

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN –DIGI-
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS BÁSICAS –PUICB-
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS –IIQB-
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**INFORME FINAL
PROYECTO**

**Determinación de los flavonoides en seis plantas del género *Lippia*
(Verbenaceae) nativas de Guatemala como posibles fuentes de nutraceuticos**

Coordinador

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Investigadores

Lic. Christian Farfán Barrera

Licda. Bessie Evelyn Oliva Hernández

Lic. Pedro Guillermo Jayes Reyes

Auxiliar de Investigación II

Br. Max Samuel Mérida Reyes

Auxiliar de Investigación I

Br. Manuel Muñoz Wug

Período del estudio: febrero-diciembre 2011

Guatemala 10 de enero de 2012

ÍNDICE GENERAL

Resumen	3
Introducción	4
Antecedentes	5
Justificación	18
Objetivos	20
Metodología	21
Resultados	26
Discusión de resultados	30
Conclusiones	34
Recomendaciones	35
Bibliografía	36
Anexos	41

RESUMEN

En el proyecto se realizó la separación, purificación e identificación de los principales flavonoides presentes en seis plantas nativas de Guatemala, correspondientes al género *Lippia*, siendo ellas, *L. graveolens*, *L. chiapasensis*, *L. substrigosa*, *L. myriocephalla*, *L. cardiostegia* y *L. controversa*. Las plantas fueron colectadas en los departamentos de Totonicapán, Zacapa, El Progreso y Chiquimula y Chimaltenango. La identificación se realizó por medio de técnicas cromatográficas, incluyendo la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y la Resonancia Magnética Nuclear, a través de la cooperación con el Núcleo de Pesquisas de Productos Naturales de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

En estudios anteriores se ha encontrado a través de tamizajes fitoquímicos que algunas plantas del género *Lippia* presentan flavonoides, sin embargo no han sido identificados ni cuantificados en las plantas propuestas. Por otra parte, las plantas que se estudiaron presentan potencial para su aprovechamiento económico, ya que presentan aceites esenciales con valor económico, por lo que el estudio de los flavonoides en la parte no volátil, generaría mayor valor agregado para las plantas, al investigarse su utilidad como fuentes de nutraceuticos. Para el aislamiento se utilizó metodología moderna de preparación de muestras como la Cromatografía HPLC. Las diferencias en diversidad de flavonoides encontrada en los diferentes quimiotipos de *L. graveolens*, permitió evidenciar diferencias de las plantas de estudio por su quimiotipo, siendo el quimiotipo carvacrol el más diverso y con mayor contenido de flavonoides y el quimiotipo mixto el menos diverso y con menor contenido de flavonoides. Las tres plantas evidenciaron contenido de flavonoides que presentan potencial para su uso como nutraceutico. Por su parte *L. chiapasensis* presentó un contenido elevado de fenoles totales, lo cual en conjunto con el contenido de flavonoides, le confiere un alto valor agregado a la parte no volátil de la planta.

INTRODUCCIÓN

Entre los principales componentes que se encuentran naturalmente en los alimentos, los flavonoides constituyen el grupo de sustancias que ha generado mayor interés entre los científicos del área de alimentos y nutricionistas, así como fabricantes de alimentos y consumidores en las últimas dos décadas, a causa de sus efectos benéficos en la salud del ser humano, por lo que son considerados como nutraceuticos. La mayoría de flavonoides son agentes reductores que actúan como antioxidantes y extintores de radicales libre, cumpliendo así una función protectora contra reacciones oxidativas, lo cual es el principal mecanismo de acción que explica la actividad biológica de los flavonoides, a pesar de no ser el único mecanismo. Los flavonoides podrían jugar un papel importante en la prevención de algunas enfermedades crónicas, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamaciones, enfermedades neurodegenerativas y otras patologías asociadas con el estrés oxidativo. Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de alimentos vegetales ricos en flavonoides y la incidencia de algunas enfermedades. De esta forma la ingesta de alimentos como soya, rica en isoflavonas, té verde, como fuente de flavanoles, frutas, etc. podría proteger contra diferentes tipos de cáncer.

Por lo anterior, en vista que recientemente fueron encontrados flavonoides en *L. graveolens* de una población mexicana, se considera que las plantas del género *Lippia* podrían ser una fuente de flavonoides que deben ser estudiados, para la evaluación de su uso potencial en la industria alimenticia como antioxidantes y los beneficios que pueden presentar a la salud por su consumo directo. Por esto, en el presente proyecto se plantea el estudio de los flavonoides en plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala, de las cuales se han localizado poblaciones en estudios recientes. Dos de ellas presentan diferentes quimiotipos, siendo la *L. graveolens* y *L. chiapasensis*, por lo que los resultados de la identificación de flavonoides contribuirán además a la quimiosistemática del género, ya que los flavonoides son marcadores de las diferentes etapas evolutivas de las plantas.

Las plantas son nativas de regiones donde existe un nivel de pobreza bastante extendido, por lo que se espera que los resultados del proyecto generen información acerca del potencial de aprovechamiento de las plantas que sea de utilidad para la toma de decisiones sobre su producción, a efecto de contar con alternativas que permitan mejorar el ingreso de las poblaciones agrícolas.

ANTECEDENTES

Flavonoides

Las plantas sintetizan centenas de compuestos fenólicos y polifenólicos, que poseen variadas estructuras y funciones (Figura 1). Entre estos compuestos, los más estudiados como antioxidantes son los flavonoides que tienen en común la estructura $C_6-C_3-C_6$, consistiendo de dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo oxigenado. Dentro de los aproximadamente 4,000 flavonoides descritos, las mayores clases son los flavonoles, catequinas o flavonas, antocianidinas e isoflavonas. En estas clases hay grandes variaciones estructurales, dependiendo del nivel de hidrogenación, hidroxilación, metilación y sulfonación de las moléculas.

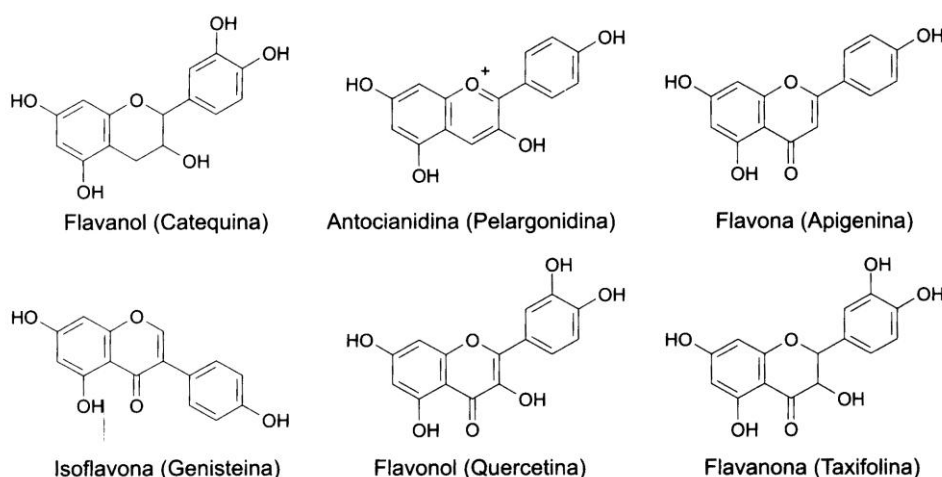


Figura 1. Estructuras de las principales clases de flavonoides.

Los flavonoides constituyen los ingredientes nutraceuticos más activos en las plantas. Corresponden a un grupo de moléculas orgánicas distribuidas en las plantas vasculares. Como compuestos fenólicos típicos, pueden actuar como potente antioxidantes y quelantes metálicos.

Funciones de los flavonoides

Los flavonoides cumplen una amplia variedad de funciones ecológicas y fisiológicas en las plantas. Es bien conocido el rol de los pigmentos de antocianina como señales visuales en angiospermas para atraer polinizadores y agentes de dispersión de frutas, pero estas funciones se adquirieron tarde en la diversificación evolutiva de los flavonoides.

Funciones menos conocidas y probablemente más antiguas de los flavonoides incluyen la protección contra los efectos nocivos de la radiación UV, la mediación de las interacciones entre el polen y el estigma, defensa contra bacterias, hongos patógenos y herbívoros, mediación de interacciones entre plantas y hongos micorrízicos mutualistas, y como reguladores de la actividad hormonal (Shirley, 1996).

La ruta biosintética de los flavonoides ha sido útil como sistema modelo para el entendimiento de la regulación de los genes en las plantas. En forma similar, los genes de la ruta de los flavonoides, estructurales y reguladores, han sido útiles como sistema modelo para el entendimiento de una gran variedad de procesos evolutivos, incluyendo el rol de la duplicación de genes en la facilitación de la evolución de caracteres nuevos y la importancia relativa de los genes estructurales y reguladores en la evolución de caracteres ecológicamente importantes.

La ruta de los flavonoides es un ejemplo clásico de las rutas que se han ido extendiendo gradualmente, conforme nuevos productos y nuevas funciones van surgiendo. A pesar que muchos detalles de su construcción evolutiva aún son desconocidos, es posible reconstruir los principales eventos evolutivos con confianza. La duplicación de genes ha proveído la materia prima para la construcción de la ruta. Hay una simetría satisfactoria en esto, ya que una vez que la ruta de los flavonoides se completó, la duplicación y la divergencia de los genes de la ruta han permitido la aparición de nuevas clases de compuestos. A través de la duplicación de los genes, las rutas no solo nacen, sino también se expanden en rutas sintéticas adicionales (Lin y Weng, 2008).

Evolución de la producción de flavonoides por las plantas.

Como marcadores de la evolución de las plantas, los flavonoides juegan un papel muy importante para la quimiosistemática. Es aceptada la teoría de que las plantas terrestres se derivaron de organismos como las algas verdes, sin embargo, no se han encontrado flavonoides en las algas. Además, a pesar que los genomas de algunas algas se han secuenciado, ninguno contiene marcos de lectura abiertos que muestren homología con las secuencias de codificación de las enzimas conocidas en la biosíntesis de los flavonoides. Así, la evolución inicial de la ruta de los flavonoides probablemente se desarrolló después de la colonización del suelo. El grupo parafilético (briofitas), representa las primeras plantas que colonizaron la tierra. Corresponde también a las plantas que produjeron los primeros flavonoides, estando entre los tipos producidos por estas plantas, las chalconas, los flavonoles y las flavonas, que son derivadas de las primeras tres enzimas de la ruta de los flavonoides (Lin y Weng, 2008).

Dos hipótesis han sido planteadas en relación a las funciones que pudieron dar origen a la biosíntesis de flavonoides por las primeras plantas que colonizaron la tierra. La primera hipótesis sugiere que los flavonoides se originaron como pantalla efectiva contra la radiación UV cuando las plantas iniciaron la colonización de la tierra (Shirley, 1996). Entre los hechos que dan soporte a esta hipótesis se encuentran las observaciones de que aún los flavonoides simples, como chalconas, auronas y flavanonas, absorben fuertemente longitudes de radiación UV, y que mutantes que no presentan estos compuestos son extremadamente susceptibles a daños por la radiación UV (Lois y Buchanan, 1994). En contraste, Stafford planteó en 1991 la hipótesis de que la primera función de los flavonoides fue regular las hormonas de las plantas.

Según Stafford, esta hipótesis es más probable, en vista que la de la protección contra radiación UV ya que presumiblemente las primeras enzimas de los flavonoides no eran tan eficientes como las enzimas actuales, y de esta forma los flavonoides no podían acumularse en cantidades suficientes para proteger a las plantas. Además de esto, ha sido demostrado que los flavonoides contribuyen a la regulación del transporte de auxina en las angiospermas (Brown *et al.*, 2001; Peer *et al.*, 2004).

La última etapa evolutiva de los flavonoides corresponde a las gimnospermas y angiospermas. En estos dos grupos fue donde hicieron su aparición las antocianinas. La adición clave a la ruta de los flavonoides involucrada en esta etapa fue la enzima antocianidina sintasa (ANS), posiblemente como resultado de la duplicación de genes de la familia de las oxigenasas de pendientes del 2-oxo-glutarato. Esta enzima cataliza la producción de las antocianinas coloreadas a partir de las leucoantocianidinas incoloras. No está claro, sin embargo, si fue la producción de color *per se* la que constituyó la función original de las antocianinas. A pesar de la función señalizada del color, especialmente para los polinizadores y los agentes dispersores de frutas, es claramente la función primaria de las antocianinas en las angiospermas, dicha señalización es rara sino ausente en las gimnospermas de las cuales se desarrollaron las angiospermas (Lin y Weng, 2008). Se ha estimado que existe más de un millón de polifenoles naturales, en frutas y vegetales, ya que los polifenoles se encuentran generalmente como glucósidos, existiendo una gran variedad de especies de azúcares y las formas de enlace con la aglicona (Herrmann, 1976; Wollenweber *et al.*, 1981).

Actividad antioxidante de los Flavonoides

Las dietas ricas en flavonoides, frutas y vegetales, son protectoras contra una variedad de enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Ness y Powles, 1997). Los antioxidantes y la fibra dietética son los nutrientes responsables por estos efectos protectores. Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son formadas *in vivo* durante el metabolismo aeróbico normal y pueden causar daño al ADN, proteínas y lípidos, no obstante el sistema de defensa antioxidante natural de todos los organismos (Lin y Weng, 2008). Los ROS contribuyen al envejecimiento celular (Kawanishi *et al.*, 2001) y enfermedades coronarias (Khan y Baseer, 2000), posiblemente a través de la desestabilización de membranas (Takabe *et al.*, 2001), daño del ADN, y oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Meyer *et al.*, 1998).

Las Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), también parecen contribuir a la patología de las enfermedades cardiovasculares. El NO es un RNS producido por la acción de la óxido nítrico sintasa en las células endoteliales, neuronas y otros tipos de células. En sitios de inflamación, se incrementan los niveles de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), por lo que activa la síntesis del NO.

El peroxinitrito, un oxidante potente generado por la reacción del óxido nítrico (NO) con superóxido en el endotelio vascular, induce la oxidación de LDL (Leeuwenburgh, 1997) y la disfunción del miocardio (Wang *et al.*, 2002). Otra fuente potencial de RNS se deriva del nitrito en los alimentos, el cual reacciona con el jugo gástrico ácido para producir ácido nitroso, el cual se descompone en óxidos de nitrógeno. El ácido nitroso y sus productos pueden nitrosar las aminas, desaminar las bases del ADN y nitrar compuestos aromáticos, incluyendo a la tirosina. Algunas flavonoides y compuestos fenólicos, incluyendo la familiar de la epicatequina/galato de flavanoles, son inhibidores potentes de la nitración dependiente del ácido nitroso y la desaminación del ADN *in vitro* (Oldreive *et al.*, 1998).

Los efectos protectores de los flavonoides en los sistemas biológicos se deben a su capacidad para transferir electrones de radicales libres, la quelación de catalizadores metálicos (Ferrari *et al.*, 1997), la activación de enzimas antioxidantes, la reducción de radicales de alfa-tocoferol (Hirano *et al.*, 2001) y la inhibición de oxidasas (Cos *et al.*, 1998). Velioglu *et al.* (1998), analizaron la actividad antioxidante y fenoles totales en frutas, vegetales y granos. Ellos encontraron correlación estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales.

Algunos flavonoides como la quercetina, presentan mayor velocidad de reacción con radicales libres *in vitro* que el α -tocoferol. Se ha sugerido que esto es debido a la conjugación más extendida de sus estructuras, que lleva a radicales libres más estabilizados. La presencia de dos o más grupos OH reactivos y menor impedimento estérico en el sitio de abstracción también deben influir.

Los polifenoles son capaces de captar radicales alcoxilo (RO \cdot), alquilperoxilo (ROO \cdot), superóxido (O $_2^{\cdot-}$) radical hidroxilo (HP \cdot), óxido nítrico (NO \cdot), además del oxidante peroxinitrito (ONOO \cdot /ONOOH). La eficacia antioxidante de polifenoles *in vivo* todavía necesita de ser evaluada, pues se conoce poco sobre su biodisponibilidad.

Anti-carcinogénesis

Numerosos estudios *in vitro* indican que los flavonoides encontrados en plantas pueden participar efectivamente en procesos que pueden tener efectos anticarcinogénicos y antiaterogénicos. Estos estudios han demostrado que los flavonoides inhiben la carcinogénesis *in vitro* y evidencia sustancial indica que también lo hacen así *in vivo* (Caltagirone *et al.*, 2000; Miyagi *et al.*, 2000). Los flavonoides pueden inhibir la carcinogénesis afectando los venetos moleculares en las etapas de iniciación, promoción y progresión.

Los estudios en animales usando diferentes modelos celulares sugieren que ciertos flavonoides podrían inhibir la iniciación de tumores así como el crecimiento de los mismos (Makita *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997, 1999).

Entre los procesos que previenen estas enfermedades, el más evidente es la capacidad antioxidante de estos compuestos atribuida al poder reductor del grupo hidroxilo aromático, que reduce radicales libres reactivos, produce el radical libre fenoxilo estabilizado por resonancia. La capacidad antioxidante de los polifenoles es influida por el número y posición de los grupos OH, así como por las posiciones de glicosilación. Al contrario del ácido ascórbico y el α -tocoferol, que actúan en medio acuoso y en la cámara fosfolipídica celular, respectivamente, los flavonoides pueden localizarse en las dos fases.

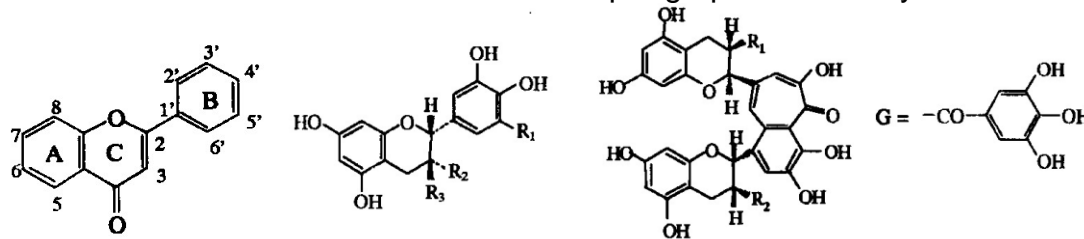
En cuanto a la actividad anticancerígena de los flavonoides, Soleas *et al.* (2006) compararon las actividades antitumorales de un fenol de cada uno de cuatro diferentes clases: flavanoles [(+)-catequina], estilbenos (*trans*-resveratrol), flavonoles (quercetina) y ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico). Para eso, fue utilizado un modelo de cáncer de piel de ratón CD-1 en dos etapas, con el 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) como iniciador. Los ratones fueron tratados con polifenoles específicos en dosis entre 0 y 25 μ moles (disueltos en 200 μ L de acetona), dos veces por semana hasta dieciocho semanas. La solución fue aplicada tópicamente en la región dorsal afeitada de cada animal. Los autores comparan las potencias relativas de los polifenoles, por la evaluación de la inhibición de la formación de tumores en individuos y por el número de ratones que desarrollaron uno o más tumores con los diferentes programas de dosis. La quercetina fue la más efectiva ($ED_{50} < 1 \mu$ mol) y el ácido gálico el menos efectivo (ED_{50} 5-10 μ moles), (+)-catequina y *trans*-resveratrol fueron intermedios, con ED_{50} entre 5 y 6 μ mol, respectivamente. Los autores concluyeron que el *trans*-resveratrol podría ser el polifenol anticancerígeno más efectivo de los presentes en el vino tinto en la forma como es consumido por humanos saludables, ya que el *trans*-resveratrol es absorbido mucho más eficientemente que la (+)-catequina y la quercetina en humanos después de la ingestión.

Los flavonoides han demostrado agonismo y/o antagonismo para receptores relacionados con la carcinogénesis tales como el factor de crecimiento epidérmico (Ashida *et al.*, 2000), el receptor de arilhidrocarburos (Agullo *et al.*, 1997) el receptor β de estrógeno (An, 2001). Los polifenoles inducen la expresión de enzimas anticarcinogénicas o inhiben la inducción de enzimas promotoras de cáncer (Williamson *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 2001). En experimentos con animales, una dosis oral de flavonoides eliminó la carcinogénesis de carcinógenos severos (Wei *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993). Los polifenoles también han mostrado acción de vasorelajación y antialérgica.

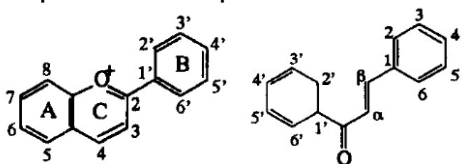
La actividad biológica de los polifenoles se atribuye a las estructuras agliconas, no a los azúcares que forman parte de la molécula. La potencia antioxidante se debe principalmente a la estructura orto-diol (catecol) en las agliconas (Bors *et al.*, 1990; Sakakibara *et al.*, 2002). La especificidad de interacción con proteínas depende estéricamente, de las estructuras de las agliconas respectivas, mientras que los azúcares enlazados a la molécula presentan disrupción de la interacción (Ashida *et al.*, 2000; Ferte *et al.*, 1999).

Clasificación de los Flavonoides

Los flavonoides son una clase amplia construida básicamente con anillos A y C de benzo-1-pirano-4-quinona y un anillo B, siendo subclasificados como flavonas (estructura básica), flavonoides (con un grupo hidroxilo en la posición 3-), flavanonas (el enlace 2-3 es saturado) y catequinas (el anillo C es 1-pirano), chalconas (anillo C es abierto), antocianidinas (anillo C es 1-pirano, y los enlaces 1-2 y 3-4 son insaturados) (ver Esquemas 1 y 2). Estos compuestos presentan generalmente una variedad de sustituciones por grupos hidroxilo y/o metoxilo.



Esquema 1. Esqueleto de flavonoides, catequinas y teaflavinas.



Esquema 2. De izquierda a derecha, esqueletos de antocianinas y chalconas.

Antioxidantes

De forma general, se denominan antioxidantes a las sustancias que presentes en bajas concentraciones, comparadas al sustrato oxidable, retardan significativamente o inhiben la oxidación del sustrato. Los radicales formados a partir de antioxidantes no son reactivos para propagar la reacción en cadena, siendo neutralizados por la reacción con otro radical, formando productos estables o pueden ser reciclados por otro antioxidante (Sousa, *et al.*, 2007). Los principales mecanismos de acción de compuestos antioxidantes incluyen captadores de radicales y supresores de estados excitados; sistemas catalíticos que neutralizan o eliminan ERO/ERN y el enlace de iones metálicos a proteínas, lo que los hace indisponibles para la producción de especies oxidantes.

Pro-oxidantes y antioxidantes

Los pro-oxidantes son sustancias endógenas o exógenas que poseen la capacidad de oxidar moléculas blanco. Los radicales libres son especies cuya reactividad resulta de la presencia de uno o más electrones desapareados en la estructura atómica, capaces de existencia independiente en intervalos de tiempo variables.

Especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) son términos que abarcan toda las formas reactivas del oxígeno y del nitrógeno, incluyendo radicales y no radicales que participan en la iniciación y progreso de las reacciones en cadena envolviendo la formación de especies radicalares. La reactividad de estos compuestos con biomoléculas es variable, siendo algunos estables y poco reactivos, como por ejemplo el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ($k = 10^1 M^{-1} s^{-1}$) y otros altamente reactivos, presentando velocidad de reacción próxima a la constante de colisión con moléculas blanco, siendo el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), el principal ejemplo ($k = 10^9 M^{-1} s^{-1}$). A pesar de que los ERO/ERN sean asociadas a la oxidación, algunas son agentes reductores en medio biológico, pero también contribuyen con las reacciones en cadena que convergen en el daño a biomoléculas. Los principales tipos de reacciones que involucran radicales libres se resumen en la Figura 2.

El propio O_2 en el estado fundamental es un radical, ya que contiene dos electrones desapareados en el último orbital molecular. Sin embargo, el oxígeno reacciona lentamente con compuestos que no poseen electrones desapareados ($k < 10^1 M^{-1} s^{-1}$), o sea, no reacciona con la mayoría de los compuestos celulares. Por otra parte, la reacción de O_2 con iones de metales de transición y radicales libres resulta en una variedad de ERO/ERN, que pueden efectivamente iniciar reacciones en cadena y atacar biomoléculas. Se estima que cerca de 0.1% del O_2 utilizado durante la respiración mitocondrial forma ERO, debido al escape de dos electrones de los complejos que componen la cadena respiratoria (Halliwell *et al.*, 1999).

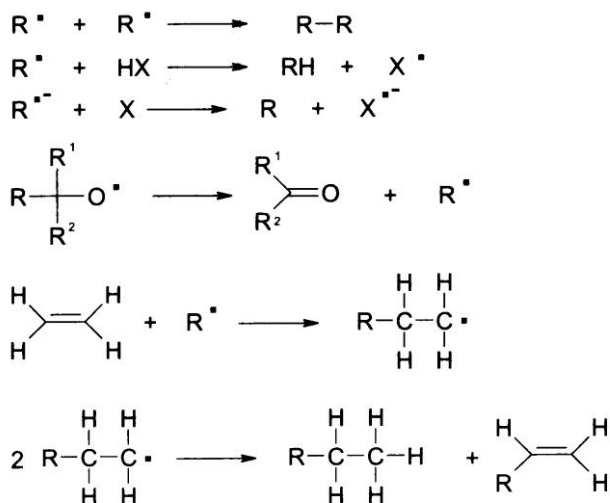


Figura 2. Principales tipos de reacciones radicalares.

Además de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, los ERO/ERN también son producidas endógenamente por varios sistemas enzimáticos y células del sistema inmunológico, además de ser formadas a partir de la exposición a la radiación ionizante (Djordjevic, 2004).

En vista de los perjuicios provenientes del exceso de ERO y ERN, las células disponen de una variedad de mecanismos de defensa contra los daños causados por estas especies: las defensas antioxidantes. Para el funcionamiento celular normal, debe haber una compensación entre la formación de ERO/ERN y los niveles de defensas antioxidantes, que mantienen a la célula en estado general reducido. Si las defensas antioxidantes fueran insuficientes frente a la excesiva producción de ERO y ERN, ocurre el llamado estrés oxidativo. Estrés oxidativo agudo así como el estrés oxidativo crónico han sido relacionados a un gran número de enfermedades degenerativas, como arteriosclerosis (Lankin *et al.*, 2005), diabetes, enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide, colitis ulcerativa y pancreatitis (Andican *et al.*, 2005)), cáncer, enfermedades neurológicas (enfermedad de parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer)(Bondy *et al.*, 1995), hipertensión (De la Fuente, 2005), enfermedades oculares, enfermedades pulmonares (asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los efectos crónicos de ERO y ERN son considerados agentes importantes en el proceso de envejecimiento.

Compuestos fenólicos como antioxidantes

Los compuestos fenólicos de las plantas se encuadran en diversas categorías, como fenoles simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzoico y cinámico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolizables, lignanos y ligninos.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades reductoras y estructura química. Estas características desempeñan un papel importante en la neutralización o secuestro de radicales libres y quelación de metales de transición, actuando tanto en la etapa de iniciación como en la de propagación del proceso oxidativo. Los intermediarios formados por la acción de antioxidantes fenólicos son relativamente estables, debido a la resonancia del anillo aromático presente en la estructura de estas sustancias (Soares, 2002).

Aunque las evidencias son claras sobre la acción *in vitro* de los fenoles y polifenoles con especies reactivos de oxígeno, estos compuestos pueden en algunas circunstancias, tal como el ascorbato y los carotenoides, mostrar características pro-oxidantes.

En la industria alimenticia la oxidación lipídica es inhibida por secuestradores de radicales libres. Los compuestos más utilizados par esta finalidad son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), el *terc*-butilhidroxiquinona (TBHQ), trihidroxibutilfenona (THBP) y galato de propilo (GP). Estudios han demostrado la posibilidad de que estos antioxidantes presenten algunos efectos tóxicos. El galato de propilo, por ejemplo, en presencia de peróxido de hidrógeno reacciona con iones ferrosos formando especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden posteriormente atacar blancos biológicos (Soares, 2002).

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes de la dieta. El consumo diario puede alcanzar 1 g, lo que es mucho mayor que el consumo de todos los otros fitoquímicos clasificados como antioxidantes. A pesar de la distribución abundante en plantas, los efectos de estos compuestos en la salud humana captaron la atención apenas en la década de los 90.

Plantas de estudio:

Fitoquímica del género *Lippia*

El género *Lippia* está constituido por más de 200 especies, que incluyen hierbas, arbustos, árboles de pequeño tamaño. Muchas de estas especies presentan importancia económica y uso amplio en la medicina tradicional (Pascual *et al.*, 2001). Los aceites esenciales de muchas especies de *Lippia* han sido analizados en vista que estas especies presentan por lo general un buen rendimiento de aceite esencial. Los componentes que son encontrados comúnmente en estos aceites son: limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, alcanfor, linalol, α -pineno y timol (Pascual *et al.*, 2001). En el caso de los aceites esenciales de especies de *Lippia*, una característica importante es el hecho que algunas plantas presentan varios quimiotipos, como el caso de *L. alba* (Pascual *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2003; Durán *et al.*, 2007), *L. graveolens* (Fischer *et al.*, 1997). Otros metabolitos encontrados en estas especies son flavonoides (Pascual *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007), iridoides (Rastrelli *et al.*, 1998), naftoquinonas (Costa *et al.*, 2001); alcaloides (Pascual *et al.*, 2001), verbascosideos (Kaneda *et al.*, 1992)

***Lippia graveolens* HBK (Verbenaceae)**

L. graveolens, conocida como orégano mexicano es reconocida por poseer múltiples propiedades medicinales, siendo ampliamente utilizada en la medicina tradicional (Pascual *et al.*, 2001). La planta crece en bosques secos y espinosos subtropicales, en forma de arbustos finos de hasta 3 m. Presenta hojas de 2-4 cm de largo. Las hojas aromáticas, secas o frescas, son utilizadas en América Central como saborizante de alimentos y son vendidas secas en el (Standley *et al.*, 1970). En Guatemala la planta se encuentra El Progreso, Chiquimula, El Petén y Zacapa, hasta altitudes de 350 m. Las hojas de la planta son colectadas en época de floración en lugares de crecimiento silvestre y secadas a la sombra. Entre los usos medicinales se encuentran los siguientes: tratamiento de enfermedades gastrointestinales, respiratorias, reumatismo, cáncer y tumores (Hernández *et al.*, 2003; Cáceres, 1996). La planta presenta saponinas, taninos e triterpenos (Cáceres, 1996). En un estudio reciente, 23 flavonoides fueron identificados en un extracto metanólico de *L. graveolens* por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos y detector de masas con ionización por "electrospray" (Lin *et al.*, 2007). En otro estudio fueron encontrados 10 iridoides y secoiridoides en hojas de *L. graveolens* de Guatemala, habiendo sido elucidadas las estructuras por RMN (Rastrelli *et al.*, 1998).

La composición del aceite esencial y la actividad antimicrobiana de *L. graveolens* fueron estudiadas previamente. Fischer *et al.* (1997), estudiaron la variabilidad de la composición del aceite de *L. graveolens* de cinco poblaciones de regiones áridas y suelo rocoso (El Subinal, El Oreganal, Agua Caliente, Buena Vista e San Jacinto). Rendimientos entre 1,24 e 3,56% (p/p), fueron obtenidos por hidrodestilación con aparato tipo Clevenger. Pérez (2008) determinó la variabilidad quimiotípica de *L. graveolens*, a partir del análisis de los aceites esenciales de nuevas poblaciones en los departamentos de El Progreso, Zacapa y Chiquimula, habiéndose encontrado que dentro de la misma población pueden encontrarse individuos de más de un quimiotipo. En el estudio se encontró que en la parte occidental de la región de estudio (departamento de El Progreso), predomina el quimiotipo mixto, mientras que en la parte más oriental (Chiquimula), predomina el quimiotipo carvacrol.

Rocha-Guzmán *et al.* (2007) obtuvieron un rendimiento de aceite esencial de 4,34% para *L. berlandieri* v. Shauer (sinonimia de *L. graveolens* de acuerdo con Pascual *et al.*, 2001). En el estudio fue evaluada la actividad antioxidante del aceite por diferentes métodos, encontrando un contenido fenólico total de 151 mg de GAE/mL y baja actividad antioxidante por el método del DPPH. Los autores no indicaron la composición del aceite esencial (Rocha Guzmán *et al.*, 2007).

L. graveolens es una planta de alto valor económico, siendo México un país exportador de materia seca. El precio de la hoja de orégano seca en México es de 8-9 pesos mexicanos por kilogramo (aproximadamente USD 0,75) siendo el precio del aceite esencial de orégano de USD 170/L correspondiendo al tipo carvacrol un valor más elevado (Gobierno mexicano, 2007).

En Guatemala la planta no es cultivada en gran escala, siendo colectada en poblaciones silvestres y vendida en el mercado.

***Lippia chiapasensis* Loes. (Verbenaceae)**

L. chiapasensis se presenta como un arbusto o árbol de ramas finas de hasta 4 m, con hojas 2-6 cm de largo, y 1,5-4,5 cm de ancho, usualmente agudas (Standley *et al.*, 1970). La planta es encontrada en bosques húmedos o secos, frecuentemente rocosos o en prados, entre 1500 y 3000 m en los departamentos de Baja Verapaz, Huehuetenango, San Marcos, Sololá y Totonicapán. La planta también se encuentra en México.

Hernández-Arteseros *et al.* (2006), estudiaron la composición del aceite esencial de las partes aéreas de *L. chiapasensis* colectadas en una población de Totonicapán, habiendo presentado el aceite un rendimiento de 0,9% por hidrodestilación y geranial (10,1%), trans-dihidrocarvona (14,2%), neral (7,3%) y 1,8-cineol (7,2%) como principales componentes. Hernández-Arteseros indica que la planta es usada por los habitantes locales de la etnia Quiché en el tratamiento de enfermedades respiratorias y nerviosas.

***Lippia substrigosa* Turcz. (Verbenaceae)**

L. substrigosa es un árbol de hasta 7 m, con hojas de 5-24 cm de largo y 2,5-12 cm de ancho. Se encuentra en bosques secos, en laderas abiertas y rocosas, entre 1200 y 2800 m. En Guatemala crece en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, El Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá y Zacapa. Se encuentra también en el sur de México (Standley *et al.*, 1970).

***Lippia myriocephala* Schlecht & Cham (Verbenaceae)**

L. myriocephala crece como arbusto o árbol de hasta 12 m de altura, con hojas de 5-15 cm de largo y 1-5 cm de ancho. Crece en bosques rocosos, húmedos o secos, frecuentemente en laderas, bosques húmedos, entre 300 y 2700 m. La planta se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala, Izabal, Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa en Guatemala, y en México, Honduras Británica, y de Honduras a Costa Rica (Standley *et al.*, 1970).

En un estudio reciente realizado en Costa Rica fueron encontradas 59 sustancias en el aceite esencial de *L. myriocephala*, correspondiendo a 92% de la composición del aceite analizado por cromatografía de gases. Los componentes principales encontrados fueron β -cariofileno (16,1%), germacreno D (11,2%) β -cubebeno (8,1%), geranilacetona (7,3%) y α -copaeno (6,26) (Vila *et al.*, 2004).

***Lippia cardiostegia* Benth (Verbenaceae)**

L. cardiostegia es un arbusto de 3 m con hojas de 2-7 cm de largo y 1-3 cm de ancho. Esta especie es extremadamente variable, especialmente en el tamaño de las hojas y largura de los pedúnculos (Standley *et al.*, 1970). Crece en planicies y laderas húmedas o secas, frecuentemente rocosas o con arbustos, en bosques mixtos abiertos entre 150 y 1,500 m. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jutiapa, El Quiché, Sacatepéquez e Santa Rosa. La planta crece también en el sur de México y en El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica.

***Lippia controversa* Moldenke (Verbenaceae)**

L. controversa es un arbusto de hasta 2 m con hojas agudas de 4-9 cm de largo. Esta especie es extremadamente variable, especialmente en tamaño de las hojas y largura de los pedúnculos (Standley *et al.*, 1970). Crece en planicies con vegetación y laderas húmedas o secas, entre 500 y 1400 m de altitud. La planta se encuentra en los departamentos de Escuintla, Jutiapa, Sacatepéquez y Santa Rosa, en Guatemala, y también en México y Honduras.

Estudios de Cuantificación e Identificación de Polifenoles en frutas y vegetales

Diferentes métodos han sido propuestos para identificar las agliconas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), con detector de arreglo de díodos. Hertog *et al.* (1992), determinaron cuantitativamente cinco agliconas flavonoides mayoritarios (quercetina, kaempferol, myricetina, luteolina y apigenina), en vegetales y frutas secas, por HPLC con detección UV, luego de hidrólisis de los glicósidos padre, habiendo obtenido buena reproducibilidad. Crozier *et al.* (1997), evaluaron diferentes columnas de HPLC de fase reversa para el análisis de flavonoides en extractos de cebolla hidrolizados, habiendo obtenido buenos resultados con columnas C18 Nova-Pak, Symmetry y C18 Genesis. Los autores lograron separar rutina, quercetina-3-glicósido, quercitrina, myricetina, luteolina, quercetina, apigenina, kaempferol e isorhammentina, utilizando elusión con gradiente. Häkkinen *et al.* 1998, describen un método para la detección simultánea de flavonoides selectos (kaempferol, quercetina, myricetina) y ácidos fenólicos (ácidos p-cumárico, cafeico, ferulico, p-hidroxibenzoico, gálico y elágico) en fresas. Los autores encontraron el ácido elágico como el principal componente fenólico en fresas. Merken *et al.* (2000), desarrollaron un sistema de HPLC para la separación y cuantificación de 17 flavonoides, como sus agliconas, las cuales representaron todas las cinco subclases. Diferentes alimentos representativos con concentraciones significativas de flavonoides de cada una de las subclases fueron analizados utilizando el sistema, con buena reproducibilidad y recuperación.

La limitante con dichos métodos, es que no han sido capaces de cubrir todos los polifenoles, porque se han enfocado solo en una parte de los flavonoides. Además, dichos métodos incluyen pretratamiento por hidrólisis, lo que implica la pérdida de contenido debido a la descomposición y polimerización de polifenoles. Se ha estimado que la hidrólisis produce una subestimación de alrededor del 50% del nivel real de polifenoles en alimentos (Hertog *et al.*, 1992), además de que los resultados se ven afectados por la temperatura, el tiempo y otros componentes. El método de HPLC para detectar simultáneamente agliconas y sus glucósidos sin hidrólisis, fue mejorado por Schieber *et al.* (2001), sin embargo, dicho método fue capaz de detectar solamente una aglicona, quercetina.

Sakakibara *et al.* (2003) desarrollaron un método por HPLC que permite cuantificar e identificar la totalidad de polifenoles, incluyendo las formas glicosidadas y agliconas, en vegetales, frutas y tés. Para ello, los autores extrajeron el material vegetal seco, con metanol al 90% y corrieron la cromatografía líquida sin hidrólisis. En el estudio, se obtuvieron recuperaciones de 68-92% con una variación en la reproducibilidad entre 1 y 9%. Los polifenoles fueron eluidos con buena resolución en 95 min en el siguiente orden: polifenoles simples, catequinas, antocianinas, glicósidos de flavonas, flavonoles, isoflavonas y flavanonas, agliconas de isoflavonas y flavanonas, antraquinonas, chalconas y teaflavinas.

Fueron identificados 65 polifenoles, en 59 alimentos de plantas y 3 tipos de té, los cuales fueron clasificados en relación con su contenido y clase, en flavonoides y polifenoles simples. Para algunas raíces, como zanahoria, rábano, se cuantificaron los polifenoles simples, mientras que los flavonoides se encontraron en concentraciones menores al límite de detección. En el caso de las hojas, el perejil y el rábano maduro presentaron apigeninas y quercetinas glicosidadas, respectivamente, en concentraciones mayores a 100 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de material fresco comestible. El cacao presentó (+)-galocatequina en concentración de 27000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de material fresco comestible, y catequina, epicatequina y epigallocatequina en concentraciones mayores a 300 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de material fresco. La berenjena presentó antocianinas en concentraciones entre 229 y 364 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de material fresco. En el caso del café, no fueron encontrados flavonoides; entre los polifenoles simples, se encontró cafeína en concentración mayor a 4000 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ material fresco y ácidos cinámicos en concentración de 1350 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de material fresco (Sakakibara *et al.*, 2003).

Uso de la Cromatografía Contracorriente en la separación de metabolitos secundarios

Shan He, *et al* (2007) Utilizando CCC con dos sistemas de solventes n-hexano-acetato de etilo-metanol-agua (1:2:1:2,v/v/v/v) fueron aplicados para separar y purificar polifenoles de la raíz de *Parthenocissus laetevirens*. Quadrangularin A y parthenocissin A fueron obtenidos de la muestra cruda en una sola etapa de separación, con purezas de 94.5% y 97.6 % respectivamente.

Quizhen Du, *et al* (2005) Purificó astilbina del rizoma del extracto de *Smilax glabra* utilizando HSCCC, equipada con una columna de 700 ml. De una forma simple, 1.5 g de la muestra cruda fue separada para dar 105 mg de astilbin y 48 mg de isoastilbin. Utilizando como fase estacionaria dos sistemas de solventes n-hexano-n-butanol-agua (1:1:2, v/v/v).

Akio *et al.* (2007) aislaron metabolitos secundarios en diversos extractos de productos naturales, utilizando HSCCC, con el sistema de solventes n-hexano-acetato de metilo-acetonitrilo-agua a un volumen de radio de 4:4:3:4. Los metabolitos presentes en cada producto natural fueron extraídos efectivamente con el sistema de solventes.

Susanne *et al.* (2007) aislaron 9-cis-neoxanthin con un 94 % de pureza, de un extracto crudo de hojas de espinaca. La separación se realizó por CCC con el sistema de solventes hexano-etanol-agua y un volumen de radio 5:5:4.5 y un porcentaje de flujo de 3 ml/min a 850 rpm.

JUSTIFICACIÓN

La diversidad climática, localización geográfica y la historia geológica del territorio, han ocasionado que en Guatemala se tenga la convergencia de las floras tropicales y árticas distribuidas en siete biomas. Se estima que son 7,754 las especies de plantas conocidas en Guatemala (Villar, 2008). Es así, como la flora de Guatemala tiene un enorme potencial para el descubrimiento y aprovechamiento de productos naturales que pueden tener beneficios para la salud del ser humano, así como aplicaciones industriales que podrían representar una ventaja económica para las poblaciones de escasos recursos.

Dentro de las plantas que presentan elevado potencial para la obtención de metabolitos secundarios de aplicación en las industrias de alimentos y medicamentos, y como fuente de alimentos funcionales, se encuentran las plantas del género *Lippia*, dentro de las cuales, *L. graveolens* (orégano) y *L. chiapasensis*, son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias. En un estudio reciente se determinó que *L. graveolens* presenta altas concentraciones de fenoles y flavonoides, aunque en el estudio solo se realizó su cuantificación de manera total, sin obtener la información sobre la estructura de los flavonoides específicos presentes en la planta.

Los flavonoides son metabolitos secundarios a los cuales se les atribuye propiedades beneficiosas para la salud, entre ellas, actividad antioxidante, anticáncer y antitumoral. Por lo mismo, en la actualidad existe una búsqueda intensa de fuentes de estos metabolitos, que pueden ser utilizados como nutraceuticos. En vista que en un estudio reciente se encontró que *L. graveolens* presenta un alto contenido de flavonoides totales, se presume que otras plantas del género *Lippia* podrían contener contenido elevado y variado de flavonoides, por lo que en este proyecto se plantea el estudio del contenido y la identificación de flavonoides en seis plantas de dicho género. Varias de estas plantas presentan amplio uso en la medicina tradicional, por lo que la presencia de flavonoides podría ser la explicación para las propiedades medicinales que se les atribuye.

A pesar que en Guatemala se han realizado estudios sobre la presencia de sustancias activas en plantas nativas, no se cuenta con técnicas y metodología que permitan el aislamiento y purificación de productos naturales, en cantidades que permitan su evaluación para el desarrollo de productos en las industrias farmacéutica, cosmética, perfumería, alimentos, etc. En la actualidad, la separación de metabolitos secundarios de extractos crudos de plantas es un reto para los investigadores en el área de la Química de Productos Naturales, y la Cromatografía Flash y la Cromatografía Contracorriente ofrecen muchas ventajas comparada con las técnicas fitoquímicas de purificación, especialmente las cromatográficas con soporte sólido.

La principal ventaja es que la Cromatografía contracorriente es una forma de cromatografía líquido-líquido, que no utiliza soporte sólido, de esta forma no hay pérdida de compuestos o de bioactividad debido a las interacciones entre la Fase sólida y los compuestos a purificar. Así la integridad de los compuestos se mantiene durante el proceso de purificación, lo cual es un importante factor en la investigación de extractos bioactivos.

De esta manera, en el presente proyecto se plantea el estudio de los flavonoides de seis plantas nativas del género *Lippia*, a través de su separación y purificación por Cromatografía Flash y Contracorriente, y su posterior identificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Masas y por Resonancia Magnética Nuclear, para lo cual se contará con la colaboración del Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturales, de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

OBJETIVOS

Objetivo General

Separar, purificar e identificar los flavonoides presentes en seis plantas del género *Lippia* (*L. graveolens*, *L. chiapasensis*, *L. substrigosa*, *L. myriocephalla*, *L. cardiostegia* y *L. controversa*) de diferentes poblaciones de Guatemala.

Objetivos Específicos

Separar, aislar y purificar los flavonoides en sus formas aglicona y glicosilados de las plantas de estudio del género *Lippia* por Cromatografía Flash y Cromatografía Contracorriente,

Identificar los flavonoides en sus formas aglicona y glicosilados de las plantas de estudio del género *Lippia* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Resonancia Magnética Nuclear de protones y de carbono-13.

Evaluar las variaciones quimiotípicas de las plantas de estudio, por medio de la composición de flavonoides.

Evaluar el potencial de utilización como nutraceuticos de los flavonoides presentes en las plantas de estudio del género *Lippia*.

METODOLOGÍA

Muestreo

Con base en la información de la *Flora of Guatemala* y datos de colectas de proyectos de investigación anteriores se realizaron viajes de campo para la colecta de las seis especies de *Lippia* a estudiar. Las colectas se realizaron en los departamentos de Totonicapán, Santa Rosa, Chiquimula, Zacapa, El Progreso y Guatemala en los meses de marzo, abril, mayo, junio, julio, agosto y octubre.

Se realizó una lectura con el sistema de posicionamiento geográfico (GPS) para referenciar el lugar.

Se colectó de 0.5 a 2 Kg de partes aéreas de cada planta que fueron transportados a la ciudad de Guatemala para su procesamiento.

Preparación de la muestra

Las muestras fueron cortadas y secadas a temperatura ambiente en bandejas en secador solar y guardadas en bolsas plásticas para su posterior procesamiento.

Extracción de flavonoides

Se extrajo el material vegetal seco y molido (50 mg) con 2 mL de una solución de metanol (90%) con ácido acético (0.5%), con adición de 50 nmol de flavona en DMSO. Se usó flavona como estándar interno por no ser muy común en vegetales y frutas. En caso de conocerse el contenido de flavona en un tipo de material, puede usarse flavonol o chalcona como estándar interno. La solución es colocada en ultrasonido por 1 min, y recuperar el sobrenadante por centrifugación a 3000 rpm por 10 min. Repetir la extracción del material, dos veces. Luego los extractos son secados en rotavapor. El residuo se disuelve en 0.5 mL de DMSO y se filtra a través de un filtro de membrana Millex-LG de 0.2 μm (Millipore). Antes del análisis por HPLC. El tratamiento debe repetirse independientemente tres veces o más hasta que la variación en la recuperación calculada con el estándar interno sea menor que 5%.

Fraccionamiento de extractos por cromatografía Flash

Por medio de cromatografía flash, técnica que permite la separación y purificación de metabolitos secundarios en cargas de hasta 200 mg, se separaron los principales flavonoides simples presentes en los extractos obtenidos de las plantas de estudio.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se realizó el análisis en un sistema de HPLC equipado con control de temperatura de la columna, con software de manejo de información, y detector de arreglo de diodos (DAD), con rango de 200 a 600 nm. La columna, Capcell pak C18 UG120 (250 x 4.6 mm i.d., S-5, 5 mm), con columna de guarda (10 x 4.0 mm d.i.) es ajustada a 35°C. El sistema se operó con elusión en gradiente con solución A, compuesta de fosfato de sodio 50 mM (pH 3.3) y metanol al 10%, y solución B, compuesta de metanol al 70%, con un fluido de 1 mL/min, como sigue: inicialmente 100% de solución A; por 15 minutos, 70% de A; por los siguientes 30 min, 65% de A; por los siguientes 20 min, 60% de A; por los siguientes 5 min, 50% de A; y finalmente 0% de A por 25 min. El volumen de inyección de extracto debe ser de 10 µL.

Análisis de flavonoides

Inicialmente se elaborará una biblioteca, comprendiendo los tiempos de retención en HPLC y los espectros de las agliconas, con detector de arreglo de diodos para un mínimo de 80 estándares, para las cuales se elaborarán las correspondientes curvas de calibración.

Los extractos de los alimentos son analizados utilizando el mismo sistema de HPLC. Los picos de los flavonoides detectados se comparan con respecto al tiempo de retención de los estándares en la biblioteca y las agliconas son identificadas por comparación con los espectros de estándares químicos. Cuando los polifenoles detectados no coinciden en términos de tiempo de retención con algunos de los estándares, las muestras son hidrolizadas (ver sección 6.7.6) y analizadas de nuevo por HPLC. En cuanto a los cromatogramas sin hidrólisis, algunos picos son identificados sobre la base de sus tiempos de retención y los espectros para agliconas en la biblioteca.

Los análisis cuantitativos se desarrollaron por cromatografía de las muestras no hidrolizadas. Entre los glucósidos polifenólicos, los que se encuentran en la biblioteca relacionados con las agliconas serán determinados a partir de la absorbancia de los glicósidos, y los glicósidos no presentes en la biblioteca se determinarán a partir de la absorbancia de las agliconas.

Así, la absorbancia de la quercetina-3-O-rutinosido (rutina) fueron usadas para todas las quercetinas glicosiladas, mientras que el ácido cafeico será usado para la determinación de los ácidos cinámicos glicosilados.

Las curvas de calibración fueron construidas con las longitudes de onda específicas de los estándares químicos: 250 nm para los ácidos benzoicos e isoflavonas; 280 nm, para las flavanonas, catequinas, cafeína, floretina, ácido elágico y flavona; 320 nm para ácidos cinámicos, flavonas diferentes de flavona y chalconas; 370 nm para los flavonoles; y 510 nm para la antocianinas.

Confirmación estructural por HPLC-MS y RMN

Por último, los flavonoides específicos fueron confirmados por cromatografía líquida de alta resolución con detector de masas y por Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 e Hidrógeno, en la Universidad Federal de Río de Janeiro Brasil. Dichas técnicas son las más poderosas para la elucidación estructural de productos naturales complejos, como es el caso de los flavonoides glicosilados.

Hidrólisis

En los casos en que se requieran los perfiles de las agliconas para la identificación de glucósidos, las muestras trituradas son hidrolizadas por una modificación del método de Hertog *et al.* (1992). 50 mg de material vegetal son colocados en un tubo de ensayo con tapón de hule y mezclados con 4 mL de solución acuosa de metanol al 62.5% conteniendo 0.5 mg/mL de terc-butilhidroquinona y 1 mL de HCl 2 N. El tapón de hule es perforado, y el tubo es calentado a 90°C por 2 h, luego la muestra es extraída con dos volúmenes de acetato de etilo. El extracto es secado bajo flujo de nitrógeno gaseoso, disuelto en 0.5 mL de DMSO, filtrado a través de un filtro de 0.2 mm, y analizada por HPLC.

Extracción por Microextracción en Fase Sólida (SPME)

Una fibra de SPME de PDMS (Polidimetilsiloxano) será utilizada para extraer flavonoides de los extractos alcohólicos, para su inyección directa en el cromatógrafo. Para esto, se harán experimentos de optimización en cuanto a temperatura, tiempo, tiempo de precalentamiento, tiempo de saturación.

Determinación de la actividad antioxidante

Se extrajo 1g de muestra molida con 25 mL de metanol acuoso al 80% y se agitó mecánicamente por 120 min a 70°C. Para las muestras que contienen antocianinas (frutas púrpuras-rojas) realizar la extracción a 25°C, para prevenir la ruptura de los pigmentos a base de antocianinas. La mezcla es filtrada (Whatman No. 5) en un embudo de Büchner, y el filtrado es utilizado para determinación de la actividad antioxidante.

Para la determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH se utilizó la metodología desarrollada por Choi *et al.* (2000). La evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante es hecha siguiendo la metodología descrita en la literatura, monitoreándose el consumo de radical DPPH por las muestras, a través de la medida de la disminución de las soluciones de diferentes concentraciones (Brand-Williams *et al.*, 1995 *et al.*; Sánchez-Moreno, *et al.*, 1998). Estas mediciones se realizan en un espectrofotómetro UV-Vis en la longitud de onda 515 nm, teniendo como control positivo, rutina y ácido gálico.

Se prepararon 50 mL de solución madre de DPPH en metanol en una concentración de 40 µg/mL, mantenida en refrigeración y protegida de la luz. Se realizan diluciones de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 y 1 µg/mL. La curva de calibración es elaborada a partir de las medidas de absorbancia a la longitud de onda de 515 nm de todas las soluciones (1 a 40 µg/mL) medidas en cubetas de vidrio con trayectoria óptica de 1 cm y teniendo como blanco al metanol. Las medidas de absorbancia son efectuadas en triplicado en intervalos de 1 min entre cada lectura.

Soluciones de los extractos etanólicos (500 µg/mL), de los controles positivos en metanol y de un estándar de BHT (butilhidroxitolueno), son diluidas en las concentraciones de 250, 200, 150, 100, 50 y 25 mg/mL. Las medidas de las absorbancias de las mezclas reactivas (0.3 mL de la solución de la muestra o de control positivo y 2.7 mL de la solución madre de DPPH en la concentración de 40 mg/mL) son hechas a 515 nm, en los 1º, 5º y 10 min, a cada 10 min hasta completar 1 h. La mezcla de metanol (2.7 mL) y solución metanólica del extracto (0.3 mL) es utilizada como blanco.

A partir de la ecuación de la curva de calibración y de los valores de absorbancia en el tiempo de 30 min para cada concentración evaluada, se determinan los porcentajes de DPPH remanentes (%DPPH_{REM}), conforme la ecuación:

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0} \times 100$$

donde $[DPPH]_{T=t}$ corresponde a la concentración de DPPH en el medio, después de la reacción con el extracto y $[DPPH]_{T=0}$ es la concentración inicial de DPPH, o sea, 40 µg/mL (100 µmol/mL) (Brand-Williams, 1995).

La concentración eficiente, cantidad de antioxidante necesaria para decrecer la concentración inicial de DPPH en 50% (CE₅₀), es determinada a partir de una curva exponencial de primer orden, que se obtiene ploteando en la abscisa las concentraciones de la muestra (µg/mL) o de control positivo y en la ordenada, el porcentaje de DPPH remanente (%DPPH_{REM}) (Sánchez-Moreno, 1998)

Los valores de absorbancia en todas las concentraciones evaluadas, en el tiempo de 30 min, son también convertidos en porcentaje de actividad antioxidante (AA), determinada por la ecuación:

$$\%AA = \{[Abs_{control} - (Abs_{muestra} - Abs_{blanco})] \times 100\} / Abs_{control}$$

donde $Abs_{control}$ es la absorbancia inicial de la solución metabólica de DPPH y $Abs_{muestra}$ es la absorbancia de la mezcla reaccionante (DPPH+muestra) (Moreira, 2005).

La cinética de las sustancias antioxidantes será determinada a partir de las diferentes mediciones de la concentración de DPPH en el tiempo, la cual será graficada.

Determinación de Fenoles totales

Esta prueba se realizó para correlacionar el valor de fenoles totales, con la cuantificación de flavonoides que se realizará por HPLC y con la actividad antioxidante.

Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se extrajeron 200 mg de muestra vegetal pulverizada por 2 h con 2 mL de metanol al 80% conteniendo 1% de ácido clorhídrico, a temperatura ambiente con un agitador mecánico. Centrifugar la muestra a 1000g por 15 min y decantar el sobrenadante en viales de 4 mL.

Se mezclaron 100 mL del extracto con 0.75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (previamente diluido 1:10 con agua destilada) y permitir el desarrollo de la reacción a 22°C por 5 min. Añadir 0.75 mL de solución acuosa de bicarbonato de sodio (60mg/L). Medir la absorbancia a 725 nm, después de transcurridos 90 min. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido ferúlico, el cual es usado como estándar.

RESULTADOS

Colecta de individuos

Se presenta la información de colecta de individuos de *L. graveolens*, *L. chiapasensis*, *L. substrigosa*, *L. myriocephala*, *L. cardiostegia* y *L. controversa* realizada en el 2011 (Tabla 1). Es importante mencionar que en la estación seca (meses de marzo y abril) el follaje de las plantas fue poco abundante debido a la falta de lluvias. Sin embargo, en la estación lluviosa (meses junio-octubre) el follaje de los mismo individuos fue muy abundante, lo que permite concluir la importancia de realizar las colectas en los meses de lluvia para un mejor aprovechamiento de follaje de estas especies.

Tabla 1. Información de colecta de seis individuos del género *Lippia*

Especie	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Coordenadas
<i>L. graveolens</i>	San Agustín Acasaguastlán, El Progreso	10/03/2011	N 14° 55.312' W 089° 56.452'
<i>L. graveolens</i>	San Agustín Acasaguastlán, El Progreso	10/03/2011	N 14° 55.302' W 089° 56.459'
<i>L. graveolens</i>	Casas de Pinto, Zacapa	09/06/2011	N 15° 01.572' W 089° 36.852'
<i>L. graveolens</i>	El Oreganal, Zacapa	09/06/2011	N 15° 00.845' W 089° 43.475'
<i>L. graveolens</i>	El Carrizal, Chiquimula	10/08/2011	N 14° 39.303' W 089° 29.842'
<i>L. graveolens</i>	El Carrizal, Chiquimula	10/08/2011	N 14° 39.300' W 089° 29.839'
<i>L. graveolens</i>	La Tuna, Chiquimula	10/08/2011	N 14° 34.488' W 089° 35.416'
<i>L. graveolens</i>	El Subinal, El Progreso	10/08/2011	N 14° 51.250' W 090° 08.083'
<i>L. cardiostegia</i>	El Carrizal, Chiquimula	10/08/2011	N 14° 39.401' W 089° 29.596'
<i>L. chiapasensis</i>	Paraje Chiyax II, Totonicapán	13/07/2011	N 14° 55.608' W 091° 27.245'

<i>L. chiapasensis</i>	San Cristóbal Totonicapán, Totonicapán	13/07/2011	N 14° 55.708' W 091° 27.299'
<i>L. chiapasensis</i>	San Cristóbal Totonicapán, Totonicapán	13/07/2011	N 14° 55.682' W 091° 27.235'
<i>L. chiapasensis</i>	San Cristóbal Totonicapán, Totonicapán	13/07/2011	N 14° 55.665' W 091° 26.921'
<i>L. myriocephala</i>	Mixco, Guatemala	15/08/2011	N 14° 39.150' W 090° 34.160'
<i>L. substrigosa</i>	Mixco, Guatemala	15/08/2011	N 14° 39.152' W 090° 34.160'
<i>L. controversa</i>	Barberena, Santa Rosa	15/10/2011	N 14° 18.366' W 090° 21.900'

Flavonoides encontrados en las plantas de estudio

La Tabla 2 presenta los resultados de los flavonoides encontrados en las especies del género *Lippia* estudiadas, resultados obtenidos por HPLC y RMN. En la columna a la derecha se presentan los flavonoides identificados y los que no fueron identificados, por falta de estándares se presenta la familia a la que pertenecen.

Tabla 2. Flavonoides detectados en las plantas de estudio.

Planta	Localidad de colecta y mes	Código muestra	Flavonoides detectados
<i>L. graveolens</i>	El Subinal (mixto) 0811	L9set2011	Flavanona (62') flavanona (70.5')
<i>L. graveolens</i>	Km 93.5 (mixto) 0311	N25092011	Flavanona (62') flavanona (70.5')
<i>L. graveolens</i>	El Oreganal (mixto) 0611	J24092011	Flavanona (62') flavanona (70.5')
<i>L. graveolens</i>	El Oreganal (timol) 0611	K22092011	Flavanona (45'); naringenina (63'); flavonol (65') flavanona (70')
<i>L. graveolens</i>	San José (timol) 0611	G11092011	Flavanona (45'); naringenina (63'); flavonol (65') flavanona (70')
<i>L. graveolens</i>	Casa de Pinto (timol) 0906	I24092011	Flavanona (45'); naringenina (63'); flavonol (65') flavanona (70')
<i>L. graveolens</i>	Casas de Pinto (timol) 0811	R26092011	Flavanona (45'); naringenina (63'); flavonol (65') flavanona (70')
<i>L. graveolens</i>	El Carrizal 1, (carvacrol) 0611	A10092011	Naringenina (63'); taxifolina (44.0'); flavanona (69'); flavanona (73')
<i>L. graveolens</i>	El Carrizal 2, (carvacrol) 0811	C24092011	Naringenina (63'); taxifolina (44.0'); flavanona (69'); flavanona (73')
<i>L. graveolens</i>	La Tuna, (carvacrol) 0811	E11092011	Naringenina (63'); taxifolina (44.0'); flavanona (69'); flavanona (73')
<i>L. chiapasensis</i>	Chiyax 2, 0711	M24092011	Verbascósido (38.9'); ácido cinámico (53.2'); flavona (53.2'); flavona (65.7'); flavonol (71.5'); flavona (72.3'); flavonol (72.8')
<i>L. chiapasensis</i>	San Cristobal 3, 0711	O25092011	Verbascósido (38.9'); ácido cinámico (53.2'); flavona (53.2'); flavona (65.7'); flavonol (71.5'); flavona (72.3'); flavonol (72.8')
<i>L. chiapasensis</i>	San Cristobal 2, 0611	B21092011	Verbascósido (38.9'); ácido cinámico (53.2'); flavona (53.2'); flavona (65.7'); flavonol (71.5'); flavona (72.3'); flavonol (72.8')
<i>L. chiapasensis</i>	San Cristobal 1, 0711	P25092011	Verbascósido (38.9'); ácido cinámico (53.2'); flavona (53.2'); flavona (65.7'); flavonol (71.5'); flavona (72.3'); flavonol (72.8')
<i>L. substrigosa</i>	0811	F25092011	Flavona (52.9')
<i>L. cardiostegia</i>	El carrizal, 0811	Q22092011	Flavonoide no identificado (62.7')
<i>L. controversa</i>	Santa Rosa	H21092011	ácido cinámico (36.4'); verbascósido (38.9'); flavona (53.0')

Tabla 3. Fenoles totales en hojas de especies de *Lippia*

Especie	Lugar de colecta	Fecha de colecta	meq ag/g*	X ± DE
<i>L. graveolens</i>	San Agustín Acasaguastlán, El Progreso	10/03/2011	59.57	67.75±14.39
			59.31	
			84.36	
<i>L. graveolens</i>	El Oreganal, Zacapa	09/06/2011	74.71	65.17±10.75
			67.28	
			53.52	
<i>L. graveolens</i>	El carrizal, Chiquimula	10/08/2011	69.83	70.81±4.10
			75.32	
			67.30	
<i>L. graveolens</i>	El Subinal, El Progreso	18/08/2011	73.62	---

<i>L. chiapasensis</i>	San Cristobal Totonicapán, Totonicapán	13/07/2011	53.19	48.60±6.28
			51.16	
			41.44	
<i>L. chiapasensis</i>	San Cristobal Totonicapán, Totonicapán	13/07/2011	38.94	36.33±2.38
			35.80	
			34.27	
<i>L. controversa</i>	Barberena, Santa Rosa	15/10/2011	28.22	27.21±1.21
			27.54	
			25.87	
<i>L. cardiostegia</i>	El Carrizal, Chiquimula	10/08/2011	26.70	24.06±3.73
			21.42	

<i>L. substrigosa</i>	Mixco, Guatemala	15/08/2011	40.14	33.86±5.44
			30.86	
			30.58	
<i>L. myriocephala</i>	Mixco, Guatemala	15/08/2011	34.15	29.92±6.92
			33.67	
			21.93	

Fuente: Datos experimentales

* miliequivalentes de ácido gálico/gramo de material vegetal seco

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Tabla 2 presenta los resultados de los flavonoides detectados en las plantas del género *Lippia* estudiadas en el proyecto. Los cromatogramas obtenidos por HPLC de los extractos de las plantas, se presentan en las Figuras en los Anexos. Los flavonoides fueron identificados por medio de la comparación de los tiempos de retención de los picos en los cromatogramas contra los obtenidos a partir de estándares puros, y utilizando también la información de los espectros UV.

Como puede apreciarse en los resultados, el perfil cromatográfico de los flavonoides de *L. graveolens* (orégano mexicano) presenta diferencias según el quimiotipo, anteriormente identificado por la composición del aceite esencial de la planta, como puede observarse en las figuras 1, 3 y 5 en los anexos, en que se presentan los cromatogramas obtenidos para los quimiotipos mixto, timol y carvacrol, respectivamente. Los cromatogramas presentados en las Figuras 2, 4 y 6 en los anexos, presentan la expansión de la región de los cromatogramas 1, 3 y 5, respectivamente, en que se observan la mayor parte de flavonoides. Es importante resaltar que no se observaron diferencias en los flavonoides presentes en las plantas pertenecientes al mismo quimiotipo y colectadas en diferentes localidades como puede apreciarse en las figuras 1 a 6, en que se presentan comparaciones de los cromatogramas obtenidos para muestras de *L. graveolens* del mismo quimiotipo y diferentes localidades de colecta. Esto confirma que el quimiotipo de *L. graveolens*, determina también la diversidad en la composición polifenólica, al igual que anteriormente se comprobó con la composición del aceite esencial. Otro aspecto importante, es que ninguna de las muestras de *L. graveolens* presentaron flavonoides glicosidados, lo que puede deberse a una posible hidrólisis que debería confirmarse con experimentos futuros.

El quimiotipo mixto de *L. graveolens* presenta el perfil cromatográfico más simple (Figuras 1 y 2), habiendo presentado dos flavonoides tipo aglicona. Este quimiotipo se caracteriza por poseer un aceite esencial exento de los fenoles timol o carvacrol que caracterizan a los otros dos quimiotipos, por lo que se puede presumir que una de sus características será la mínima producción de fenoles, ya sea tipo flavonoide o más simples. El alto contenido de flavonoides está confirmado por el resultado obtenido en la prueba de fenoles del extracto de la planta, al haberse obtenido 67.75 +/- 14.39 meq de ácido gálico/g de extracto, siendo la planta que presentó el segundo mayor valor promedio de fenoles totales, aunque también una mayor dispersión, comparado con el quimiotipo timol, que presentó el tercer valor más alto.

En el caso del quimiotipo timol de *L. graveolens*, cuyos cromatogramas son el 3 y 4, éste presentó naringenina (flavanona), así como otras dos flavanonas y un flavonol, pendientes de confirmar su identidad. Los cuatro flavonoides encontrados son agliconas. La naringenina es un flavonoide que ha mostrado efectos benéficos para la salud, como alta actividad antioxidante y la reducción en los niveles de colesterol en el organismo o cambios en la sensibilidad a la insulina, por lo que su presencia en *L. graveolens* tipo timol le daría un valor agregado al uso

de la planta en alimentos. Un cromatograma y el espectro UV de estándar de naringenina se presentan en las Figuras 13 y 14 de anexos, respectivamente. La elevada presencia de flavonoides está confirmada por el valor promedio obtenido en la prueba de fenoles totales (65.17 +/- 10.65 meq ácido gálico/g de planta, en Tabla 3), lo cual le confiere alto valor agregado a la planta que ya posee valor económico importante por su alto contenido de aceite esencial, encontrándose en el estudio que la alta presencia de flavonoides puede permitir aprovechar la parte no volátil de la planta, como nutracéutico.

Por otra parte, el quimiotipo carvacrol de *L. graveolens*, presentó también cuatro flavonoides agliconas, habiendo sido identificados naringenina y taxifolina, y estando pendientes de confirmación de identidad dos flavanonas. Como puede apreciarse en las figuras 5 y 6 en los anexos, los cromatogramas del quimiotipo carvacrol fueron muy similares, encontrándose en los tres cromatogramas comparados los cuatro flavonoides. La taxifolina es un flavanolol con alta actividad antioxidante que presenta beneficios para el sistema cardiovascular y propiedades anti-inflamatorias, por lo que está registrado y es comercializado en diferentes países. En las Figuras 15 y 16 en anexos se presentan un cromatograma y el espectro UV de la taxifolina. La presencia de taxifolina y naringenina en el quimiotipo carvacrol de *L. graveolens* le confiere también valor agregado a esta planta, cuyo aceite esencial presenta un alto contenido de carvacrol (arriba de 55%) y timol (5-10%). Esto indica que la planta produce diferentes tipos de fenoles, los cuales son especies antioxidantes que beneficiarían el uso de la planta en alimentos, como se usa en forma tradicional. *L. graveolens* tipo carvacrol presentó el más alto contenido de fenoles (70.81 +/- 4.10 meq de ácido gálico/g de planta, en Tabla 3), representando un mayor valor agregado para la planta, que posee un alto contenido de aceite esencial y que por lo tanto, también la parte no volátil de la planta puede presentar potencial económico como nutracéutico.

En el caso de *L. chiapasensis*, esta planta presentó la mayor diversidad de flavonoides, como puede apreciarse en las Figuras 7 y 8 en anexos. Todas las muestras presentaron los mismos cinco flavonoides (tres flavonas y dos flavonoles, pendientes de confirmación de identidad), así como verbascósido y un ácido cinámico. El verbascósido consiste en dos moléculas de ácido cafeico enlazadas con dos moléculas de azúcar, que presenta alta actividad antioxidante y anti-inflamatoria, así como propiedades antitumorales y antibacterianas, lo cual le confiere a la planta un valor agregado. Esta planta presentó un contenido importante de fenoles (36-33-48.60 meq ácido gálico/g de planta, en Tabla 3), solo después de los tres quimiotipos de *L. graveolens*, por lo que se considera que también la parte no volátil de la planta presentaría valor agregado, luego de la extracción del aceite esencial, como posible nutracéutico.

En cuanto a la planta *L. substrigosa*, presentó un único flavonoide tipo flavona aglicona pendiente de confirmar su identidad, en alta proporción al minuto 52.9, como puede apreciarse en la figura 9, en el cual se observa un cromatograma bastante simple. Los otros picos que se observan no corresponden a flavonoides.

L. substrigosa es una planta frondosa que no es muy utilizada como planta medicinal, y que presenta un pobre contenido de aceite esencial. Deberá investigarse el potencial uso del flavonoide encontrado, para evaluar un potencial uso. *L. substrigosa* presentó un contenido importante de fenoles totales (33.86 +/- 5.44 meq ácido gálico/g de planta, Tabla 3), lo cual podría presentar potencial económico.

La planta *L. cardiostegia* presentó el cromatograma más simple (Figura 10 en anexos), con un flavonoide desconocido en el minuto 62.7, cuyo espectro UV con un máximo de absorción en 370 nm puede apreciarse en la Figura 11 en anexos. No fue posible identificar el flavonoide, aún por RMN-H o RMN-¹³C, ya que la muestra no fue bien purificado y presentó un alto contenido de clorofila que enmascaró las señales del compuesto. *L. cardiostegia* no es muy utilizada en la medicina tradicional, por lo que la presencia del flavonoide, una vez este sea identificado, podría darle valor agregado a la planta. *L. cardiostegia* presentó el menor valor de fenoles totales (24.06 +/- 3.73 meq ácido gálico/g de planta, Tabla 3), lo cual coincide con que se haya encontrado un solo flavonoide. Sin embargo, el hecho de que sea un solo flavonoide significa que se encuentra en mayor concentración y que facilitaría el aislamiento y purificación de la sustancia, para efectos de realizar ensayos de actividad biológica, y comercialización.

Los valores de fenoles totales de las muestras de las especies de *Lippia* (Tabla 3) muestran valores diferentes entre especies, siendo el mayor valor para los individuos de *L. graveolens* y el menor para *L. cardiostegia*. Sin embargo, es posible notar la relación que presentan los individuos de una misma especie entre sí. En el caso de *L. graveolens* los valores fueron muy similares entre sí. Cabe mencionar que los compuestos con función fenol (principalmente timol y carvacrol) presentes en el aceite esencial de esta especie pueden estar influyendo directamente en el valor del contenido total de fenoles, haciendo que estos individuos presenten los valores más altos de todos.

Por su parte, las especies *L. chiapasensis*, *L. cardiostegia*, *L. controversa*, *L. substrigosa* y *L. myriocephala* por carecer de estos compuestos presentan valores significativamente menores.

L. cardiostegia y *L. controversa* muestran valores muy similares entre sí, y es importante considerar que estas dos especies son muy similares entre sí morfológicamente, lo que haría suponer que aún a nivel químico están muy relacionadas. La misma tendencia se da entre *L. chiapasensis* y *L. substrigosa* ya que también son muy similares morfológicamente y en valores de fenoles totales obtenidos en esta investigación. Teniendo en cuenta los resultados de Velioglu *et al.* en 1998, los cuales mostraron la correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles la *L. graveolens* se presume es la especie que presentaría mayor actividad antioxidante del grupo estudiado.

Por último, la Figura 12 en anexos presenta el cromatograma obtenido para una muestra de *L. controversa*. La planta presentó verbascósido, un ácido cinámico y una flavona (Tabla 2), pendiente de confirmar su identidad por otros datos espectroscópicos. La presencia de verbascósido debería conllevar a estudios sobre las propiedades medicinales de la planta, ya que no ha sido muy estudiada y no utilizada en la medicina tradicional. El contenido de fenoles totales de *L. controversa* fue moderado (27.21 +/- 1.21 meq de ácido gálico/g de planta, Tabla 3), siendo la segunda en valor más bajo de las plantas estudiadas.

CONCLUSIONES

Todas las plantas estudiadas presentaron flavonoides en forma aglicona, y dos plantas (*L. chiapasensis* y *L. controversa*), presentaron verbascósido y ácido cinámico. No se encontraron flavonoides glicosidados.

Las diferencias en diversidad de flavonoides encontrada en los diferentes quimiotipos de *L. graveolens*, permiten diferencias a las plantas de estudio por su quimiotipo, siendo el quimiotipo carvacrol el más diverso y con mayor contenido de flavonoides y el quimiotipo mixto el menos diverso y con menor contenido de flavonoides. Las tres plantas poseen contenido de flavonoides que presenta potencial para su uso como nutracéutico.

L. chiapasensis presentó la mayor diversidad de flavonoides entre las plantas de estudio, al haber presentado verbascósido, ácido cinámico, tres flavonas y dos flavonoles, lo cual le confiere potencial para su uso como nutracéutico.

L. cardiostegia presentó un único flavonoide, pendiente de identificación, y que podría ser nuevo. Al ser único, permitiría su aislamiento y purificación con mayor facilidad para propósitos de evaluación de actividad biológica y posible comercialización como nutracéutico.

L. controversa y *L. substrigosa* presentaron baja diversidad de flavonoides por lo que presentan el menor potencial para su uso como nutracéutico.

Los tres quimiotipos de *L. graveolens* presentaron el mayor contenido de fenoles totales (65 – 71 meq ácido gálico/g), lo cual en conjunto con la presencia de flavonoides les confiere el mayor potencial como nutracéutico, siendo el quimiotipo carvacrol el que presentaría mayor valor agregado.

L. chiapasensis presentó un contenido elevado de fenoles totales, lo cual en conjunto con el contenido de flavonoides, le confiere un alto valor agregado a la parte no volátil de la planta.

L. cardiostegia presentó un contenido moderado de fenoles totales, pero al corresponder a un único flavonoide, le confiere potencial económico por la mayor facilidad para su aislamiento y purificación, para posible uso como nutracéutico.

L. substrigosa y *L. controversa* presentaron valores moderados de contenido de fenoles totales, por lo que presentan el menor potencial como nutracéuticos.

RECOMENDACIONES

Es importante mejorar la metodología de preparación de la muestra, para evitar posibles hidrólisis, ya que en el estudio se encontraron únicamente flavonoides agliconas, existiendo la posibilidad de que haya ocurrido hidrólisis de algunos compuestos.

Debe continuarse con la elucidación estructural del flavonoide encontrado en *L. cardiostegia*, ya que por no haberse realizado una buena purificación, el espectro de RMN fue enmascarado por clorofila. Esto implica un mejoramiento en la metodología de preparación de la muestra.

Es importante realizar estudios sobre la actividad biológica de los flavonoides encontrados, tanto en extractos como en forma aislada, para obtener mayor valor agregado para las plantas de estudio en su posible uso como nutracéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Viala, C., Remesy, C., Chap, H., Payraastre, B. (1997) Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 53: 1649-1657.
- Almeida-Doria, R.F., Regitano-D'Arce, A.B. (2000) Antioxidant Activity of Rosemary and Oregano Ethanol extracts in Soybean Oil under thermal oxidation. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 20:197-203.
- Al-Saikhan, M.S., Howard, L.R., Miller, J.C., Jr. (1995) Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.) *J. Food Sci.* 60: 341-343.
- An, J., Tzagarakis-Foster, C., Shcarschmidt, T.C., Lomri, N., Leitman, D.C. (2001) Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *Biol. Chem.* 276: 17808-17814.
- Andican, G., Gelisgen, R. Unal, E., Tostum, O.B., Dervisoglu, S., Karahasanoglu, T., Burcak, G. (2005). *World J. Gastroenterol.* 11:2340.
- Ashida, H., Fukuda, I, Yamashita, T., Kanazawa, K. (2000) Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett.* 476: 213-217.
- Bondy, S.C. (1995). The relation of oxidative stress and hyperexcitation to neurological disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208:337-345.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355.
- Cáceres A (1998). Plantas de uso medicinal en Guatemala. Colección Monografías, Vol. 1 Editorial Universitaria, Guatemala.
- Caltagirone, S., rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F.O., Natali, P.G., Brunetti, M., Aiello, F.B., Piantelli, M. (2000) Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potencial, *Int J. Cancer*, 87: 595-600.
- Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda, H., Sawamura, M. (2000) Radical-scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.* 48:4156-4161.
- Crozier, A., Jensen, E., Lean, M.E.J., McDonald, M.S. (1997) Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 761: 315-321.
- De la Fuente, M., Hanz, A., Vallejo, M.C., (2005). *Antiox. Redox Signaling.* 7:1356.
- Djordjevic, V.B. (2004). Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 237:57.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comproti, M. (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetine and its relation to iron chelating activity, *FEBS Lett*, 416:123-129.
- Ferte, J., Kuhnel, J.M., Chapuis, G., Rolland, Y., Lwein, G., Schwaller, M.A. (1999) Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: synthesis, phamacological activity, and structure-activity relationships, *J. Med. Chem.* 42: 478-489.

- Fischer, U., Franz, Ch., López, R., Pöll, E. (1997) Variability of the Essential Oils of *Lippia graveolens* HBK from Guatemala. Proceedings of 27th International Symposium on Essential Oils. Edits., Ch. Franz, A. Mathé and G. Buchbauer, pp. 266-269, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL.
- Fischer, U., López, R., Pöll, E., Vetter, S., Novak, J., Franz, Ch. (2004). Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala. *Flav. Frag. J.*, 19, 333-335.
- Governo mexicano.
http://www.mexicoforestal.gob.mx/imprimir.php?seccion=nuestros_arboles&id=29
 Sítio acessado no dia 13/06/2008.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th ed., Claredon Press: Oxford.
- Hermann, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. (1976) *J. Food Technol.* 11: 433-448.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J.G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Lira, R. (2003) Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J. Ethnopharmacol.* 88: 181-188.
- Hernández-Arteseros, J.A., Vila, R., Cañigueral, S., Cruz, S., Cáceres, A. (2006) Composition of the Essential Oils of *Lippia chiapasensis* Loes. *J. Essential Oil Res.* 18: 6-9.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Venema, D.P. (1992) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1591-1598.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K. (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, 47:357-362.
- Hostettmann, K., Queiroz, E., Vieira, P. (2003). *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos, Brasil, Edufscar. 152 p.
- Kanazawa, K., Yamashita, T., Ashida, H., Danno, G. (1998) Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 I A family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 970-977.
- Kaneda, N., Lee, I.S., Gupta, M.P., Soejarto, D.D., Kinghorn, D. (1992) (+)-4b-Hydroxy-hernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. *J. Nat. Prod.* 55: 1136-1141.
- Kubeczka, K.H., Formáček, V. (2002) *Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy*, 2nd. ed.; Wiley: New York.
- Khan, M.A., Baseer, A. (2000) Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease, *J. Pak. Med. Assoc.* 50:261-264.
- Lankin V.Z., Lisina, M.O.; Arzamastseva, N.E. Konovalova, G.G., Nedosugova, V.V., Kaminnyi, A.K., Tikhase, A.K., Alev, F.T., Kukharchuk, V.V., Belenkiv, Y.N., (2005). *Bull. Exp. Biol.Med.* 41:140.

- Leeuwenburgh, C., Hardy, M.M., Hazen, S.L., Wagner, P., Oh-ishi, S., Steibrecher, U.P., Heinecke, J.W. (1997) Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima, *J. Biol. Chem.* 272:1433-1436.
- Liang, Y.C., Tsai, S.H., Tsai, D.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. (2001) Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett.* 496: 12-18
- Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R.J., Harnly, J.M. (2007) Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Comp. Anal.* 20: 361-369.
- Loziene, K., Vaiciuniene, J., Venskutonis, P.R. (2003) Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.* 31:249-259.
- Makita, H., Tanaka, T., Fujitsuka, H., Tatematsu, N., Satoh, K., Hara, A., Mori, H. (1996) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin, *Cancer Res.*, 56: 4904-4909.
- Mallet, J.F., Cerrati, C., Ucciani, E., Gamisana, J., Gruber, M. (1994) Antioxidant activity of plant leaves in relation to their α -tocopherol content. *Food Chem.* 49: 61-65.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N., Kostova, I.N. (1994) Antioxidative action of the ethanolic extract and some hydroxycoumarins of *Fraxinus ornus* bark. *Food Chem.* 51: 125-132.
- Markham, K.R. (1989) Flavones, flavonols and their glycosides. *Methods Plant Biochem.* 1: 197-235.
- Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000) Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J. Chromatogr. A.* 897: 177-184.
- Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E.N. (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.* 61: 71-75.
- Ness, A.R., Powles, J.W. (1997) Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review, *Int. J. Epidemiol.* 26: 335-341.
- Oldreive, C., Zhao, K., Paganga, G., Halliwell, B., Rice-Evans, C. (1998) Inhibition of nitrous acid-dependent tyrosine nitration and DNA base deamination by flavonoids and other phenolic compounds. *Chem. Res. Toxicol.*, 11: 1574-1579.
- Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Santos, S.S., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, C.S., Alviano, D.S., Leitão, S.G. (2006) Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 108: 103-108.
- Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, C.S., Alviano, D.S., Leitão, S.G. (2007) Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.* 101: 236-240.

- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology. J. of Ethnopharm. 76:201-214.
- Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2003). Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitosus* Grown on the Islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). Phytochemical Analysis, 14, 228-231.
- Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J.J.U., Makam, S.N., Chen, R.J., Masson, P.H., Murphy, A.S. (2004) Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*, Plant Cell, 16: 1898-1911.
- Rastrelli, L., Cáceres, A., Morales, C., De Simone, F., Aquino, R. (1998) Iridoids from *Lippia graveolens*. Phytochemistry, 49 : 1829-1832.
- Richter, J. e Schellenberg, I. (2007) Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. Anal. Bional. Chem. 387: 2207-2217.
- Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Ramos-Gómez, M., Rodríguez-Muñoz, M.E., Reynosos-Camacho, Rocha-Urbe, A., Roque-Rosales, M.R. (2007) Antioxidant effect of orégano (*Lippia berliandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. Food Chem. 102: 330-335.
- Sakakibara, H., Ashida, H., Kanazawa, K. (2002) A novel method using 8-hydroperoxy-2'-deoxyguanosine formation for evaluating antioxidative potency. Free Radical Res. 36: 307-316.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. (2003) Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. J. Agric. Food Chem. 51: 571-581.
- Sánchez-Moreno, C. Larrauri, J.A. Saura-Calixto, F., (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric. 76: 270.
- Sastre, J., Pallardo, F.V., Vina, J. (2000) Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis, IUBMB Life, 49: 427-435.
- Schieber, A., Keller, P., Carle, R. (2001) Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 910: 265-273.
- Shan He, Et al (2007). Isolation and purification of antioxidative isomeric polyphenols from the roots of *Parthenocissus laetevirens* by counter-current chromatography. Ed. ELSEVIER . Journal of Chromatography. No. 04.072.
- Shirley, B.W. (1996) Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway, Trend Plant Sci. 1:377-382
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev. Nutr. 15:71
- Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M., Diamandis, E. (2006) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. Clinical Biochem (39) 492-497.

- Sousa, C.M.M., Silva, H.S., Vieira-Jr, G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova* 30:2.
- Sun, M., Sakakibara, H., Ashida, H., Danno, G., Kanazawa, K. (2000) Cytochrome P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationships. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1373-1378.
- Takabe, W., Niki, E., Uchida, K., Yamada, S., Satoh, K., Noguchi, N. (2001) Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein, *Carcinogenesis*, 22: 935-941.
- Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Ushida, J., Honjo, S., Hara, A., Tsuda, H., Mori, H. (1999) Modifying effects of a flavonoid morin on azoxymethane-induced large bowel tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, 20:1477-1484.
- Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. (1997), Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and herperidin, *Carcinogenesis*, 18:957-965.
- Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., Mori, H. (1993) Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeine, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis* 14: 1321-1325.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998) Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113-4117.
- Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., Birt, D.F. (1990) Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res.* 50: 499-502.
- Williamson, G., Plumb, G.W., Uda, Y., Price, K.R., Rhodes, M.J.C. (1996) Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalcl7 cells. *Carcinogenesis* 17: 2385-2387.
- Wollenweber, E., Dietz, V.H. (1981) Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20: 869-932.

ANEXOS

Figura 1. Cromatogramas de *Lippia graveolens* colectada en El Subinal (L) y El Oreganal, correspondientes al quimiotipo “mixto”.

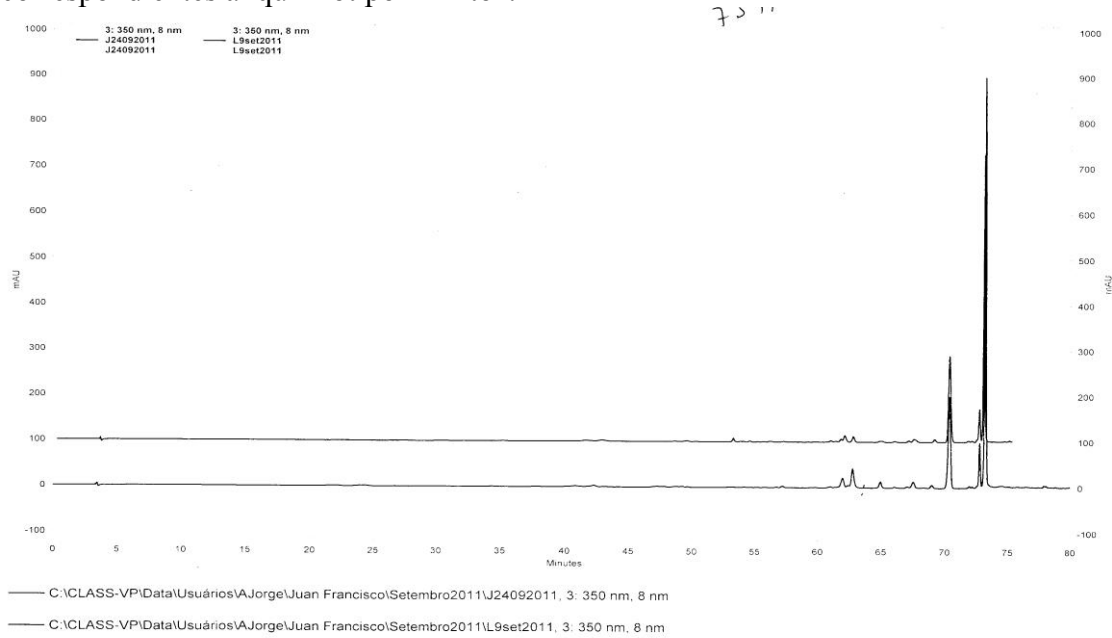


Figura 2. Cromatograma expandido de *Lippia graveolens* colectada en El Subinal (L) y El Oreganal, correspondientes al quimiotipo “mixto”.

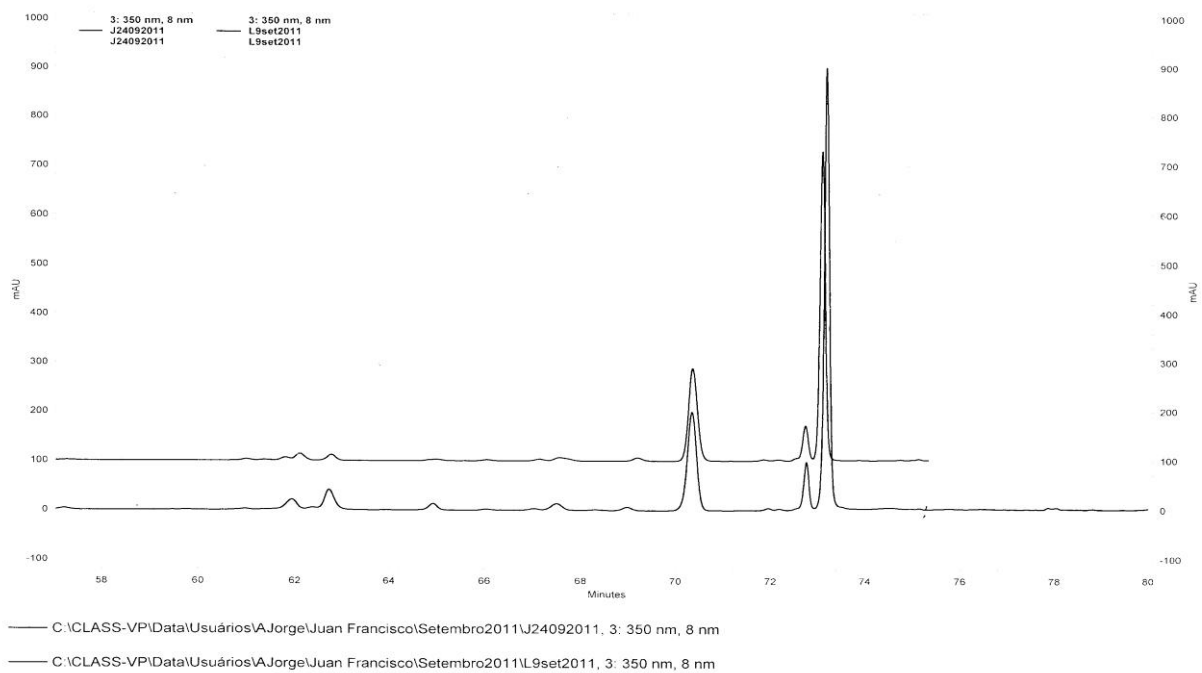


Figura 3. Cromatogramas de *Lippia graveolens* colectada en El Oreganal (K), San José (G), Casas de Pinto (I), correspondientes al quimiotipo “timol”.

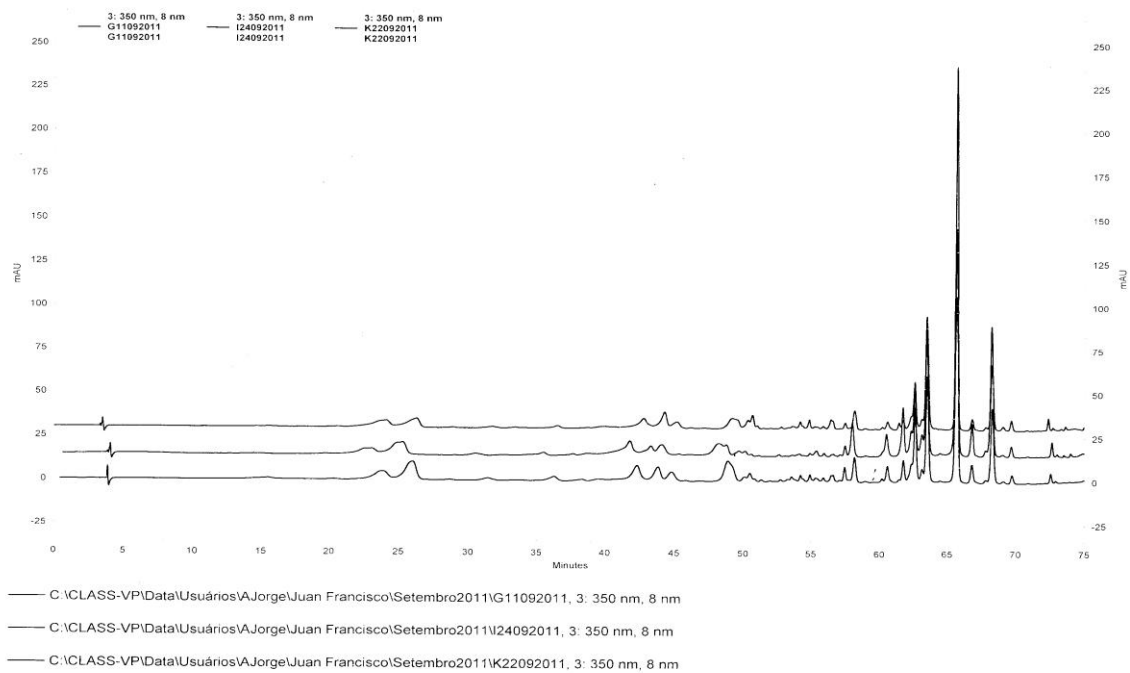


Figura 4. Cromatograma expandidos de *Lippia graveolens* colectada en El Oreganal (K), San José (G), Casas de Pinto (I), correspondientes al quimiotipo “timol”.

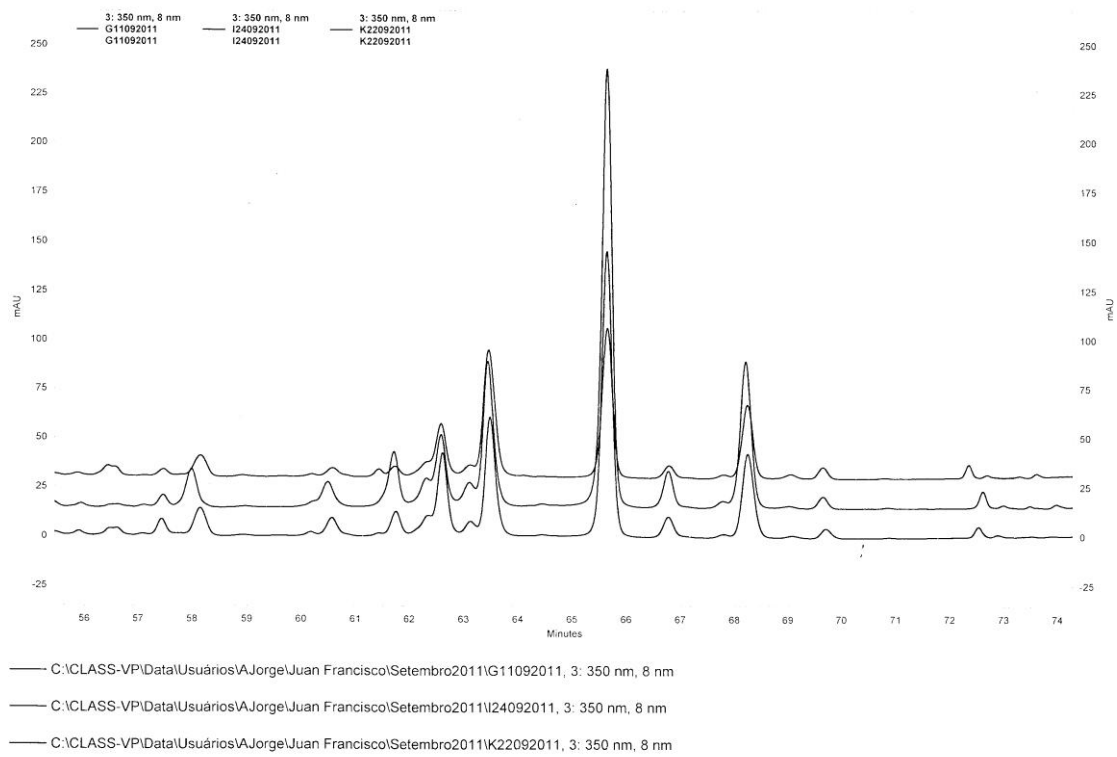


Figura 5. Cromatogramas de *Lippia graveolens* colectada en El Carrizal (A y C) y La Tuna (E), correspondientes al quimiotipo “carvacrol”.

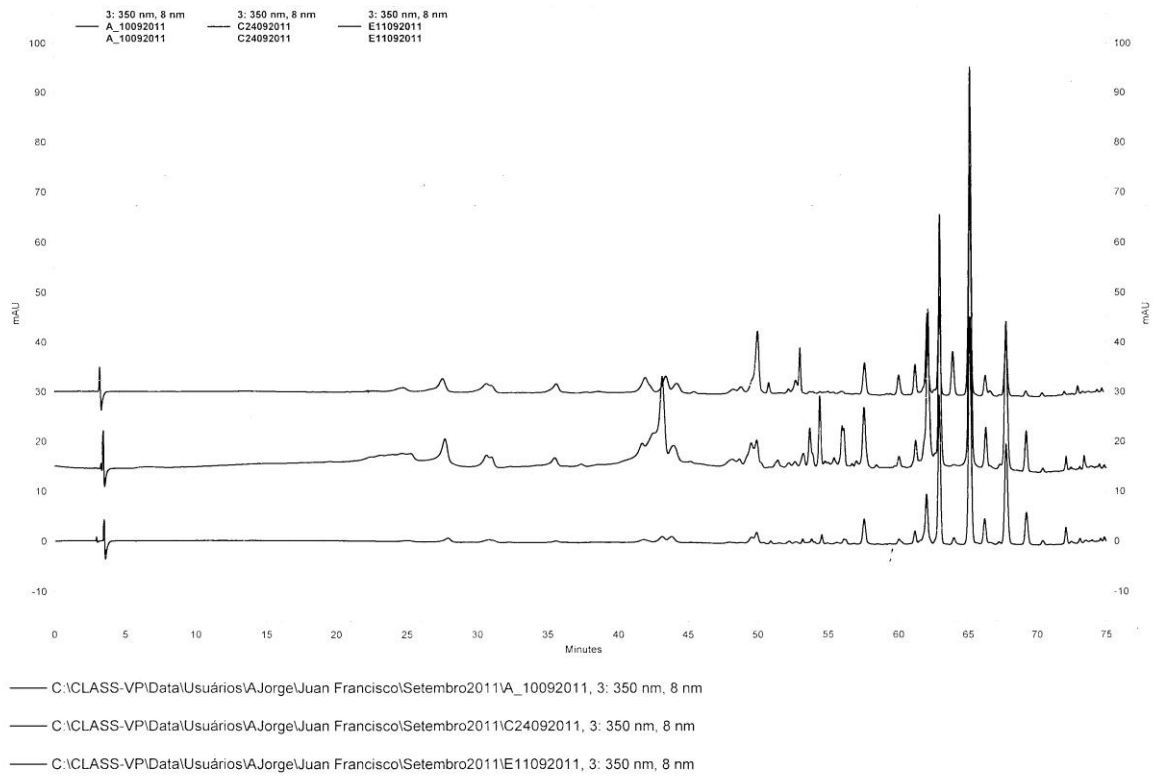


Figura 6. Cromatograma expandidos de *Lippia graveolens* colectada en El Carrizal (A y C) y La Tuna (E), correspondientes al quimiotipo “carvacrol”.

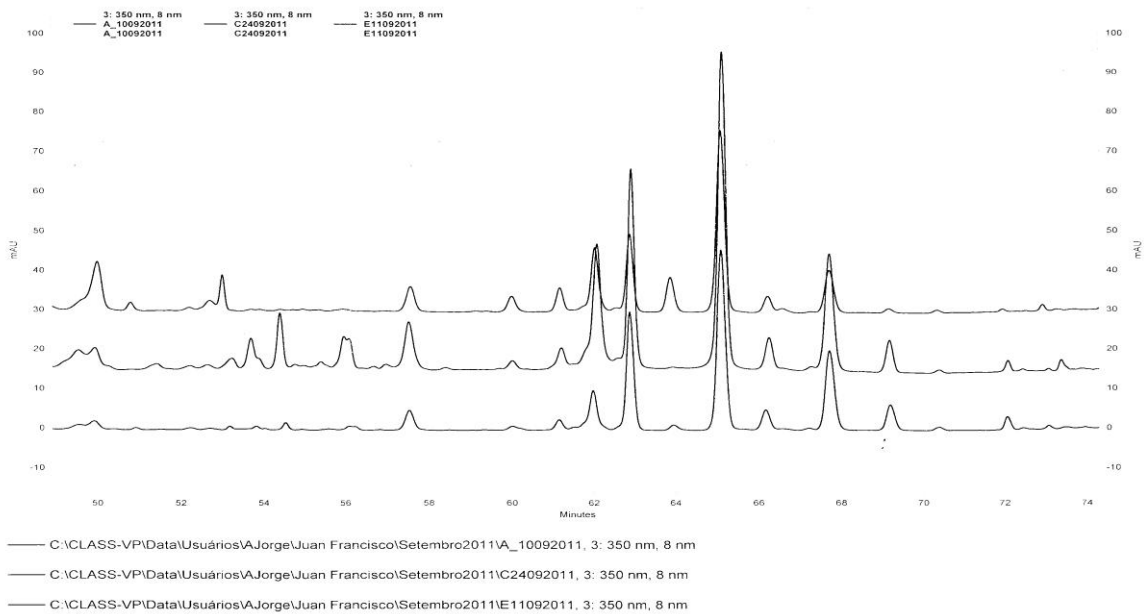


Figura 7. Cromatogramas de *Lippia chiapasensis* colectada en San Cristóbal (B, O y P) y Chiyax (M).

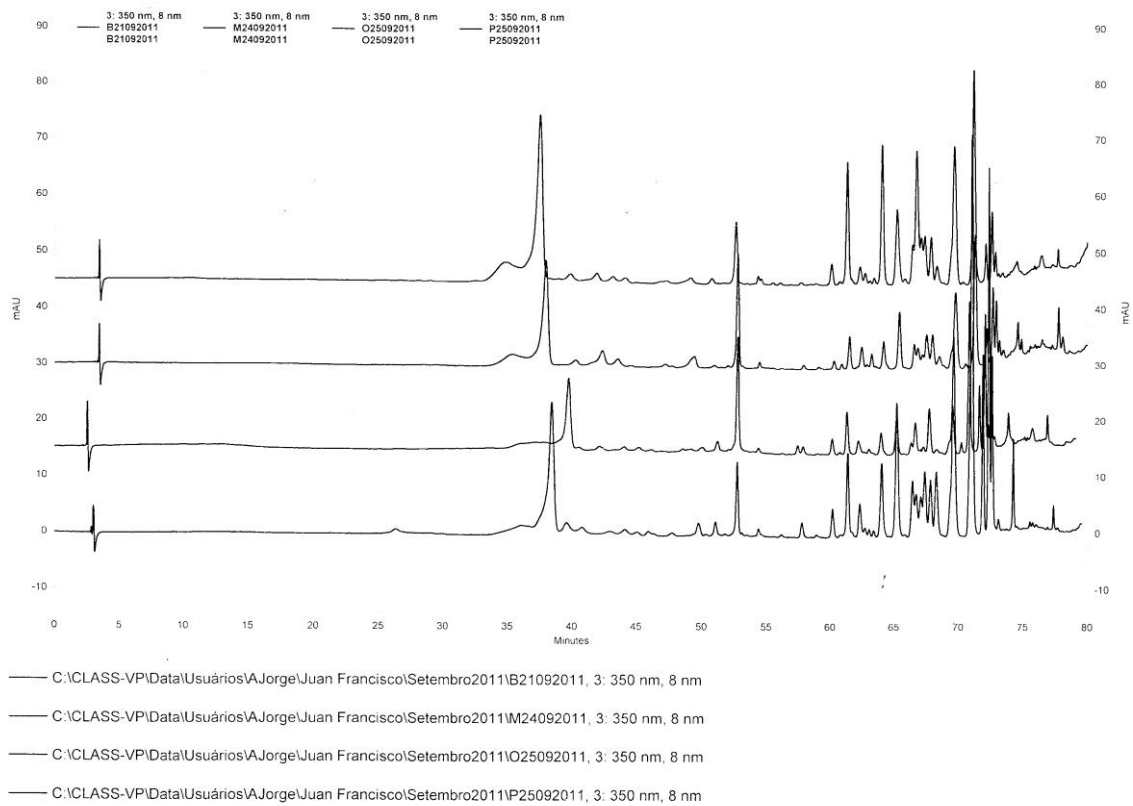


Figura 8. Cromatogramas expandidos de *Lippia chiapasensis* colectada en San Cristóbal (B, O y P) y Chiyax (M).

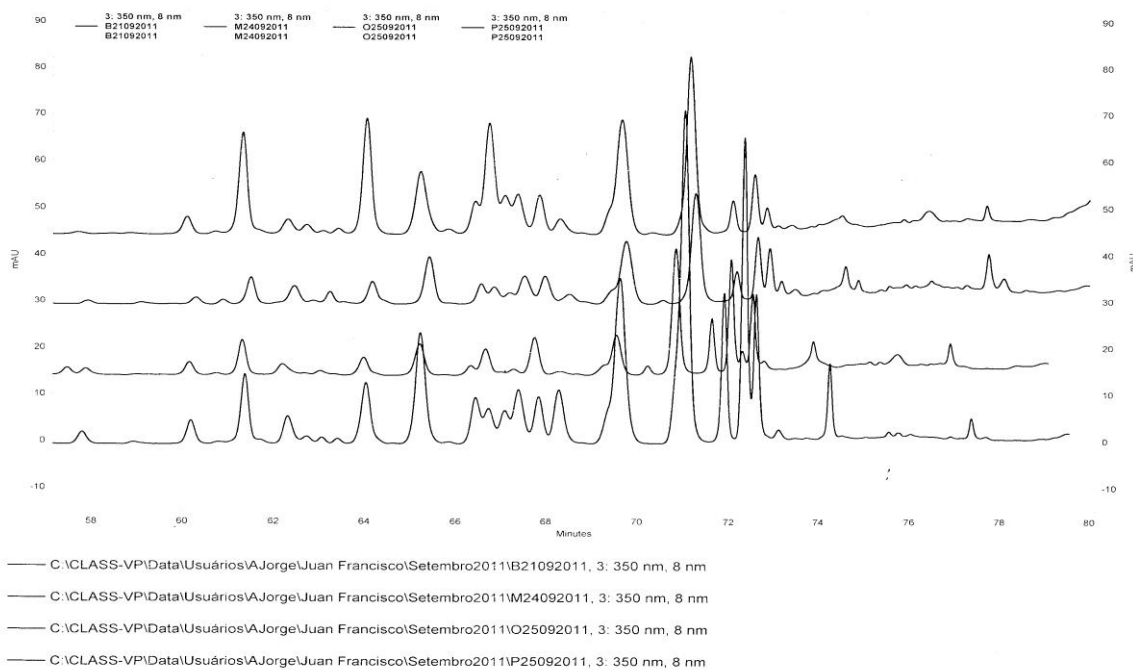


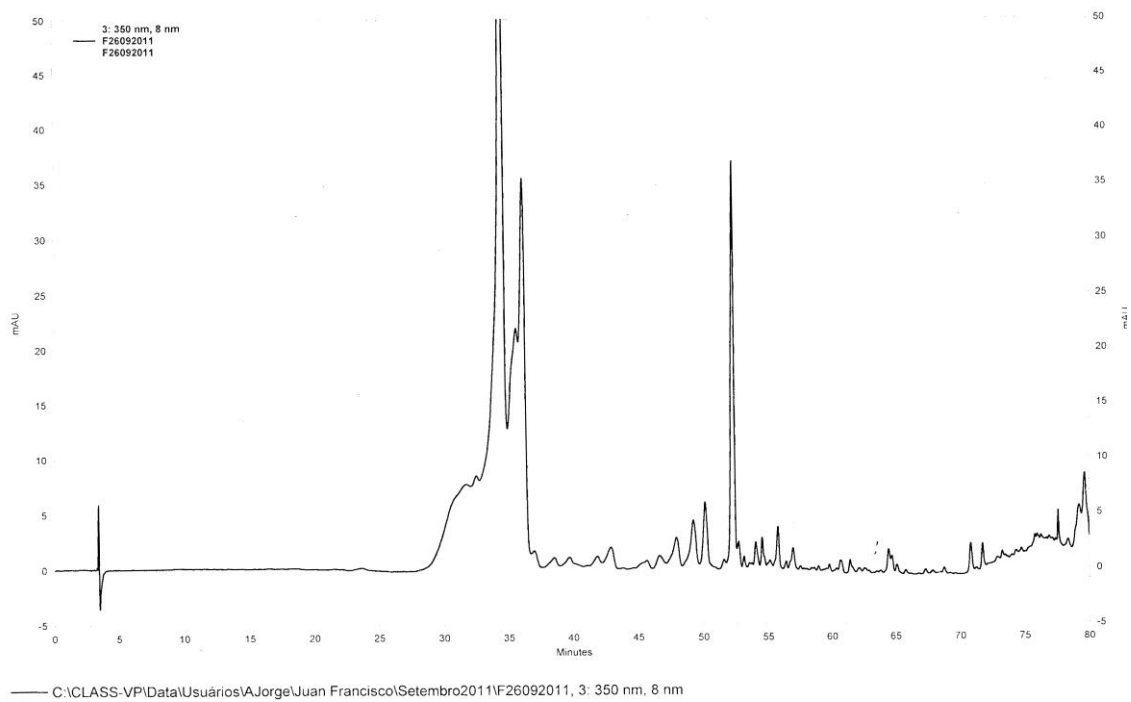
Figura 9. Cromatograma de *Lippia substrigosa* colectada en Mixco, Guatemala.

Figura 10. Cromatograma de *Lippia cardiostegia* colectada en El Carrizal (Q) en agosto de 2011.

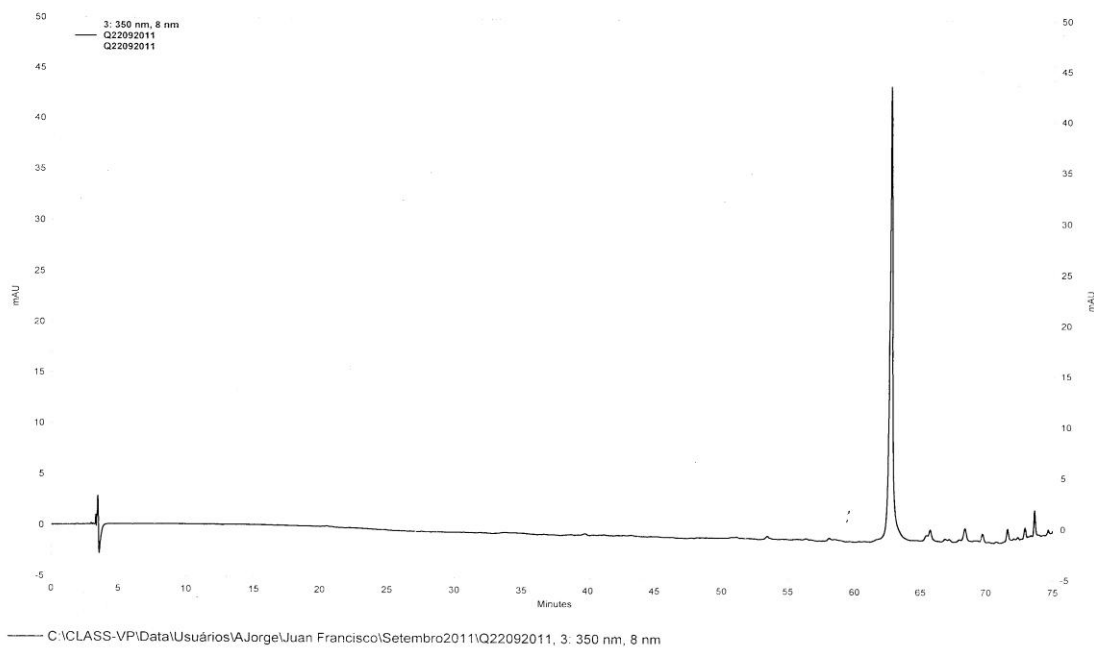
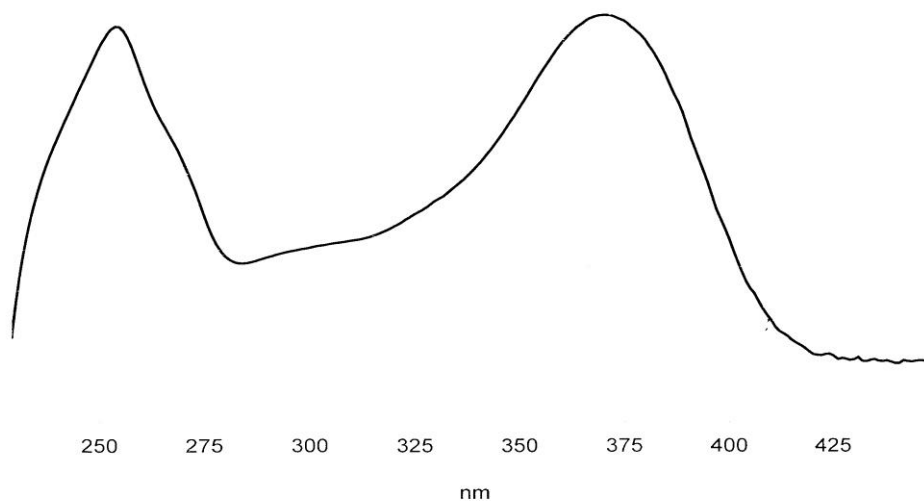


Figura 11. Espectro UV de flavonoide detectado en minuto 62.7 en cromatograma obtenido por HPLC de *L. cardiostegia*.

Spectrum at time 62.68 min.

— 62.68 min
 Lambda max : 370 254 487 424 583
 Lambda min : 284 422 645 632 643



- 1. Current data file, 62.68 min

Figura 12. Cromatograma de *Lippia controversa* colectada en Santa Rosa (H) en abril de 2011.

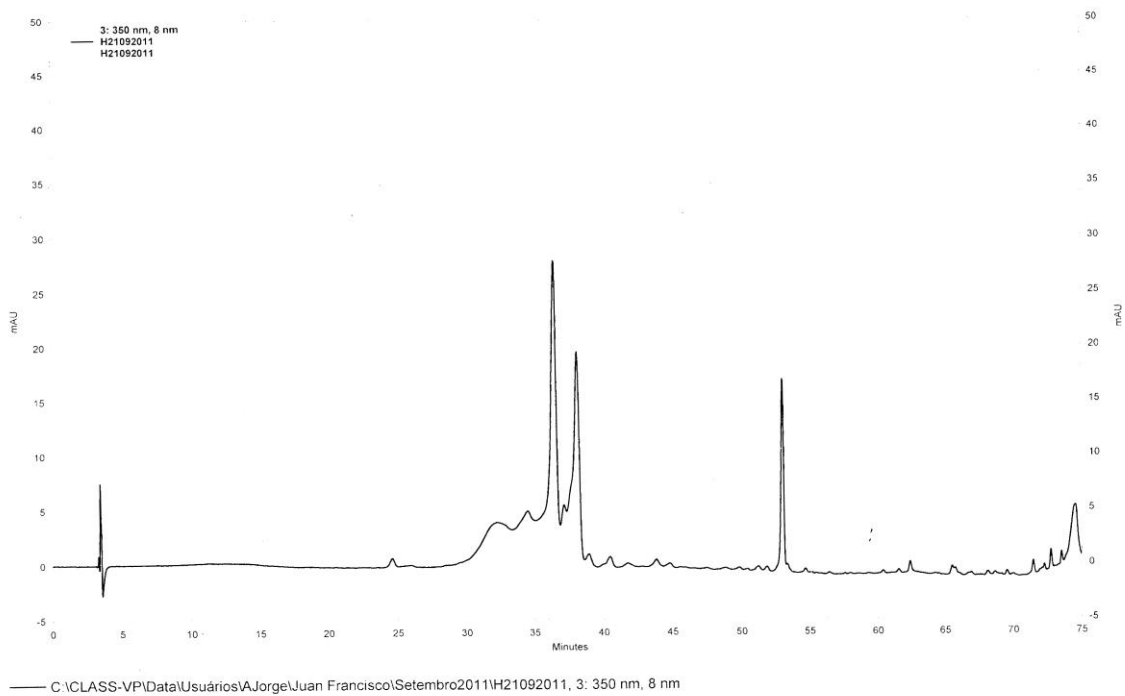


Figura 13. Cromatograma de estándar naringenina.

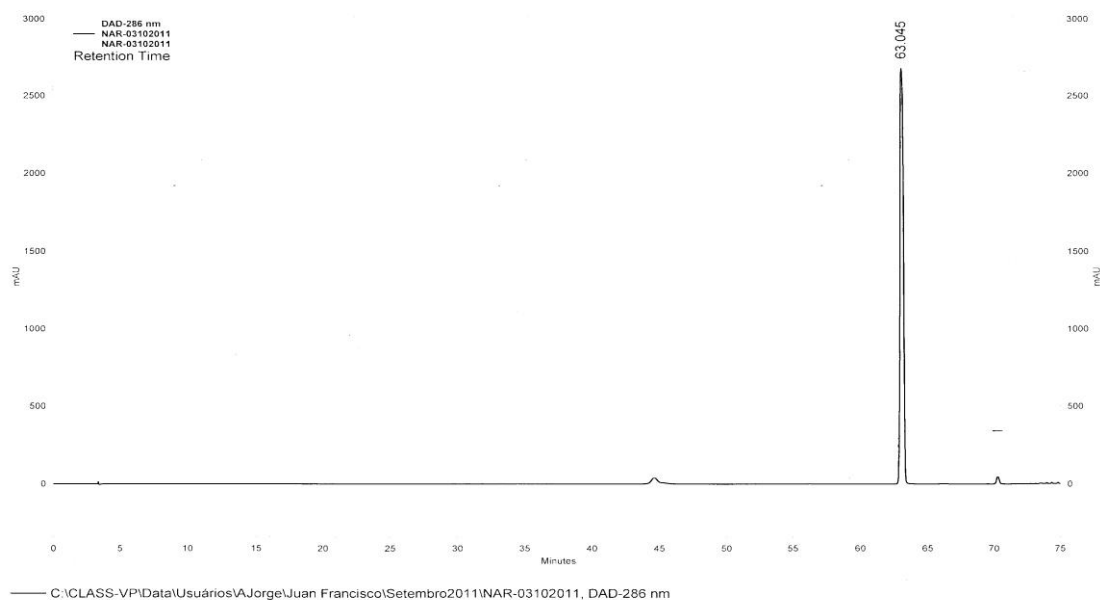
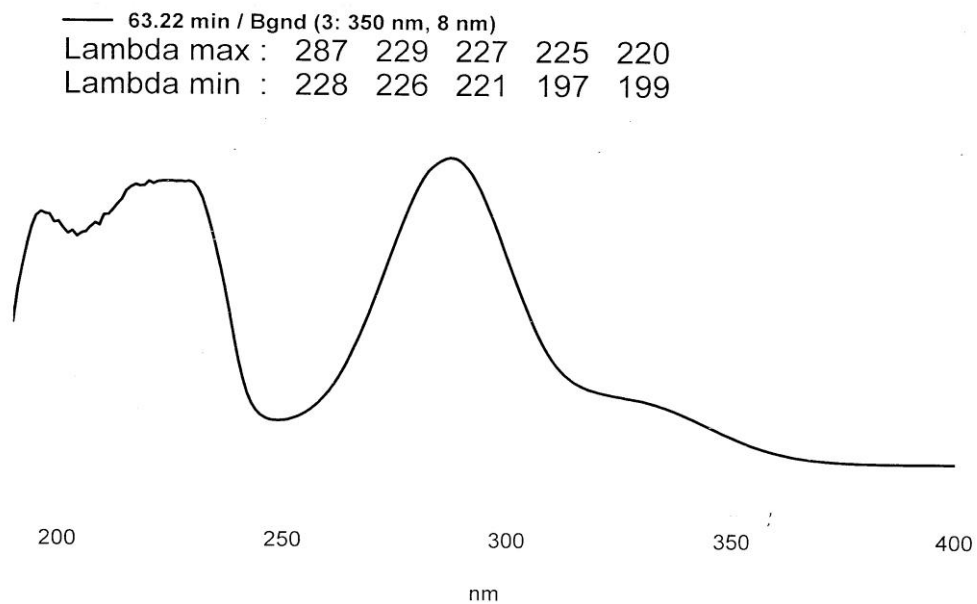


Figura 14. Espectro UV del estándar de naringenina obtenido a partir del cromatograma de HPLC-DAD.

Spectrum at time 63.22 min.



I. Current data file, 63.22 min / Bgnd (3: 350 nm, 8 nm)

Figura 15. Cromatograma de estándar taxifolina.

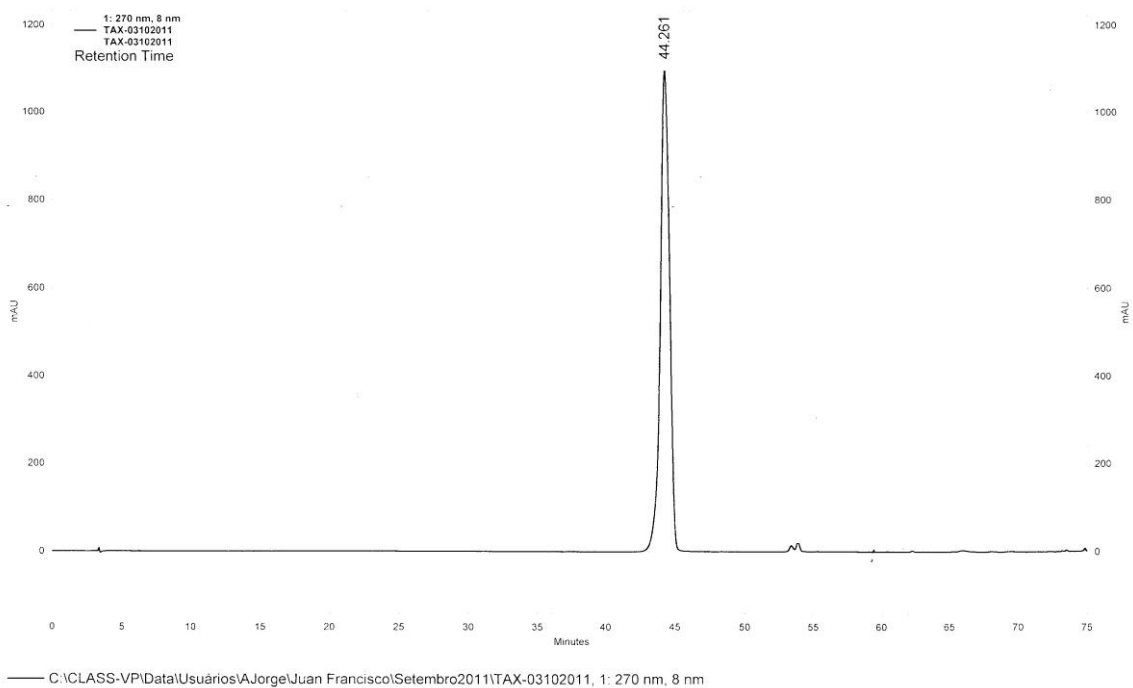
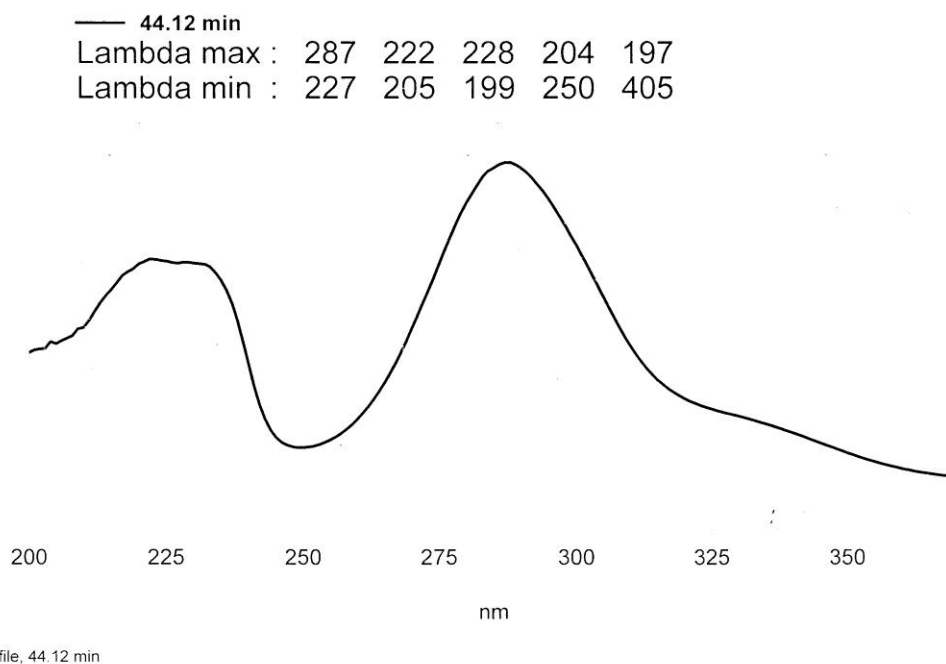


Figura 16. Espectro UV del estándar de taxifolina obtenido a partir del cromatograma de HPLC-DAD.

Spectrum at time 44.12 min.



Br. Manuel Muñoz Wug
Auxiliar de Investigación I

Br. Max Samuel Mérida Reyes
Auxiliar de Investigación II

Vo. Bo. Juan Francisco Pérez Sabino
Coordinador de Proyecto

Vo. Bo. Roberto Flores Arzú
Director del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas
-IIQB-