngica

Los resultados de la capacidad antifúngica que se observan en el Cuadro 7, muestran que para el caso de *Acacia pennatula* contra *Fusarium oxysporum* no hubo capacidad inhibitoria en las primeras dos concentraciones 25 y 50 mg/mL, las siguientes 100, 200 y 300 mg/mL inhibieron en 9.5 ± 0.5 , 10.6 ± 0.7 y $13.7 \pm 0.5\%$, y la máxima concentración de 400 mg/mL presentó una inhibición de $21.1 \pm 0.3\%$.

En el caso *Acacia pennatula* contra *Phytophthora capsici* se presentó un aumento del crecimiento micelial en *Phytophthora capsici* que alcanzó un 13% a la máxima concentración de 400 mg/mL extracto (Datos no mostrados). En el caso de *Acaciella angustissima* contra *Fusarium oxysporum* la inhibición del crecimiento micelial se observó hasta la concentración de 200 mg/mL con $14.8 \pm 0.6\%$ y a 300 mg/mL se obtuvo una inhibición de $17.9 \pm 0.8\%$ alcanzando la mayor actividad a 400 mg/mL con $29.5 \pm 0.7\%$.

Por último, *Acaciella angustissima* contra *Phytophthora capsici*, mostró inhibición del crecimiento micelial de $15.5 \pm 0.6\%$ para 300 mg/mL y la máxima concentración evaluada alcanzó $28 \pm 0.2\%$.

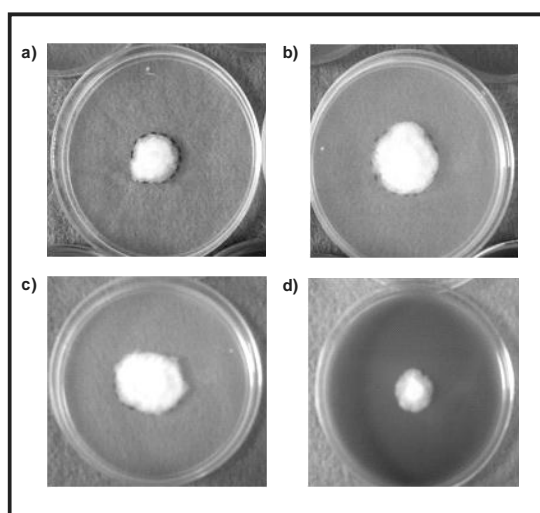


Figura 13. Inhibición del crecimiento micelial de *A. angustissima* contra *P. capsici* por la técnica del alimento envenenado, a) control con DMSO, b) control sin DMSO, c) tepame 25 mg CE/mL y d) timbe 400 mg CE/mL.

Cuadro 7. Efecto de los extractos metanólicos en la inhibición del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos.

	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>
<i>A. pennatula</i> ***		
25	0 ^d	0**
50	0 ^d	0
100	9.5±0.5 ^c	0
200	10.6±0.7 ^c	0
300	13.7±0.5 ^b	0
400	21.1±0.3 ^a	0
<i>A. angustissima</i>***		
25	0 ^d	0 ^d
50	0 ^d	0 ^d
100	0 ^d	0 ^d
200	14.8±0.6 ^c	0 ^d
300	17.9±0.8 ^b	15.5±0.6 ^b
400	29.5±0.7 ^a	28±0.2 ^a

* Inhibición del crecimiento micelial de acuerdo con el método del alimento envenenado (Veloz-García y col., 2010).

** Los compuestos fenólicos de los extractos metanólicos de *A. pennatula* en vez de inhibir el crecimiento micelial a las concentraciones evaluadas, se observa un incremento significativo del 13%. *** La cantidad de compuestos fenólicos se expresa como µg equivalentes de (+)-catequina (CE)/mL de medio papa dextrosa agar (PDA). Los resultados son el promedio de 3 ensayos independientes ± SD. Las letras indican la diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).

VI.3 Perfil transcriptómico de timbe crecida bajo condiciones protegidas

VI.3.1 Banco de genes de Hibridación Sustractiva por Supresión (HSS)

VI.3.1.1 Extracción y purificación de ARN

Se extrajo el ARN a las muestras de timbe (tm) crecidas bajo condiciones normales y protegidas, se comprobó la presencia de éste mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se comprobó su integridad (Figura 14).

VI.3.1.1 Síntesis, amplificación y purificación de ADN complementario (ADNc)

Se determinó con una parte de las muestras el número de ciclos óptimos que son

necesarios para obtener la amplificación de la cadena de una manera eficaz, analizando las muestras en gel de agarosa 1%, la amplificación se llevó a cabo en un rango de 15 - 45 ciclos, cada 5 ciclos (Figura 15).

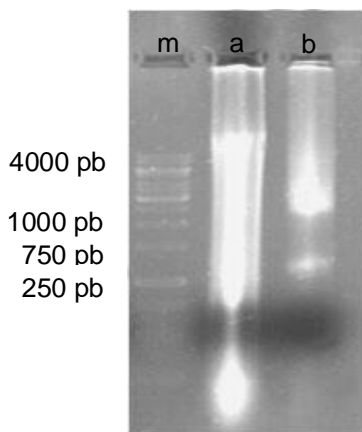


Figura 14. Integridad del ARN de timbe, donde m) marcador, a) timbe control y b) timbe problema.

Una vez determinado el ciclo óptimo que fue de 45 ciclos, se procedió a la amplificación del ADNc en estas condiciones y se comprobó su presencia en un gel de agarosa 1%; después se realizó la purificación con las columnas CROMA-SPIN 1000 de Clontech en las cuales se realizaron varios lavados (Figura 16).

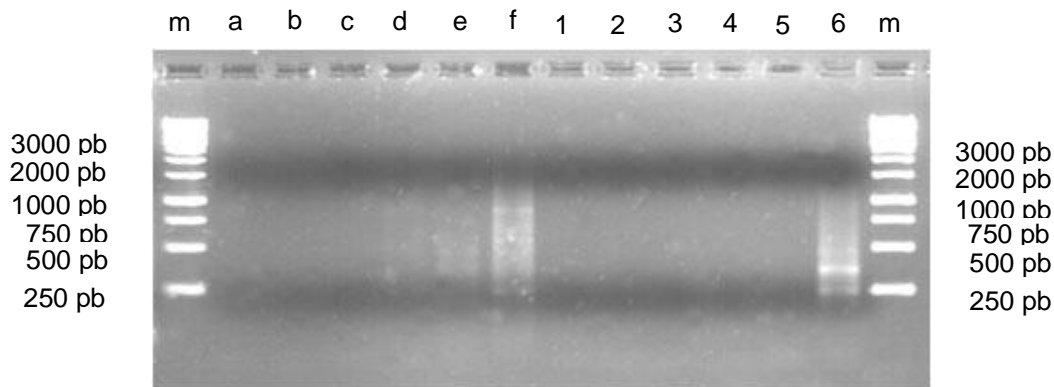


Figura 15. Gel de electroforesis que muestra la optimización de ciclos, se muestra en las columnas a) y 1) el ciclo 15, en b) y 2) el ciclo 20, en c) y 3) el ciclo 25, en d) y 4) el ciclo 30, en e) y 5) el ciclo 35, en f) y 6) el ciclo 40, de las columnas a) - f) es timbe normal y de 1) - 6) timbe protegido, la columna m) corresponde al marcador de tamaño.

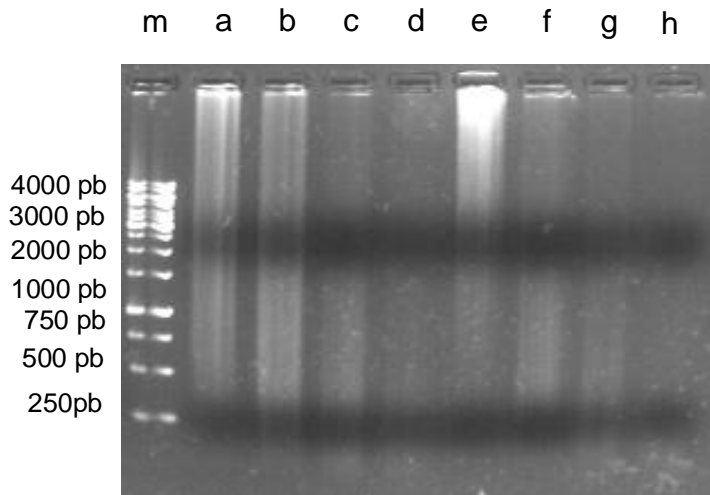


Figura 16. Gel de electroforesis mostrando la purificación del ADNc, donde m) corresponde al marcador de tamaño, a) lavado B, b) lavado C, c) lavado D y d) lavado E de tmC y e) lavado B, f) lavado C, g) lavado D y h) lavado E de tmP.

VI.3.1.2 Aislamiento de fragmentos de ADNc expresados diferencialmente

Una vez obtenido el ADNc purificado, este se digirió con la enzima Rsa I y se comprobó la presencia de los fragmentos de ADN en la muestra. Posteriormente a las muestras se les colocó los adaptadores 1 y 2.

Se realizó la primera hibridación de éste con ADNc control desnaturalizado y se sometieron a dos PCR para amplificar los fragmentos de ADN que contienen genes expresados diferencialmente con oligonucleótidos anidados para reducir inespecificidad. El producto de esta reacción se corrió en un gel de electroforesis (Figura 17).

Los fragmentos cortados se purificaron del gel de agarosa 1% para extraer el ADN y posteriormente se insertó en el vector de clonación 4-TOPO, para clonarlo en células *E. coli* electrocompetentes las cuales fueron crecidas en medio LB, después se realizó la extracción del ADN plasmídico y se verificó su presencia en un gel de agarosa 1% (Figura 18). Las colonias transformadas se incubaron nuevamente para someterlos a una digestión con la enzima de restricción Eco-RI y

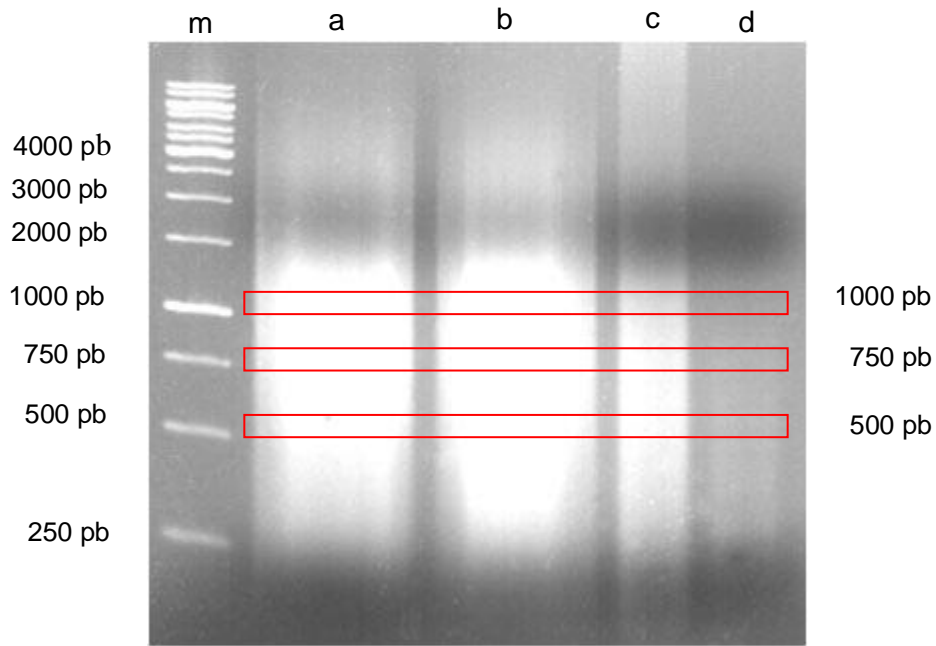


Figura 17. PCR de la segunda hibridación, se muestra m) marcador de tamaño de ADN a) tm 1/1, b) tm 2/1, c) control 1 y d) control 2. De este gel se cortaron los fragmentos que correspondían a 500, 750 y 1 000 pb.

se confirmó la inserción de los genes en el plásmido 4-TOPO en un gel de agarosa 1%, que muestra un fragmento

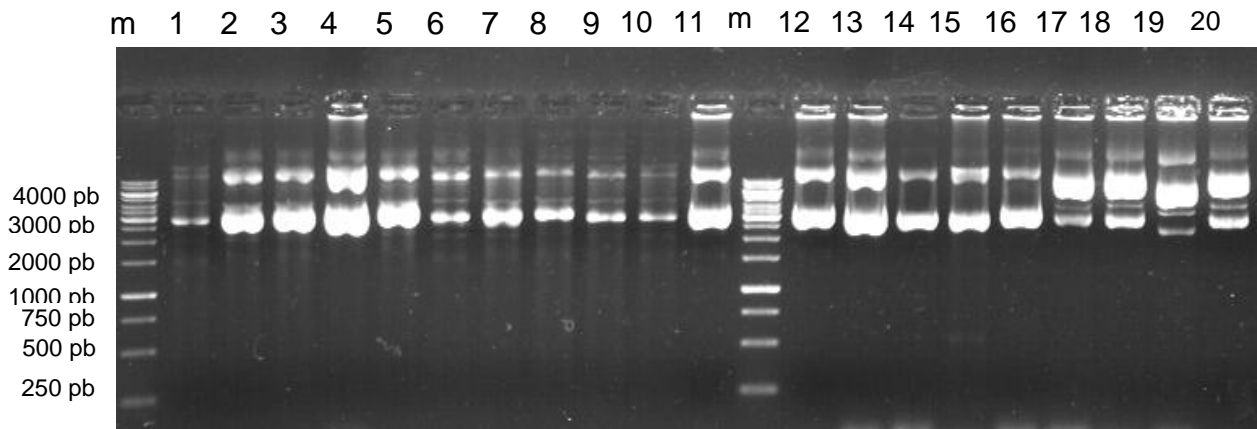


Figura 18. Gel de electroforesis del miniprep de las colonias transformadas: m) marcador, 1 - 20) ADN plasmídico.

a 4 000 pb que corresponde al vector 4-TOPO y otro fragmento menor peso molecular que corresponde al inserto de ADN entre 250 pb a 1 000 pb (Figura 19).

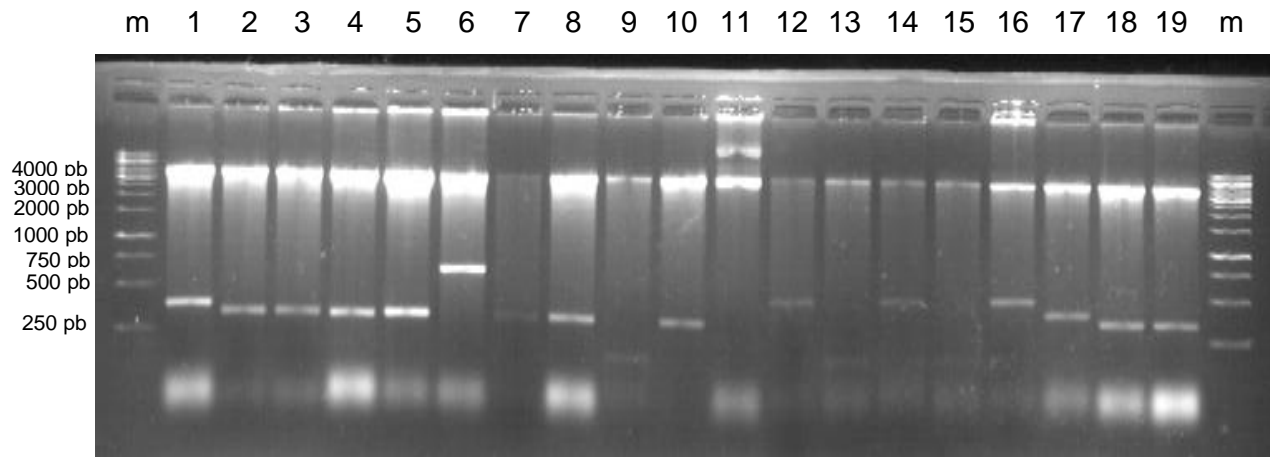


Figura 19. Gel de digestión con *Eco*-RI del vector de clonación 4-TOPO, m) marcador, 1 - 19) Inserto de 250 – 750 pb.

Fueron seleccionadas arbitrariamente y secuenciadas 51 clonas de un total de 200, mayores a 250 pb. Las secuencias se analizaron en dos programas bioinformáticos del NCBI (VecSreen y Blastx), encontrando genes que codifican para diferentes proteínas.

Las proteínas encontradas en la base de datos del NCBI, a partir de las secuencias de los genes, se clasificaron como estructurales, metabólicas, hipotéticas y desconocidas.

La Figura 20 muestra el porcentaje de la cantidad de proteínas según su clasificación, encontrándose que 36% de las proteínas, desempeñan una función conocida (estructurales, metabólicas y ortólogas con un porcentaje de 6, 16 y 14% respectivamente), las secuencias de función desconocida fueron las que mayor porcentaje presentaron con un 43%, mientras que las proteínas hipotéticas representan el 21% del total. Por otro lado, en el Cuadro 8, se muestran aquellas secuencias de función conocida de mayor interés, según las condiciones de crecimiento de los individuos y las funciones que desempeñan.

Cuadro 8. Secuencias de genes con mayor interés según las condiciones evaluadas, obtenidas de la base de datos del NCBI.

Clona	GenBank No. De acceso	Semejanza de Gen	Posible función
1/1 1000 14	XP_002912185.1	ATP-binding cassette transporter	Transportador transmembranal formado por enzimas acopladas a ATP
1/1 1000 20	ZP_04709664.1	Hypothetical protein SrosN1_16960	Desarrollo y Adaptación en condiciones de estrés
1/1 1000 50	YP_001308011.1	Ammonium transporter	Proveen a la planta de nitrógeno a través del plasma
1/1 1000 52	ZP_05000632.1	Type I PKS	Sintetizan lípidos con actividad antibiótica, antifúngica, inmunosupresivo
2/1 750 2	XP_002711897.1	Cold shock domain protein A short-like	Funcionan como chaperonas ayudando al plegamiento de ARN ante estrés al frío
2/1 750 8	XP_648644.1	Ubiquitin ligase	Regulan la síntesis de proteínas bajo condiciones de estrés al frío

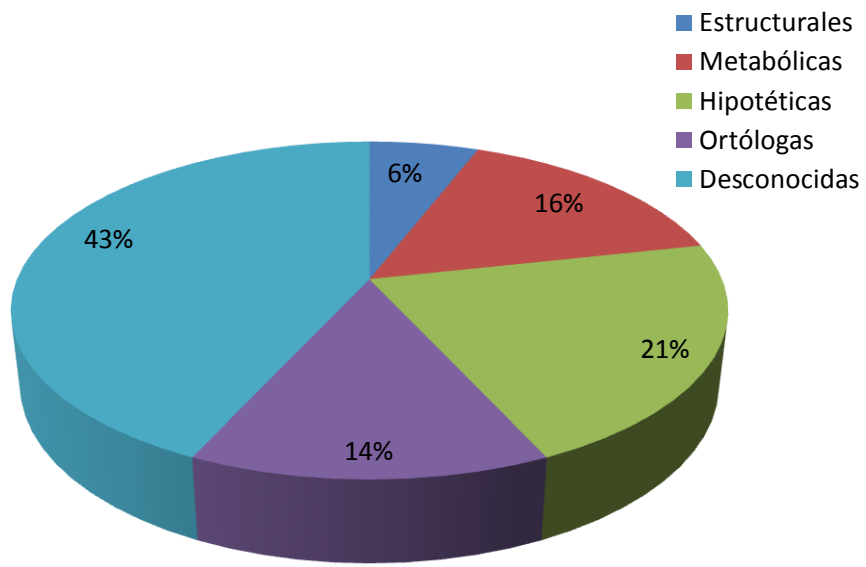


Figura 20. Clasificación de las proteínas encontradas en la base de datos del NCBI: estructurales, metabólicas, hipotéticas y desconocidas.

VII. DISCUSIÓN.

VII.1 Detección e identificación de compuestos bioactivos en los extractos de vaina de ambas especies

VII.1.1 Concentración de compuestos fenólicos

La familia *Fabaceae*, contiene una gran diversidad de compuestos, entre los que principalmente se encuentran: diversos tipos de alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, fenilpropanoides, antraquinonas, terpenos y lectinas (Arabi y Sardari, 2010). Por esta razón creemos que estas especies pudieran ser una fuente alternativa de nuevos agentes terapéuticos.

El objetivo de extraer compuestos fenólicos del material vegetal, es con la finalidad de liberarlos de las estructuras vacuolares donde son almacenadas. Las constantes que determinan la extracción de estos compuestos son la temperatura, pH, tipo de solvente, método de extracción y tamaño de partícula principalmente (Escribano-Bailión y Santos-Buelga, 2003).

El mejor rendimiento de extracción para tepame fue el de infusión (4.08 %), esto posiblemente se deba a la gran cantidad de polisacáridos presentes en esta especie, de acuerdo a Terrones- Rincón (2006) la corteza y las vainas de la subfamilia *Mimosoideae* a la cual pertenece esta especie pueden presentar gomas que se utilizan como sustitutos de la goma arábiga y que son de importancia comercial.

En lo que respecta a timbe el mejor rendimiento de extracción fue Soxhlet (7.89%) ya que la extracción se realizó a una temperatura más alta que en el método de maceración. La solubilidad de compuestos fenólicos aumenta con la temperatura del solvente (en los dos métodos infusión y Soxhlet) y estas altas temperaturas

permeabilizan las membranas celulares y la solubilidad de los compuestos fenólicos (Escribano-Bailión y Santos-Buelga, 2003).

Este comportamiento está en correlación con los estudios realizados por Sultana y col., (2009) quienes observaron los mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos en los sistemas de extracción por el método de reflujo, donde se utiliza como solvente el metanol a altas temperaturas. Por otro lado, el método de agitación con metanol a temperatura ambiente mostró menor rendimiento. También señalan que se obtiene mayor cantidad de compuestos fenólicos en solventes altamente polares, ya que las mezclas acuosas metanol/ etanol (10:80) presentan mayor rendimiento.

En lo que respecta a la concentración de fenoles totales y flavonoides, se encontró una mayor concentración en las muestras extraídas por el método maceración en timbe (37.87 ± 0.68 (GAE)/g y 76.49 ± 8.92 (CE)/g de fenoles totales y flavonoides respectivamente) y tepame (88.87 ± 5.6 (GAE)/g y 127.19 ± 5.2 (CE)/g de fenoles totales y flavonoides respectivamente) (Cuadro 2). Probablemente esto se deba a que a pesar de que la temperatura aumenta la eficiencia de la extracción, también puede incrementar la degradación de los compuestos fenólicos (Escribano-Bailión y Santos-Buelga, 2003).

La concentración de fenoles y flavonoides de los extractos metanólicos de tepame mostraron diferencia significativa ($\alpha=0.05$), mientras que en los extractos metanólicos de timbe no se observa esta diferencia.

Al igual que en el presente estudio, Arias y col. (2004), reportaron mayor concentración de compuestos fenólicos, utilizando el método de maceración con metanol como solvente y menor concentración por el método de infusión.

Las vainas de la planta son una de las partes aéreas con menor contenido de compuestos fenólicos, contrario a la raíz, el tallo, las hojas y las flores que poseen mayor cantidad de compuestos fenólicos en timbe y tepame. Las vainas son estructuras que presentan senescencia característica del color café, este está presente en las hojas y otras partes de la planta, lo que indica la oxidación de compuestos fenólicos que se polimerizan, ejemplo de estos compuestos son los taninos (Lattanzio y col., 2006).

Se reporta que las vainas de ambas especies presentan gran cantidad de taninos utilizados en la industria para curtir pieles (Terrones-Rincón, 2006).

Se decidió hacer la colección de la muestra de las vainas debido a que esta parte de la planta puede ser una práctica menos invasiva, principalmente cuando se pretende proteger la integridad de especies que presentan baja abundancia y posibilidad de extinción.

VII.1.1 Perfil de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de timbe y tepame

Entre la gran variedad de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, existe una porción significativa de compuestos fenólicos y flavonoides, presentes en una gran variedad de estructuras y algunos se limitan a determinadas especies (Jaganath y Crozier, 2010).

En este estudio se detectó e identificó la presencia de compuestos fenólicos en las vainas de las especies *A. angustissima* y *A. pennatula* (Figura 11 y 12). De los compuestos identificados, aquellos que se pudieron cuantificar fueron un ácido fenólico, el ácido protocatecuico (del subgrupo de ácidos hidroxibenzoicos), presente en mayor concentración en los extractos metanólicos extraídos por el método de maceración en ambas especies.

Por otro lado, en tepame se identificó además la presencia de otro ácido fenólico, el ácido gálico (del subgrupo de ácidos hidroxibenzoicos) y la presencia de dos compuestos flavonoides, la (+)-catequina (del subgrupo flavan-3-ols) y luteolina (del subgrupo de las flavonas), identificados en mayor concentración en los extractos metanólicos extraídos mediante el método de Soxhlet. Al llevar a cabo la comparación de estos resultados con el contenido de fenoles totales y flavonoides, se podría sugerir que timbe contiene otro tipo de compuestos fenólicos que no fueron incluidos en los estándares utilizados para el análisis por HPLC (Cuadro 3). De los compuestos encontrados en *A. pennatula*, la catequina ya había sido previamente detectada en esta planta (Ríos, 2005).

VII.2 Evaluación de las características bioactivas de los extractos metanólicos

Los compuestos fitoquímicos como los fenoles poseen múltiples propiedades nutraceuticas como antioxidantes, antitumorales, anticarcinógenos, antimutágenos y antibacteriales. Estas propiedades han despertado el interés en el estudio y cuantificación de metabolitos secundarios del tipo fenoles en frutas y vegetales (Khammuang y Sarnthima, 2011).

VII.2.1 Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos

La capacidad protectora de los compuestos fenólicos y flavonoides en los sistemas biológicos, se presentan por la habilidad que poseen de transferir electrones libres (potencial redox), quelar metales, activar enzimas antioxidantes, inhibir oxidasas entre otros (Masoumeh, 2009).

Se evaluó la capacidad antioxidante que poseen los extractos metanólicos para reducir el anión ABTS 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), y se encontró que las dos especies presentaron capacidad para reducir el radical de una manera dosis-dependiente en los tres métodos, los valores más bajos de CI_{50} de las técnicas ABTS y DPPH, así como el mayor poder reductor de la prueba FRAP corresponden a los extractos metanólicos de maceración con $110.3 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$, $349.1 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ y $2.77 \pm 0.08 \text{ mmol FeSO}_4/\text{g}$ de extracto respectivamente (Cuadro 4).

Confirmándose también la relación con el contenido de compuestos fenólicos, ya que aquellos extractos metanólicos que poseen mayor concentración de compuestos fenólicos, fueron los que mejor capacidad antioxidante presentaron.

Sin embargo en las pruebas de ABTS y DPPH, la CI_{50} de los extractos metanólicos de timbe extraídos por el método de maceración, a pesar de que presentaron mayor capacidad antioxidante, comparado con el estándar ácido gálico ($15.39 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$ y $33.1 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ para los ensayos ABTS y DPPH respectivamente) es casi 10 veces mayor y en lo que respecta a Trolox ($43.90 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ y $104.2 \pm$

1.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los ensayos ABTS y DPPH respectivamente) un homólogo de la Vitamina E, es casi 3 veces mayor (Cuadro 4).

De acuerdo con Melo y col., (2010); la actividad antioxidante puede ser clasificada en:

- Capacidad antioxidante alta, arriba de tres veces la concentración inhibitoria del estándar.
- Capacidad antioxidante moderada, entre 3 y 7 veces la concentración inhibitoria del estándar.
- Capacidad antioxidante baja, excede 7 veces la concentración inhibitoria estándar.

Teniendo en cuenta lo anterior, si tomamos como estándar el ácido gálico, los extractos tanto de timbe como de tepame poseen capacidad antioxidante baja, ya que muestran una CI_{50} mayor a 7 veces la CI_{50} del estándar (107.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 231.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las técnicas ABTS y DPPH respectivamente). Por otro lado, si se toma como estándar el Trolox, los dos extractos tanto de timbe como tepame muestran capacidad antioxidante media ya que los valores de CI_{50} se encuentran entre 3 y 7 veces la CI_{50} del estándar (131.7 – 307.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 312.6 – 729.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las técnicas ABTS y DPPH respectivamente), a excepción del extracto de timbe macerado el cual muestra capacidad antioxidante alta ya que su actividad es menor a 3 veces la CI_{50} del estándar.

En los ensayos de ABTS y DPPH, se utilizó como estándares los compuestos ácido gálico y Trolox, este último es el que se utiliza comúnmente para reportar la capacidad antioxidante equivalentes de Trolox. Por otro lado en el ensayo FRAP el estándar más conveniente a utilizar es FeSO_4 , ya que en el ensayo se mide la presencia de Fe^{2+} reducido (mmol de Fe^{2+} / g de extracto). Se observó diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre los tratamientos a excepción del ensayo FRAP para los extractos metanólicos de tepame (Cuadro 4).

El poder reductor evaluado en los ensayos ABTS, DPPH y FRAP es utilizado ampliamente para medir la capacidad antioxidante de los polifenoles. La propiedad

reductora esta generalmente asociada a la presencia de agentes reductores, que ejercen acción antioxidante rompiendo las cadena de radicales libres vía donación de moléculas de hidrogeno o electrones. Estos agentes también previenen la formación de peróxidos reaccionando con precursores de los mismos (You y col., 2007). Otro posible mecanismo es vía quelación de metales y la restricción de la accesibilidad de iones metálicos a la reacciones fenton (Simić, y col., 2007). Algunos estudios han sugerido, que los extractos o compuestos que exhiben capacidad para inhibir el radical DPPH puede ser considerado como antioxidantes primarios, desde que esos compuestos actúan como donadores de electrones e interrumpen las reacciones en cadena (Tabosa y col., 2011).

La capacidad antioxidante de los flavonoides está determinada por la presencia de la estructura *o*-dihidroxi en el anillo B, que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; una doble ligadura en conjunción con la función 4-oxo del anillo C, y los grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Valko y col., 2006). Tomando en cuenta lo anterior, los compuestos flavonoides luteolina y (+)-catequina son los compuestos identificados en los extractos metanólicos, que pudieran proveer una importante capacidad antioxidante a los extractos metanólicos de tepame. Reportes indican que la luteolina posee potente capacidad antioxidante y antimicrobiana; sin embargo, ésta es menor a la quercetina, la cual cumple con todos los parámetros estructurales necesarios para ejercer un máximo potencial antioxidante (Liu y col., 2010).

En lo que respecta a los ácidos fenólicos, la actividad antioxidante depende del número y posición de los grupos hidroxilo (OH-), en relación al grupo funcional carboxilo (COOH-) (Balasundram y col., 2006). Lo anterior indica la actividad antioxidante del el ácido gálico está dado por los 3 grupos hidroxilo del anillo, en posición *para*- y *ortho*-, en relación con el grupo carboxilo, y del ácido protocatecuico con 2 sustituyentes hidroxilo, uno en posición *ortho*- y el otro en *para*-, este último compuesto presente sólo en el extracto metanólico de Timbe.

Los ácidos hidroxinámicos exhiben mejor capacidad antioxidante en comparación con los ácidos hidroxibenzoicos, ya que poseen un grupo CH=CH-COOH que le

confiere mayor capacidad de donar electrones y mayor estabilidad (Balasundram y col., 2006). En los cromatogramas se identificó un compuesto que pertenece al primer grupo, el cual no pudo ser cuantificado, este compuesto fue el ácido *p*-cumárico presente en extractos metanólicos de las dos especies.

La determinación de fenoles totales y flavonoides, el perfil de compuestos fenólicos y la evaluación de la capacidad antioxidante sólo se llevó a cabo para los extractos metanólicos extraídos por los métodos de Soxhlet y maceración. El extracto acuoso del método de infusión no se disolvió completamente en el metanol, solución utilizada en los ensayos para disolver los extractos.

VII.2.2 Evaluación de la capacidad antimutagénica

Existen varios compuestos que pueden actuar como antimutágenos y que ayudan a prevenir mutaciones a diferentes niveles ya sea interactuando directamente con el mutágeno, impidiendo el metabolismo del premutágeno, atrapando radicales libres, impidiendo la interacción con ADN en el núcleo o propician el auxilio de los sistemas de reparación del ADN (Nakamuray col., 2008).

En el ensayo de microsuspensión de Kado y col. (1983 y 1986), los compuestos fenólicos actúan como compuestos antimutagénicos de tres maneras: uno es inhibiendo los sistemas enzimáticos (por ejemplo la bioactivación a través de citocromo p450), atrapar los mutágenos electrofílicos, o evitando la translocación del mutágeno dentro del citosol interactuando con ellos (Pedrechi y Cisneros, 2006). En este estudio, los últimos 2 mecanismos mencionados pueden ser la forma en que actúan los extractos metanólicos, ya que no se adiciono a las muestras la fracción S9 que permite la activación metabólica de los premutágenos. De acuerdo a la teoría de Ames presentada en 1982, que indica que en caso de que el número de colonias en el medio de control positivo (con carcinógeno), sea dos veces mayor que en la muestra evaluada, la sustancia se puede considerar como antimutágena o anticancerígena. Lo anterior indica que cuando rango del porcentaje de inhibición se encuentra entre 25 - 40%, el efecto antimutagénico de la

muestra es media, pero cuando el porcentaje de inhibición es mayor a 40% el efecto antimutagénico en la muestra es potente, por el contrario si la capacidad de inhibición es menor que 25% el efecto es negativo (Entezari, 2009).

Tomando en cuenta lo anterior, los resultados de la prueba de microsuspensión que mostraron los extractos metanólicos de timbe y tepame, indican que poseen potente capacidad antimutagénica, siendo significativo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las cepas TA 98 Y TA 100 de *Salmonella thyphimurium* (Cuadro 5 y 6).

A pesar de que hubo mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos metanólicos de timbe (Cuadro 2), tepame mostro mejor capacidad antimutagénica, lo que sugiere que el ácido gálico y la luteolina contenidos en el extracto (Figura 24), juegan un papel importante como quimioprotector contra daños al ADN; Romanova y col., (2001), reportaron que la luteolina presenta mayor antimutagéncidad ejerciendo un efecto quimioprotectos en el DNA, en comparación con otros flavonoides como apigenina (AP) y la quercetina (QU).

Los resultados del extracto de tepame que se muestran en el Cuadro 5, sugieren que éste es un fuerte antimutágeno sobre mutaciones que cambian el marco de lectura del ADN, inducidas por 4-nitro-o-fenilenediamina en TA 98, observándose que no hay diferencia significativa entre las primeras cuatro concentraciones, llegando a la actividad máxima de 83.82% de inhibición. De la misma manera, es fuerte antimutágeno en mutaciones originadas por cambio en los pares de bases inducidas por la azida de sodio en TA 100, donde se observa el mismo comportamiento de las primeras tres concentraciones donde no hay diferencia significativa, llegando a una actividad máxima de 82.22%. También se observa una actividad inhibitoria similar en los extractos metanólicos para las cepas TA 98 y TA 100 (Cuadro 5).

Se ha reportado potencial antimutagénico de los compuestos (+)-catequina, ácido elágico y ácido gálico (Bhattacharia, 2011), mientras que Hour y col., (1999), sugieren que el ácido gálico se puede unir o insertar a transportadores de la membrana de la célula y bloquear la entrada del mutágeno al citosol (Satwinderjeet, 2010).

Por su parte, los resultados de timbe que se muestran en el Cuadro 6, sugieren que el extracto es un antimutágeno moderado en las tres primeras concentraciones evaluadas en las que no hubo diferencia significativa de la actividad, y fuerte antimutágeno para el resto de las concentraciones evaluadas sobre mutaciones de cambio en el marco de lectura inducidas por el mutágeno 4-nitro-o-fenilenediamina en TA 98 llegando a 80.33% de inhibición para la concentración de extractos metanólicos mas alta. En cambio, mostró ser fuerte antimutágeno en mutaciones de cambio en pares de bases inducidas por azida de sodio en TA 100, llegando a 77.39% de inhibición. No se muestra una diferencia significativa de la actividad entre las cepas TA 98 y TA 100 en la concentración más alta (Cuadro 6).

Se ha encontrado que gran variedad de taninos reducen la actividad mutagénica de gran número de mutágenos; este potencial anticancerígeno y antimutágeno se relaciona con sus propiedades antioxidantes, importante para proteger la célula del daño oxidativo, incluyendo la peroxidación de lípidos (Bhattacharia, 2011).

VII.2.3 Evaluación de capacidad antifúngica *in vitro*

Los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en la defensa de las plantas como antibióticos, que se sintetizados en plantas sanas, funcionan como barreras químicas contra herbívoros y hongos protegiendo contra un amplio espectro de organismos patógenos. Se estima que existen alrededor de 250 000 especies de plantas superiores, superando en seis veces el numero las especies de hongos con 1.5 millones; organismos que dependen de la fuente de carbono y energía que proveen las plantas, ya que como otros organismos son incapaces de llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (Lattanzio y col., 2006).

Se llevó a cabo la evaluación de la capacidad que tienen los compuestos contenidos en los extractos metanólicos, para inhibir el crecimiento los hongos fitopatógenos *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*. En los extractos metanólicos de timbe se detectó un comportamiento dosis-dependiente a partir de la concentración de 200 µg CE/mL contra el fitopatógeno *Fussarium oxysporum*,

alcanzando la más alta inhibición de $29.5 \pm 0.7\%$ para la máxima concentración evaluada del extracto. Para este mismo extracto se obtuvo a la máxima concentración evaluada una inhibición de $28 \pm 0.2\%$ contra el fitopatógeno *Phytophthora capsici* (Cuadro 7).

Por otra parte, en la evaluación del extracto de tepame contra *F. oxysporum* se observa una dosis-dependencia a partir de la concentración de $100 \mu\text{g CE/mL}$. Mientras que para este mismo extracto se promovió el crecimiento de *P. capsici*, en un 13% en las concentraciones evaluadas (datos no mostrados). El comportamiento anterior pudiera deberse a la gran cantidad de polisacáridos presentes en tepame, lo que interfiere con la actividad antifúngica de los compuestos fenólicos, anteriormente se mencionó que las especies de la familia *Mimosoideae* a la cual pertenece tepame, tienen compuestos sustitutos de la goma arábica.

Además se observó una mayor resistencia de inhibición de *P. capsici* frente a los extractos metanólicos, en comparación con *F. oxysporum*.

Los compuestos fenólicos tienen una mayor acción inhibitoria en microorganismos gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*), que las pertenecientes al grupo de las gram negativas y los hongos, (*Escherichia coli.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, etc.) se cree que este comportamiento se debe a las diferencias presentes en la estructura de la membrana celular (Arias, 2004).

Las del mecanismo de acción de los fenoles sobre su actividad antimicrobiana son por un lado, que los taninos inhiben el crecimiento de los microorganismos ya que forman complejos con las enzimas extracelulares, lo que impide la absorción de la fuente de alimento necesaria para su crecimiento y desarrollo (Scalbert, 1991). Otro mecanismo de acción es la capacidad que tienen para unirse a enzimas que sintetiza el microorganismo necesarias en su metabolismo a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa (Silva y Fernández, 2010). También se sugiere la unión de flavonoides a proteínas extracelulares o unión a la membrana celular promoviendo su desestabilización (Ciocan y Bara, 2007).

VII.3 Detección de los genes que producen los compuestos bioactivos en las diferentes condiciones de manejo

Entender el mecanismo de respuesta de las plantas frente a condiciones ambientales adversas, es el primer paso para la generación de especies tolerantes al estrés. En los últimos 20 años, un gran desarrollo se ha alcanzado en el área de la expresión genética. Estudios genómicos se han enfocado en procesos dinámicos como la transcripción, traducción, interacción entre genes y la relación existente con los fenotipos expresados (Pérez-Torres y col., 2009). Algunas técnicas empleadas para identificar los genes cuya expresión es diferencialmente regulada en respuesta a varios tipos de estrés en plantas superiores, incluyen la expresión diferencial-reacción en cadena de la polimerasa, hibridación sustractiva por supresión (HSS), análisis seriado de la expresión génica, microarreglos de ADN y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de ADNc amplificados (Rodríguez y col., 2005).

El estudio del mecanismo de adaptación al estrés en las plantas es muy complejo, ya que existen diferentes condiciones que encienden genes que se expresan específicamente y otros que forman parte de varias rutas ante un tipo de estrés. La mayoría de los experimentos están enfocados al estudio de un solo tipo de estrés por su facilidad para controlar las condiciones ambientales en cámaras de crecimiento e invernadero (Roy y col., 2011). Aunque en la actualidad se hace necesario evaluar las condiciones más parecidas a las condiciones de crecimiento en el campo, por ello la importancia de poder evaluar los genes expresados en condiciones de protegidas y a cielo abierto en timbe.

El estudio de los individuos de timbe crecidas en condiciones protegidas y a cielo abierto bajo un modelo de expresión diferencial de los genes utilizando la técnica de hibridación sustractiva por supresión (HSS), nos permitió obtener 200 genes diferenciales, de los cuales 100 pertenecen a los expresados en invernadero y 100 se expresaron en condiciones de cielo abierto. De éstas se secuenciaron 51 (14 expresados en vivero y 35 en invernadero). Una vez obtenidas las secuencias se analizaron en el Blastx para ver la posible homología con otros genes reportados

en el banco del NCBI, con el fin de encontrar genes con interés biotecnológico. Los anteriores resultados se resumieron (Figura 33), clasificando los transcritos de acuerdo a la función a la homología con genes de funciones celulares como: metabólicas, estructurales, desconocidas e hipotéticas. El grupo más grande con un porcentaje de 43% que correspondió a aquellos que codifican para proteínas de función desconocida, el 14% corresponde a proteínas ortólogas las cuales se originan de un antecesor común, 21% para proteínas hipotéticas, 16% corresponden a aquellas proteínas con función metabólica y 6% estructural. La mayoría de estos genes no se les encontró una función conocida ya que el número de clonas que se secuenciaron es pequeño y la mayoría de genes son desconocidos, homólogos e hipotéticos; también se muestran los genes que tuvieron una mayor importancia funcional en relación con las condiciones evaluadas (Cuadro 8).

Se esperaba encontrar genes relacionados al género *Acacia*, sin embargo aún no existen reportes de estos estudios para estas especies, no obstante se encontró genes relacionados a la resistencia a factores tanto bióticos como abióticos.

Revisando la bibliografía, se encontraron que los genes que forman parte del banco codifican para proteínas con diferente función (Cuadro 8):

- Transportadores “Casetes de Unión a ATP”: es un tipo de transportador transmembranal formado por enzimas acopladas a ATP, en plantas varios tipos de estos transportadores se han encontrado pero la mayoría aún no se han caracterizado. Entre las funciones que estos desempeñan es: de resistencia a herbicidas. Transportadores “Casetes de Unión a ATP”, se dividen en varias subfamilias una de ellas es la MDR, la cual no se ha caracterizado en *Arabidopsis thaliana*, sin embargo se ha observado que un miembro de esta subfamilia en tabaco se relaciona con la secreción de metabolitos secundarios los cuales juegan un papel importante en la defensa de las plantas; se tiene reportes de otro miembro denominado *sptur2* perteneciente a una planta acuática y la cual se cree está regulada por el ácido abscísico, y el estrés del ambiente como baja temperatura o alta salinidad (Jasinski y col., 2003).

- Los SROs (SIMILAR TO RCD-ONE por su nombre en inglés) es una familia de proteínas bien conservadas en las plantas, éstas juegan un rol muy importante en el desarrollo y adaptación en condiciones de estrés. Se ha observado que algunos de estos genes son inducidos por ERO en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo la función de SRO's es crítica para las plantas y puede estar relacionado con la regulación de factores de transcripción y formación de complejos (Jaspers y col., 2010).
- Transportadores de amonio: proveen a la planta de nitrógeno a través del plasma y se distribuye a compartimentos como los cloroplastos, mitocondrias y vacuolas. El amonio una vez dentro es asimilado por la vía de la glutamina sintetasa. El amonio también es producto del metabolismo de las plantas y se distribuye por la planta a través de los transportadores de amonio a aquellos lugares donde es requerida (Glass y col., 2002).
- Los policétidos sintetizan lípidos con actividad antibiótica, antifúngica, inmunosupresivo y de defensa a depredadores; aun no se tienen bien caracterizado las vías de síntesis de policétidos en bacterias, hongos y plantas (Castoe y col., 2006).
- Las proteínas de shock al frío, están conservadas en plantas y animales, expresándose en presencia de un shock de frío, cuando el plegamiento de los ARNs es un problema importante para el microorganismo a baja temperatura. Estas proteínas funcionan actuando como chaperonas ayudando de esta manera al plegamiento de ARN (Zhu y col., 2007).
- La síntesis de proteínas puede ser regulada mediante la ubiquitinación bajo condiciones de estrés al frío. La ubiquitina ligasa en combinación con una enzima la ubiquitin-conjugating por su nombre en inglés, causa el ataque de una ubiquitina a una lisina vía enlace isopeptídico; la ubiquitina ligasa convierte las proteínas para después ser degradadas por el proteasoma. Estas proteínas que van a ser degradadas sufren poliubiquitinaciones, pero existen otras que sufren monoubiquitinación, estas últimas cambian, ya sea de función o de lugar dentro de la célula (Zhu y col., 2007).

Las secuencias de los genes reportados anteriormente no poseen un valor de E tan bajo como se esperaba, otras secuencias reportadas presentaban mayor homología con las encontradas en este trabajo, pero estos genes pertenecían exclusivamente a organismos procariontes o mamíferos. La mayoría de los genes del banco del NCBI se encontró que codifican para proteínas de las cuales se desconoce su función, por otro lado no se poseen reportes de genes de la familia de las *Acacias* lo cual nos indica que existe un amplio campo de estudio en estas especies.

Los genes encontrados están estrechamente relacionados entre sí, ya que algunos se expresan en respuesta al estrés abiótico presentado en condiciones de crecimiento en vivero. Por ejemplo las proteínas de shock al frío que ayudan al correcto plegamiento de los ARNs importante para la traducción a proteínas funcionales las cuales realizan funciones importantes tanto estructurales como metabólicas, estas proteínas son de gran importancia ya que la pérdida y limitaciones del desarrollo de la agricultura depende principalmente de la temperatura.

Los genes inducidos a través del estrés abiótico se dividen en tres importantes grupos (Wang y col., 2003; Rodríguez y col., 2005):

- Los que codifican para productos que protegen directamente a las células de la planta contra el estrés como las proteínas HSP (heatshock proteins por su nombre en inglés), proteínas LEA (late embryogenesis abundant por su nombre en inglés), chaperonas, osmoprotectores, proteínas anticongelacion, enzimas detoxificantes y compuestos que atrapan radicales libres.
- Aquellos que forman parte de las casacadas de señalización y en el control transcriptómico como las MAPK (mitogen-activated protein kinase por su nombre en inglés), CDPK (Calcium-dependent protein kinases por su nombre en inglés) y cinasas SOS (salt overlay sensitive por su nombre en inglés), fosfolipasas y factores de transcripción.
- Aquellos que se encargan en el transporte de agua e iones como las acuaporinas y transportadores de iones.

De acuerdo a la clasificación anterior, los genes que se expresaron en timbe se pueden agrupar en dependiendo su función:

- Los productos de la expresión de los genes que protegen a las células contra el estrés: proteínas tipo I PKS y dominio de la proteína de shock al frío.
- Los productos que participan en las casacadas de señalización y en el control transcriptómico: Transportadores “Casetes de Unión a ATP”, ubiquitina ligasa y proteína hipotética Sros.

En el estudio se observó que la mayoría de genes que codifican para enzimas estructurales son principalmente transportadores transmembranales que permiten tanto el intercambio de sustancias como hormonas, amonio, compuestos de defensa ante el ataque de patógenos, entre otros. Entre las sustancias de defensa producidas por las plantas se encontraron genes que codifican para policétidos que dan lugar a una gran variedad de compuestos lipídicos con actividad antimicrobiana ante el ataque de fitopatógenos.

El banco de hibridación sustractiva por supresión (HSS) se llevó a cabo exclusivamente en timbe, ya que no se pudo extraer el ARN de las muestras de las plántulas de tepame, se cree debido a la gran cantidad de polisacáridos presentes en la planta.

VIII. CONCLUSIÓN.

Las especies timbe (*Acaciella angustissima*) y tepame (*Acacia pennatula*), pertenecientes a la familia *Fabaceae*, crecen en climas semidesérticos donde persisten condiciones extremas, lo que les proporciona la habilidad de sintetizar compuestos bioactivos en respuesta al estrés ambiental. Extractos metanólicos de vainas de estas plantas, mostraron actividades biológicas como antioxidantes, antimutágenos y antimicrobianos. Además, estos arbustos crecidos en condiciones protegidas con bajo riego, expresaron genes relacionados a la respuesta de las plantas ante estrés biótico y abiótico, que pudieran ser de interés industrial.

Para que el potencial biotecnológico de estas especies se logre explotar de manera equilibrada con el entorno y favorezca desarrollo de comunidades en zonas semidesérticas del país, es necesaria más investigación encaminada a caracterizar a mayor detalle las actividades biológicas estudiadas en este trabajo (y otras posibles) que presentan posibilidades de aplicación en industrias como agroindustrial, alimentos y farmacéutica principalmente. Con lo anterior, ofreciendo nuevas posibilidades de explotación de estas especies considerando aspectos de sustentabilidad en la misma.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdur, A., Moon, S. 2007.** Antimicrobial phenolic derivatives from *Dendranthema zawadskii* var. *Latilobum kitamura* (Astereaceae). Archives of Pharmacal Research. 30:1374-1379.
- Alekperov, U., Aliev, A., Rustamova, A. 2005.** Modification by Compositional Antimutagens of the Key Stages of a Mutation Process. Turkish Journal of Biology. 27:137-143.
- Altschul, S., Gish, W., Myers W., Lipman, D. 1990.** Basic local alignment search tool. Journal Molecular Biology. 215:403-410.
- Álvarez, E., Orrallo, F. 2003.** Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. Ámbito farmacéutico. 22:130-138.
- Ames, B., Lee, F., Durston, W. 1973.** An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 70:782-786.
- Ames, B. 2010.** Prevention of Mutation, Cancer and Other Age-Associated Diseases by Optimizing Micronutrient Intake. Journal of Nucleic Acids. 10:1-11.
- Aqil, F., Zahin, M., Ahmad, I. 2008.** Antimutagenic activity of methanolic extracts of four ayurvedic medicinal plants. Indian Journal of Experimental Biology. 46:668-672.
- Arabi, Z., Sardari, S. 2010.** An Investigation into the Antifungal Property of *Fabaceae* using Bioinformatics Tools. Medical Biotechnology. 2:93-100.
- Arias, M., González, J., Cudmani, N. 2004.** Antibacterial Activity and aqueous extracts of *Acacia aroma Gill*. Ex Hoot et Arn. Life Sciences. 75:191-202.
- Aver'yanov, A., Lapikova, V., Nikolaev, O., Stepanov, A. 2000.** Active oxygen-associated control of rice blast disease by riboflavin and roseoflavin. Biochemistry. 65:1292-1298.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry. 99:191–203.
- Bhattacharya, S. 2011.** Natural Antimutagens: A Review. Journal of Medicinal Plant Research. 5:116-126.

- Battin**, E., Brumahim, J. **2009**. Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: a Review of Reactive Species Scavenging, Glutathione Peroxidase and Metal-Binding Antioxidant Mechanism. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 55:1-23.
- Boussaada**, O. Chriaa, J., Nabil, R., Ammar, S., Saidana, D., Mahjoub, M., Chraeif, I., Helal, A., Mighri, Z. **2008**. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts from *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* of *Evax pygmaea* (*Asteraceae*) growing wild in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:1289-1296.
- Brockwell**, J., Searle, S., Jeavons, A., Waayers, M. **2005**. Nitrogen Fixation in *Acacias*: an Untapped Resource for Sustainable Plantations, Farm Forestry and Land Reclamation. Australian Centre for International Agricultural Research. 1:1-132.
- Castoe**, T., Stephens, T., Noonan, B., Calestani, C. **2006**. A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs. *Gene*. 392:47-58.
- Ciocan**, I., Bara, I. **2007**. Plant Products As Antimicrobial Agents. *Genetică și Biologie Moleculară*. 8:151-156.
- Csurhes**, S., Navie, S. **2009**. Weed risk assessment: White ball *Acacia*, *Acaciella angustissima* (syn. *Acacia angustissima*, *Acacia boliviana*). *Biosecurity Queensland*. 1:3-23.
- Dewanto**, V., Wu, X., Adom, K., Liu, R. **2002**. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 50:3010-3014.
- Diatchenko**, L., Lau, A., Campbell, A., Chenchik, F., Moqadam, B., Huang, S., Engels J., Arora, R., Guarino, L. **1995**. An introduction to plant germplasm exploration and collecting: planning, methods and procedures, followup. *Collecting plant genetic diversity*. CAB International. 1ra. Ed., Reino Unido: 31-63.
- Entezari**, M., Majd, A., Falahian, F., Mehrabian, S., Hashemi, M., Lajimi, A. **2009**. Antimutagenicity and Anticancer Effects of Citrus Medica Fruit Juice. *Acta Medica Iranica*. 47:373-377.

Escribano-Bailón, M., Santos-Buelga, C. **2003**. Polyphenol extraction from foods. Methods in polyphenol analysis. 1ra. Ed., RSC Publishing, Cambridge, U.K.: 1-16.

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. *Biochimica et Biophysica*. 1721:174-184.

Floris, M., Mahgoub, H., Lanet, E., Robaglia, C., Menand, B. **2009**. Post-transcriptional Regulation of Gene Expression in Plants during Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 10:3168-3185.

Foti, M. **2007**. Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59:1673-1685.

Fukumoto, L., Mazza G. **2000**. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:3597-604.

Gasca-González, M., Rivera-Herrera, Y., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Guevara-Olvera, L., Muñoz-Sánchez, C., Guevara-González, R. **2008**. Study on the transcriptome in *Capsicum chinense* jacq. Resistant to Pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV). *Agrociencia*. 42:107-117.

Gaviria, C., Cienfuentes, O., Monsalve, C., Rojano, B. **2007**. Actividad antioxidante de los compuestos metanólicos de *Attalea butyracea*. *Scientia Technica*. 33:297-298.

Gessler, N., Aver'yanov A., Belozerskaya T. **2007**. Reactive Oxygen Species in Regulation of Fungal. *Development.Biochemistry*. 72:1091-1109.

Glass, A., Britto, D., Kaiser, B., Kinghorn, J., Kronzucker, H., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M. Unkles, S., Vidmar, J. **2002**. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53:855-864.

Greenberg, R., Biecher, P. **2005**. Determinants of tree species preference of birds in oak-*Acacia* woodlands of Central America. *Journal of Tropical Ecology*. 21:57-66.

Harborne, J., Simmonds, N. **1964**. The natural distribution of the phenolic aglycones. *Biochemistry of phenolic compounds*. Academic Press, London. 1ra. Ed., New York: 77-127.

Hong, Y., Bhatnagar, S. **2007**. Tropical Tree Legumes. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 60:408-431.

Hour, T., Liang, Y., Chu, I., Lin, J. **1999**. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-) epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food Chemistry Toxicology*. 37:569-579.

Hulhes-Fulford, M. **2004**. Signal Transduction and Mechanical Stress. *Science's STKE*. 12:1-8.

Ishak, G., Yasin, M., Aslam, S. **2003**. Cancer chemoprevention through natural antimutagenic agents. *J-K Patitioner*. 10:101-106.

Jasinski, M., Ducos, E., Martinoia, E., Boutry, M. **2003**. The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and arabidopsis. *Plant physiology*. 131:1169-1177.

Jaganath, I., Crozier, A. **2010**. Dietary flavonoids and phenolic compounds. *Plant Phenolics and Human Health: Nutrition and Pharmacology* Hoboken. 1ra. Ed., John Wiley & Sons Inc. Estados Unidos: 1-49.

Jaspers, P., Overmyer, K., Wrzaczek, M., Vainonen, J., Blomster, T., Salojärvi, J., Reddy, R., Kangasjärvi, J. **2010**. The RST and PARP-like domain containing SRO protein family: analysis of protein structure, function and conservation in land plants. *BMC Genomics*. 12:11-170.

Kado, N., Langley, D., Eisenstadt, E. **1983**. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutation Research*. 121:25-32.

Kado, N., Guiguis, G., Flessel, C., Chan, R., Chang, K., Wselowski, J. **1986**. Mutagenicity of fine (<2.5 mm) airborne particles: diurnal variation in community air determined by *Salmonella* micropreincubation procedure. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 8:53-66.

Katare, D., Aeri, V., Bora, M. **2009**. Secondary Metabolites And Metabolic Engineering. *Journal of Cell and Tissue Research*. 9:2027-2036.

Kaur, A., Bilaspuri, G. **2010**. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*. 1:1-7.

- Khammuang**, S. Sarnthima, S. **2011**. Antioxidant and antibacterial activities of selected varieties of Thai mango seed extract. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24:37-42.
- Khennouf**, S., Amira, S., Arrar, L., Baghiani, A. **2010**. Effect of Some Phenolic Compounds and Quercus Tannins on Lipid Peroxidation. *World Applied Sciences Journal*. 8:1144-1149.
- Kusuma**, I., Itoh, K., Tachibana, S. **2005**. Antifungal activities against plant pathogenic fungi of flavonoids isolated from *Amboyna wood*. *Pakistan Journal of Biological Science*. 8:136-140.
- Lambers**, H., Stuart, C., Thijs, L. **2008**. *Plant physiological ecology*. 2da. Ed. Springer, New York: 239-394.
- Lattanzio**, V., Lattanzio, V., Cardinali, A. **2006**. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*.1:23-67.
- Liu**, M., Qi, X., Weber, C., Yong, C., Brown, J., Hai, R. **2002**. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 50:2926-2930.
- Liu**, H., Mou, Y., Zhao, J., Wang, J., Zhou, L. Wang, M., Wang, D., Han, J., Yu, Z., Yang, F. **2010**. Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules*. 15:7933-7945.
- Mandal**, S., Yadav, S., Yadav, S., Kumar, R. **2009**. Antioxidants: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*.1:102-104.
- Marín-Martínez**, R., Veloz-García, R., Veloz-Rodríguez, R., Guzmán-Maldonado, S., Loarca-Piña, G., Cardador-Martínez, A., Guevara-Olvera, L., Miranda-López, R., Torres-Pacheco, I., Pérez C., Herrera-Hernández, G., Villaseñor-Ortega, F., González-Chavira, M., Guevara-González, R. **2009**. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. *Bioresource Technology*. 100:434-439.
- Martínez-Flórez**, S., González-Gallego, J., Culebras, M., Tuñón, M. **2002**. Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 17:271-278.

- Masoumeh, B. 2009.** Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46:309-317.
- Melo, J., Araújo, T., Castro, V., Cabral, D., Rodrigues, M., Nascimento, S., Amorim, E., Albuquerque, U. 2010.** Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid Northeastern Brazil. *Molecules*. 15:8534-8542.
- Michalak, A. 2006.** Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15:523-530.
- Mihara, R., Barry, K., 2005.** Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acacia mangium* and *A. auriculiformis* heartwood extracts. *Journal of Chemical Ecology*. 3:789-804.
- Moongkarndia, P., Kosema, N., Luanratanab, O., Jongsomboonkusola, S., Pongpanb, N. 2004.** Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia*. 75:375–377.
- Nafisi, S., Hashemi, M., Rajabi, M., Tajmir-Riahi, H. 2008.** DNA adducts with antioxidant flavonoids: morin, apigenin, and naringin. *DNA Cell Biology*. 27:433-42.
- Nakamura, Y., Matsuo, T., Okamoto, S., Nishikawa, A., Imai, T., Park, E., Sato, K. 2008.** Antimutagenic and Anticarcinogenic Properties of *Kyo-Yasai*, Heirloom Vegetables in Kyoto. *Genes and Environment*. 30:41-47.
- Nenadis, N., Wang, L, Tsimidou, M., Zhang, H. 2004.** Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:4669-4674.
- Orphanides, G., Reinberg, D. 2002.** Review: A Unified Theory of Gene Expression. *Cell*. 108:439-451.
- Pedrechi, R., Cisneros, L. 2006.** Antimutagenic and Antioxidant Propieries of Phenolic Fractions from Andean Purple Corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:4557-4567.
- Pecorino, L. 2008.** *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. 2da. Ed., Oxford University Press, Oxford New York: 21-45.

- Pérez-Torres, E., Paredes, M., Polanco, V., Becerra, V. 2009.** Gene Expression Analysis: A Way To Study Tolerance To Abiotic Stresses In Crops Species. Chilean Journal Of Agricultural Research. 69:260-269.
- Pessino, S., Martelotto, L. 2004.** Biotecnología y mejoramiento vegetal. 1ra. Ed., 1:229-231.
- Piluk, J., Piluk, J., Hartel, P., Haines, B., Giannasi, D. 2001.** Association of carbon disulfide with plants in the family *fabaceae*. Journal of Chemical Ecology. 27:112-114.
- Ping, H., Lewis, C., Thomas, P. 2010.** Oxidative Stress and Exhaled Breath Analysis: A Promising Tool for Detection of Lung Cancer. Cancers. 2:32-42.
- Rico, M. 2005.** Nombres nuevos para dos especies Mexicanas de *Acacia* (*Leguminosae, Mimosideae*). Acta botánica Mexicana. 71:89-92.
- Rincón-Rosales, R., Gutiérrez–Miceli, F. 2006.** Características biológicas de *Acaciella angustissima* en su habitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México. Agrociencia. 42:129-137.
- Ríos, M. 2005.** Terpenes, coumarins and flavones from *Acacia pennatula*. Chemistry of Natural Compounds. 41:297-298.
- Rodríguez, M., Canales, E. Borrás-Hidalgo, O. 2005.** Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotecnología Aplicada. 22:1-10.
- Romanova, V., Vachálková, A., Cipák, L., Ovesná, Z., Rauko, P. 2001.** Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method. Neoplasma. 48:104-107.
- Roy, S., Tucker, E., Tester, M. 2011.** Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. Current Opinion in Plant Biology. 14:1-8
- Ruíz-Valdiviezo, V., Ayora-Talavera, T., Gutiérrez-Miceli, F., Dendooven, L., Rincón-Rosales, R. 2009.** Effects of organic fertilizers and rhizobial inoculation on growth, nodulation and tannin content of *Acacciella Angustissima* (mill.) Briton & Rose. Gayana botánica. 66:206-217.
- Satish, S., Mohana, D., Raghavendra, M., Raveesha, K. 2007.** Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. Journal of Agricultural Technology. 3:109-119.

- Satwinderjeet**, K., Subodh, s., Prabhjit, K., Madhu, C. **2010**. Study of Antimutagenic Potential of Phytoconstituents Isolated from *Terminalia arjuna* in the Salmonella/Microsome Assay. *American Journal of Biomedical Sciences*. 2:164-177.
- Scalbert**, A. **1991**. Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry*, 30:3875-3883.
- Shin**, K., Lee, S., Cha, B. **2007**. Antifungal Activity of Plumbagin Purified from Leaves of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* against Phytopathogenic Fungi. *Plant Pathology*. 23:113-115.
- Silva**, N., Fernández, A. **2010**. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 16:402-413.
- Simić**, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M. **2007**. Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics. *Molecules*. 12:2327-2340
- Stone**, G., Raine, N., Prescott, M., Willmer, P. **2005**. Pollination ecology of *Acacias* (*Fabaceae, mimosoideae*) *Australian Systematic Botany*. 16:103-118.
- Sultana**, B., Anwar, F., Ashraf, M. **2009**. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*. 14:2167-2180.
- Tabosa**, C., Da Silva, T., Sobrinho, P., De Almeida, V., Da Cunha, D., Lima, A., Cavalcanti, E. **2011**. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. *Molecules*. 16:4728-4739.
- Terrones-Rincón**, R. **2006**. Arbustivas Nativas de uso multiple en Guanajuato Libro técnico No.1. INIFAP. 1:1-99.
- Valko**, M. **2004**. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266:37-56.
- Valko**, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. **2006**. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160:1-40.

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C., Telser, J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39:44-84
- Vásquez, A., Cala, M., Miranda, I., Tafurt, G., Martínez, J. 2007.** Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Alvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica*. 33:205-207.
- Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Muñoz-Sánchez, C., Guevara-Olvera, L., Miranda-López, R., González-Chavira, M., Torres-Pacheco, I., Guzmán-Maldonado, S., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., Guevara-González, R. 2004.** Antimutagenic and antioxidant activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:1632-1638.
- Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Anaya-López, J., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Pérez, A., Loarca-Piña, G., Guevara-González, G. 2010.** Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products*. 19:1035-1054.
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2008.** Phenolic Compound biochemistry. Springer. 1ra Ed., New York: 1-32.
- USDA. 2009.** United States Department of agriculture. Natural Resources Conservation Service (On-line). <http://plants.usda.gov>
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. 2003.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Plant*. 218: 1-14.
- Wisseman, H., Halliwell, B. 1996.** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry Journal*. 313:17-29.
- Wilfred, V. Ralf, N. 2007.** Phenolic compound Biochemistry. 1ra Ed., Springer, New York, NY. :1-134.

Yank-Tzen, C., Jyh-Horng, W. 2001. Antioxidant Activity from extracts from *Acacia confusa* Bark and Heartwood. *Journal of Agriculture and food Chemistry*. 49:3420-3424.

Yang-Yu. 2008. Elicitors and phytotoxins from the blackleg fungus: Structure, bioactivity and biosynthesis. Saskatoon, Saskatchewan, Canada. University of Saskatchewan. Tesis para obtener el grado de: Doctor of Philosophy. 36-50.

Yoon, M., Nam, S., Kang, M. 2008. Antioxidative and antimutagénic activities of 70% Ethanolic Extracts from Four Fungal Mycelia-Fermented Specialty Rices. *Journal of Clinical and biochemical Nutrition*. 43:118-125.

You, Y., Duan, X., Wei, X., Su, X., Zhao, M., Sun, J., Ruenroengklin, N., Jiang, Y. 2007. Identification of Major Phenolic Compounds of Chinese Water Chestnut and their Antioxidant Activity. *Molecules*. 12:842-852.

Zhu, J., Dong, C., Zhu, J. 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:290-295.