

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**AISLAMIENTO DEL O LOS COMPUESTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Centaurea americana*.**

**POR:
QFB. MITZI JAZMIN OCAÑA ZAVALA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA**

AGOSTO, 2019

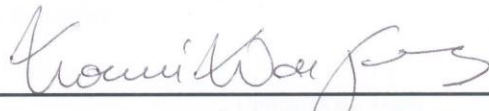
**AISLAMIENTO DEL O LOS COMPUESTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Centaurea americana*.**

Aprobación de la tesis:



DR. JONATHAN PÉREZ MESEGUER

Director de Tesis



DRA. NOEMÍ H. WAKSMAN MINSKY

Codirector de Tesis



DRA. LILIANA TORRES GONZÁLEZ

Comisión de Tesis



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO DEL O LOS COMPUESTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD
HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Centaurea americana*.**

Presentado por:

Q.F.B. Mitzi Jazmin Ocaña Zavala

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Jonathan Pérez Meseguer y la codirección de la Dra. Noemí H. Waksman Minsky y como miembro de la comisión la Dra. Liliana Torres González.

Directora de Tesis


DR. JONATHAN PÉREZ MESEGUER

Codirector de Tesis


DRA. NOEMÍ H. WAKSMAN MINSKY

Comisión de Tesis


DRA. LILIANA TORRES GONZÁLEZ

“En el principio creó Dios los cielos y la tierra. Y la tierra estaba desordenada y vacía, y las tinieblas estaban sobre la faz del abismo, y el Espíritu de Dios se movía sobre la faz de las aguas.

Y dijo Dios: Sea la luz; y fue la luz” (Génesis 1:1-3 Versión Reina Valera, 1960).

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a mi hermosa madre Dalila Zavala Arias y a mi amado hermano Luis Rene Jhonattan Ocaña Zavala que siempre me apoyaron y comprendieron. También a mi padre Julio Cesar Ocaña Vázquez que me apoyo durante el transcurso de esta tesis.

También dedico esta tesis a mi enorme familia que siempre estuvo presente.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a Dios por permitirme realizar un posgrado en ciencias, por cuidarme y acompañarme siempre y por que todo lo que dispone se cumple.

Muchas gracias al **Dr. Jonathan Pérez Meseguer** por adoptarme en esta travesía, gracias porque adquirí mucha información a través de usted y pude llegar a culminar este trabajo.

A la **Dra. Noemí H. Waksman Minsky** gracias por la oportunidad que me dio de realizar esta tesis y porque durante las clases impartidas en el transcurso del posgrado pude aprender muchas cosas de su parte.

A la **Dra. Liliana Torres González** gracias por la paciencia que me brindó, por todo lo que me enseñó, por que aprendí demasiado y me ayudo a comprender y realizar de mejor manera el trabajo, gracias por tiempo que me dio.

Gracias a cada uno de mis maestros dentro del posgrado, que me ayudaron a desarrollarme y cumplir mis objetivos. Especialmente al **Dr. David Arturo Silva Mares** quien me facilitó recursos para mis ensayos. También al **Dr. Luis Alejandro Pérez López** por su coordinación y compromiso con los alumnos de posgrado.

A la **T.L.C. Ivonne Carrera Rodríguez** estoy grandemente agradecida por que me enseñó y me dio consejos del trabajo en el laboratorio, por que es un gran ser humano, por que estuvo presente durante mi trabajo y me facilitó muchos recursos, gracias Ivonne por toda la paciencia. Recuerda tomar agua.

Gracias a mis compañeros del posgrado por que fueron un apoyo emocional y académico durante transcurso de la maestría.

Gracias a mi cuadro chico de generación (**Jorge, Yazmín y Aída**), por hacer amena esta travesía y por caminar conmigo en este desarrollo académico.

Especialmente a **Jorge**, por que durante el tiempo que estuviste fuiste una persona muy prudente y sencilla con la que me encantó convivir y también aprendí de ti.

Gracias a mis compañeros del cubículo (**Roberto, Dinora, Victor y Sara**) porque me prepararon psicológicamente para lo que venía y posteriormente me dieron consejos para poder afrontar las dificultades que se presentaban. Infinitas gracias a **Omar Portillo** quien siempre nos saca de dudas y por que ser un excelente maestro, por que siempre estuvo presente cuando lo necesitamos y nos ayudó. Muchas gracias Homie por tus consejos.

A mi amigo **Juan Tamez** muchas gracias por ser una gran persona conmigo por ser un excelente maestro en diferentes temas, por tus consejos, por todas las emociones compartidas, por que estuviste ahí en las tristezas y alegrías. Por todo, ¡Muchas gracias!

A mi amiga **Perlis Silva** muchas gracias por que al final del camino fuiste una gran pieza. Gracias por compartir conmigo y tenerme la confianza, gracias por las risas y las canciones. ¡Muchas gracias!

Gracias a mi familia que siempre me apoyó.

RESUMEN

Q.F.B. Mitzi Jazmin Ocaña Zavala Fecha de graduación: Agosto, 2019.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título de estudio **AISLAMIENTO DEL O LOS COMPUESTOS CON
POTENCIAL ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA A
PARTIR DE *Centaurea americana*.**

Número de páginas: Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con orientación en química
biomédica.

Área de estudio: Química Analítica

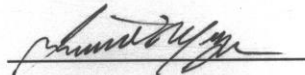
Propósito y Método del Estudio:

Debido a que las enfermedades hepáticas (a excepción de las víricas) se encuentran entre las principales diez causas de muerte en México y en el mundo, y ya que no hay un tratamiento definitivo que las cure en su totalidad, es de vital importancia la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento como las que provee la medicina herbolaria. Se ha reportado que diferentes plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae* presentan actividad hepatoprotectora, y que esta se relaciona con la actividad antioxidante, una de ellas es la *Centaurea americana*; se ha reportado que su extracto metanólico presentó una actividad antioxidante y hepatoprotectora muy importante. Por esta razón, este proyecto tiene como objetivo aislar el o los compuestos con potencial actividad hepatoprotectora a partir del extracto metanólico de la flor de *Centaurea americana*.

Contribuciones y Conclusiones:

Se aislaron tres flavonoides y un glucósido lignano a partir de *Centaurea americana*, mediante fraccionamiento biodirigido guiado por la técnica de revelado con DPPH; de los cuatro compuestos solo el glucósido lignano ha sido previamente reportado en la planta. Los tres flavonoides presentaron buena actividad antioxidante, a diferencia del glucósido lignano. Finalmente, los cuatro compuestos presentaron actividad hepatoprotectora; sin embargo dos de los flavonoides resultaron ser tóxicos.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. Jonathan Pérez Meseguer

INDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Enfermedades hepáticas	2
1.1.1	Perspectiva mundial de las enfermedades hepáticas.	2
1.1.2	Perspectiva de las enfermedades hepáticas en México.	3
1.2	Patogénesis de las enfermedades hepáticas	3
1.3	Tratamiento actual de las hepatopatías	4
1.4	Medicina herbolaria	5
1.1.3	Plantas medicinales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas	6
1.1.4	Plantas medicinales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas en México	8
1.5	Modelos y agentes inductores del daño hepático para la evaluación hepatoprotectora de productos naturales	8
1.6	Relación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora.	10
1.7	Centaurea americana	11
1.8	Antecedentes	11
1.9	Justificación	14

1.10	Objetivo General.	15
1.10.1	Objetivos específicos	15
2	MATERIAL Y MÉTODOS	16
2.1	Material	16
2.2	Reactivos	17
2.3	Equipo	18
2.4	Material biológico	20
2.5	Material vegetal	20
3	METODOLOGÍA	21
3.1	Obtención del extracto crudo.	21
3.2	Obtención de los extractos diferenciales.	21
3.3	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo y los diferenciales de <i>Centaurea americana</i> .	21
3.4	Cultivo celular.	23
3.5	Determinación de la citotoxicidad en células HepG2.	25
3.6	Ensayo de hepatoprotección en células HepG2.	26
3.7	Aislamiento de compuestos mayoritarios con actividad antioxidante a partir del extracto de acetato de etilo.	27
3.5.1	Aislamiento de la fracción 1.	28
3.5.2	Aislamiento de la fracción 3.	28

3.5.3 Aislamiento de las fracciones 5, 6 y 7.	28
3.5.3.1 Aislamiento de la fracción 6.	29
3.8 Análisis por HPLC-DAD de los compuestos aislados	29
3.9 Análisis estructural de los compuestos aislados.	30
3.10 Evaluación de biológica de los compuestos aislados.	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Obtención del extracto crudo y diferenciales a partir de <i>Centaurea americana</i> .	31
4.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudo y diferenciales de <i>Centaurea americana</i> .	31
4.3 Determinación del número óptimo de células HepG2 (por pozo) para el ensayo de citotoxicidad.	32
4.4 Evaluación de la citotoxicidad del DMSO en células HepG2.	33
4.5 Actividad hepatoprotectora del extracto crudo y los diferenciales de <i>Centaurea americana</i> en células HepG2 con daño inducido con CCl ₄ 40mM.	34
4.6 Aislamiento de compuestos con actividad antioxidante a partir del extracto de acetato de etilo.	36
4.6.1 Aislamiento de la fracción 1.	37
4.6.2 Aislamiento de la fracción 3	38
4.6.3 Aislamiento de las fracciones no. 5, 6 y 7.	39

4.6.3.1 Aislamiento de la fracción 6.	40
4.7 Análisis por HPLC de los compuestos aislados	42
4.8 Análisis estructural de los compuestos aislados.	47
4.9 Citotoxicidad y actividad antioxidante y hepatoprotectora de los compuestos aislados.	61
4 DISCUSIÓN	64
5 CONCLUSIONES	88
6 PERSPECTIVAS	89
7 REFERENCIAS	90

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Factores que provocan generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés; lado izquierdo) y progresión de una enfermedad hepática (lado derecho).	2
2	Representación de la inducción del estrés oxidativo por factores exógenos y endógenos. O_2^* superóxido, HO^* radical hidroperoxilo, HO_2^* radical hidroxilo.	4
3	Fotografía de la planta <i>Silybum marianum</i> y las estructuras principales del extracto de silimarina: a) Silicristina, b) Silibinina A, c) Silibinina B, d) Silibinina y e) Silidianina.	8
4	Fotografía de la planta <i>Centaurea americana</i> .	12
5	Esquema de reducción del radical DPPH.	22
6	Gráfica determinación del número óptimo de células HepG2 para el ensayo de citotoxicidad.	33
7	Gráfico de viabilidad celular debida al DMSO en diferentes concentraciones. Control negativo (C-): Medio D-MEM Suplementado, control positivo (C+): Doxorrubicina 8.8×10^{-3} % p/v. *P<0.005 en comparación de C-.	34

8	Cromatografía en capa fina de las siete fracciones obtenidas a partir de E. acetato de etilo, A) UV 254 nm, B) Revelada con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).	36
9	Cromatografía en capa fina de las dos subfracciones obtenidas de la fracción uno de acetato de etilo. A) UV 254 nm, B) revelada con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).	37
10	Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la columna de Sephadex de la subfracción 1.2. A) UV 254 nm, B) revelada con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).	38
11	Tubo de ensayo y cromatografía en capa fina de C2. A) Compuesto precipitado, B) UV: 254 nm, C) revelado con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).	39
12	Cromatografía en capa fina de las fracciones no. 5, 6 y 7 eluidas con las siguientes fases móviles: A) hexano: acetato de etilo (2:8), B) acetato de etilo, C) hexano: acetona (1:1), D) acetato de etilo: acetona (8:2). UV 254 nm, en contraste blanco y negro.	40
13	Cromatografía en capa fina del resultado de la columna de sílica gel realizada para la fracción no. 6. UV A) 254 nm B) 365 nm, FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2). C) UV	41

254 nm y D) revelado con DPPH 2 mg/mL. FM:
tolueno: acetona (1:1).

14	Cromatograma del extracto de AcOEt.	42
15	Cromatograma y espectros de absorción de la fracción 1 de acetato de etilo.	43
16	Cromatograma de la fracción 3 de acetato de etilo-	43
17	Cromatograma de la fracción 6 de acetato de etilo.	44
18	Cromatograma de A) C1, B) Producto de la hidrólisis de C1 con HCl 12 N a 100°C, así como sus espectros de absorción.	45
19	Cromatograma de C2 y espectro de absorción.	46
20	Cromatograma de C3 y espectro de absorción.	46
21	¹ HRMN del compuesto C1 en MeOD.	47
22	¹³ CRMN del compuesto C1 en MeOD.	48
23	DEPT 135 vs ¹³ CRMN del compuesto C1 en MeOD.	48
24	COSY del compuesto C1 en MeOD.	49
25	HMBC del compuesto C1 en MeOD.	49
26	HSBC del compuesto C1 en MeOD.	50
27	¹ HRMN del compuesto C2 en MeOD.	52

28	¹³ CRMN vs DEPTS 90 y 135 del compuesto C2 en MeOD.	53
29	COSY del compuesto C2 en MeOD	53
30	HMBC del compuesto C2 en MeOD.	54
31	HSQC del compuesto C2 en MeOD.	54
32	NOESY del compuesto C2 en MeOD.	55
33	¹ HRMN del compuesto C3 y C4 en MeOD.	57
34	¹³ CRMN del compuesto C3 en MeOD.	57
35	DEPT 135 vs ¹³ CRMN del compuesto C3 en MeOD.	58
36	COSY del compuesto C3 en MeOD.	58
37	HMBC del compuesto C3 en MeOD.	59
38	HSQC del compuesto C3 en MeOD.	59
39	Gráfica de la actividad hepatoprotectora de los compuestos aislados y la Silibinina en células HepG2 con daño inducido con CCl ₄ . Control positivo (C+): Medio D-MEM Sup. + CCl ₄ , Control negativo (-): Medio D-MEM sup. *P<0.001 en comparación con el C+. ANOVA de un factor.	63
40	Molécula de Arctiina.	71

41	Quercetina 3-O-ramnósido o Quercitrina (C2).	75
42	Quercetina 3-metileter (C3).	78
43	2', 3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona (C4).	79
44	Resumen del aislamiento biodirigido a partir de <i>Centaurea americana</i> .	86

INDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Sistema de elución para el extracto de acetato de etilo.	28
2	Sistema de elución para la fracción 1.	28
3	Sistema de elución para el análisis por HPLC.	30
4	Porcentajes de recuperación de extractos diferenciales obtenidos del extracto crudo de <i>Centaurea americana</i> .	31
5	Actividad antioxidante por medio del ensayo de reducción del DPPH 280mM de los extractos obtenidos de <i>Centaurea americana</i> .	32
6	Actividad hepatoprotectora de los extractos de <i>Centaurea americana</i> en células HepG2 con daño inducido con CCl ₄ 40mM.	35
7	Desplazamientos químicos de ¹ H y ¹³ C de C1.	51
8	Desplazamientos químicos de ¹ H y ¹³ C del compuesto C2.	56
9	Desplazamientos químicos de ¹ H y ¹³ C del compuesto C3.	60
10	Desplazamientos químicos de ¹ H y ¹³ C del compuesto C4.	61
11	Citotoxicidad y actividad antioxidante de los compuestos aislados de <i>Centaurea americana</i> .	56

12	Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C1.	73
13	Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C2.	75
14	Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C3.	78
15	Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C4.	79

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados centígrados
¹³CRMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
¹HRMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	COrrrelation SpectroscopY
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía en capa fina
%	Por ciento
ROS	<i>“Especies reactivas de oxígeno”</i> , por sus siglas inglés.
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
O_2^{\cdot}	Radical superóxido
HO^{\cdot}	Radical hidroperoxilo
HO_2^{\cdot}	Radical hidroxilo
O_2^-	Anión superóxido
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CCl₃O⁻	Triclorometil peroxil
UV-vis	Ultravioleta visible
AST	Aspartato aminotransferasa
MDA	Malondialdehído

LDH	Lactato deshidrogenasa
ALT	Alanino aminotransferasa
SOD	Superóxido dismutasa
GSH	Glutación
mM	Milimolar
UI/L	Unidades internacionales por litro
PBS	<i>“Amortiguador de fosfatos salinos”</i> , por sus siglas en inglés
min	Minuto
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
CR₅₀	Concentración reductora media
µg/ mL	Microgramo por mililitro
cm²	Centímetros cuadrados
µL	Microlitros
mm	Milímetros
mL	Mililitros
N₂	Nitrógeno
µM	Micromolar
nm	Nanómetros
CO₂	Dióxido de carbono
rpm	Revolución por minuto
mg	Miligramo
HPLC	<i>“Cromatografía de líquidos de alta resolución”</i> , por sus siglas en inglés
UA	<i>“Área bajo la curva”</i> , por sus siglas en ingles.

CAPITULO I

1 INTRODUCCIÓN

El hígado es un órgano vital en el organismo, representa aproximadamente el 2% del peso corporal total de un adulto promedio por lo que es el órgano interno más voluminoso del cuerpo humano. Cumple diversas funciones como filtración y almacenamiento de sangre, formación de bilis, depósito de vitaminas y de hierro, metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos, hormonas y xenobióticos así como la síntesis de los factores de la coagulación (Guyton & Hall, 2016). Aunque el hígado posee una buena capacidad regeneradora ésta puede ser alterada lo que conduce a insuficiencia hepática en diversas hepatopatías.

La fibrosis hepática es una consecuencia común de diversas causas de daño crónico hepático, el desarrollo de la fibrogénesis a su vez precede el progreso de cirrosis, la cual puede ser compensada o descompensada, así como también puede convertirse en hepatocarcinoma, donde la última opción de curación es el trasplante (a excepción de la cirrosis descompensada), esto bajo ciertas consideraciones. Sin embargo, si este proceso cirrótico no es detenido puede llegar a causar la muerte (Figura 1). (Kumar, Abbas, & Aster, 2013; Marcellin & Kutala, 2018).

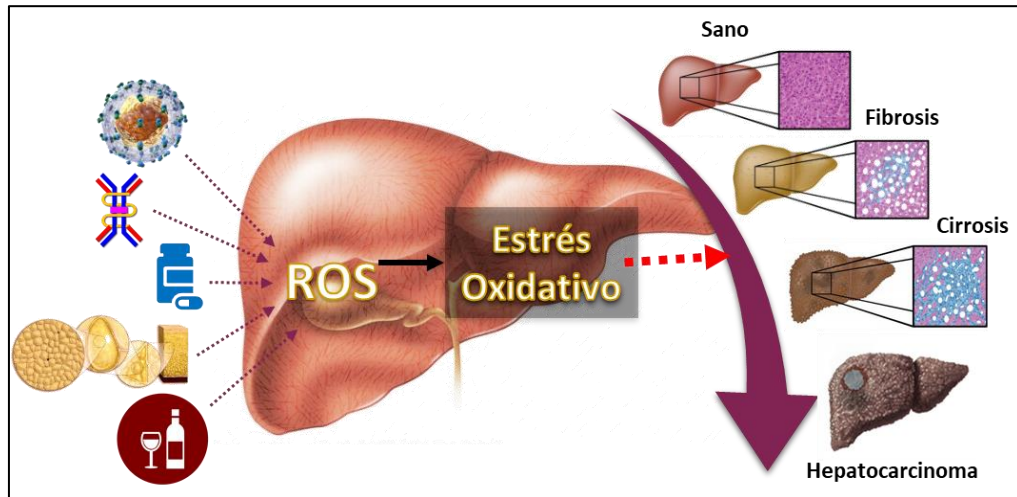


Figura 1. Factores que provocan generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés; lado izquierdo) y progresión de una enfermedad hepática (lado derecho).

1.1 Enfermedades hepáticas

1.1.1 Perspectiva mundial de las enfermedades hepáticas.

Existe una alta prevalencia a nivel mundial con respecto a las enfermedades crónicas del hígado, entre ellas se encuentran las inducidas por alcohol y las metabólicas emergentes como la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) que tienen una prevalencia del 8.5%, 3- 5% y 25% respectivamente (Marcellin & Kutala, 2018); Por esta razón las enfermedades hepáticas son un problema relevante a nivel internacional. En 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS), ubicó a la cirrosis y al hepatocarcinoma dentro de las diez las principales causas de muerte en los países con ingreso per cápita mediano bajo y mediano alto, respectivamente (OMS, 2018).

1.1.2 Perspectiva de las enfermedades hepáticas en México.

De acuerdo con los reportes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía las enfermedades de hígado son la cuarta causa de muerte en México. Por lo que es una problemática a nivel nacional y tratarlas es de vital importancia (INEGI, 2016).

1.2 Patogénesis de las enfermedades hepáticas

Los radicales libres se producen durante el metabolismo hepático, así como en reacciones anormales estimuladas por diversas enfermedades y xenobióticos. Estos radicales son átomos o moléculas que contienen electrones desapareados (comúnmente inestables y de alta reactividad) como oxígeno y nitrógeno. Las especies de radicales libres para estos átomos se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS, "*Reactive oxygen species*" por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS, "*Reactive nitrogen species*" por sus siglas en inglés). Particularmente las ROS son capaces de ocasionar daños sobre los tejidos, lo que se denomina "estrés oxidativo", esto es un desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes del organismo. Cuando existe un exceso de oxidantes, el estrés oxidativo es capaz de modificar rutas de control de funciones biológicas normales que pueden ocasionar disfunción mitocondrial, aductos en proteínas, peroxidación lipídica, daño a nivel de ADN, entre otros. (Li y cols., 2015; Kehrer & Klotz, 2015).

El hígado, es uno de los órganos mayormente atacado por las ROS y las células hepáticas que se encuentran más expuestas a este daño son las de Kupffer, las estrelladas y las endoteliales. En este punto el estrés oxidativo es el resultado de la iniciación y progresión de varias enfermedades hepáticas como la esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica. En la figura 2 se muestran los factores exógenos y endógenos que pueden provocar estrés oxidativo (Kehrer & Klotz, 2015).

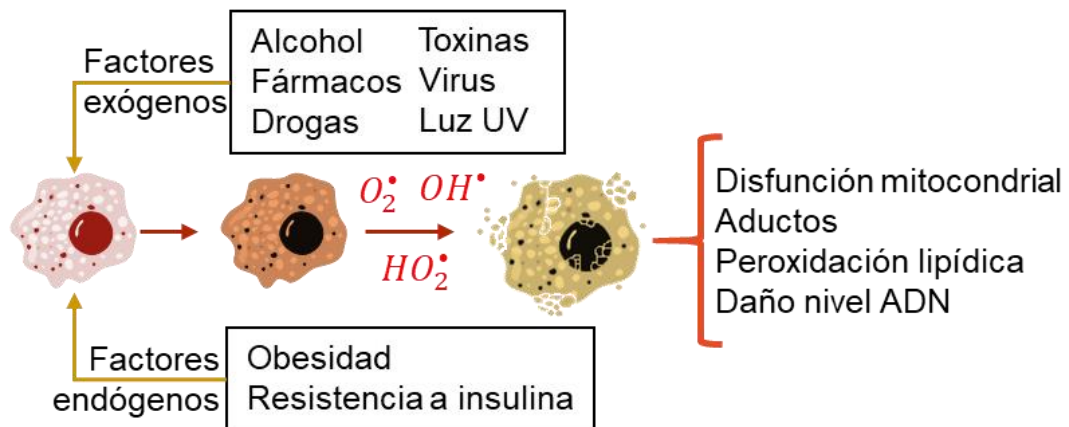


Figura 2. Representación de la inducción del estrés oxidativo por factores exógenos y endógenos. O_2^{\bullet} superóxido, HO^{\bullet} radical hidroperoxilo, HO_2^{\bullet} radical hidroxilo.

1.3 Tratamiento actual de las hepatopatías

El tratamiento de una enfermedad hepática dependerá del diagnóstico clínico. Existen muchos medicamentos para tratarlas, sin embargo no hay un tratamiento definitivo que las cure en su totalidad. A excepción de la hepatitis

C donde se han reportado algunos medicamentos que curan más del 95% de los casos; o la hepatitis B que cuenta con una vacuna como prevención primaria (IMSS, 2008, 2010, 2013, 2014). Por otra parte, algunos de los medicamentos presentan desventajas ya que pueden llegar a perder su actividad farmacológica debido a que el organismo puede desarrollar resistencia, esto en el caso de las enfermedades hepáticas víricas. También con el uso de dosis elevadas o terapias prolongadas se pueden presentar efectos colaterales o cambios cosméticos en el cuerpo (Muñoz, 2007). Por lo anterior es de suma importancia la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

1.4 Medicina herbolaria

El uso tradicional de las plantas es una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades, además que son accesibles y económicas. En la actualidad la medicina tradicional ya no es exclusiva de las sociedades rurales, sino que es aceptada ampliamente por las sociedades urbanas. La OMS (2013) reporta que alrededor del 80% de la población mundial ha recurrido a la medicina tradicional. En algunos países la medicina tradicional es la principal practica de atención a la salud por su accesibilidad económica y su influencia cultural e histórica. Las plantas han sido una fuente muy importante de moléculas con múltiples actividades biológicas; ejemplo de ello la atropina, codeína, dioxina, morfina, quinina, entre otros. (Hosseinzadeh y cols., 2015).

En México la *Ley General de Salud* reconoció los medicamentos herbolarios en 1997 y estableció su definición, registro, elaboración, envasado, publicidad y venta, por medio del *Reglamento de Insumos para la Salud* (De Cossio, 2009). La Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009) cuenta con un inventario de plantas medicinales de México el cual contiene datos como las características vegetales, formas de uso, propiedades terapéuticas, recolección y comercio de muchas plantas medicinales.

De manera general para remarcar la importancia del uso de las plantas para el desarrollo de medicamentos, alrededor del 75% de los fármacos aprobados por la FDA (*Food Drug Administration*) provienen de manera directa o indirecta de fuentes naturales (Newman & Cragg, 2016).

1.1.3 Plantas medicinales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas

Existen diversos reportes de plantas con efecto hepatoprotector, como lo son; *Andrographis paniculata* y *Swertia chirayita*, las cuales actúan como antagonistas de la hepatotoxicidad inducida por paracetamol (Nagalekshmi, Menon y cols., 2011); *Flacourtia montana* que es capaz de prevenir el proceso de daño hepatocelular por su actividad anti-inflamatoria y antioxidante (Joshy y cols., 2016). También se ha demostrado que plantas del género *Opuntia* tienen actividad antioxidante en patologías crónicas, reduciendo significativamente el estrés oxidativo. Además otras plantas como la *Azadirachta indica*, *Cassia roxburghii*, *Coccinia grandis*, *Foeniculum vulgare*, *Indigofera tinctoria*, *Prostechea michoacana*, presentan actividad hepatoprotectora (Jannu y cols., 2012).

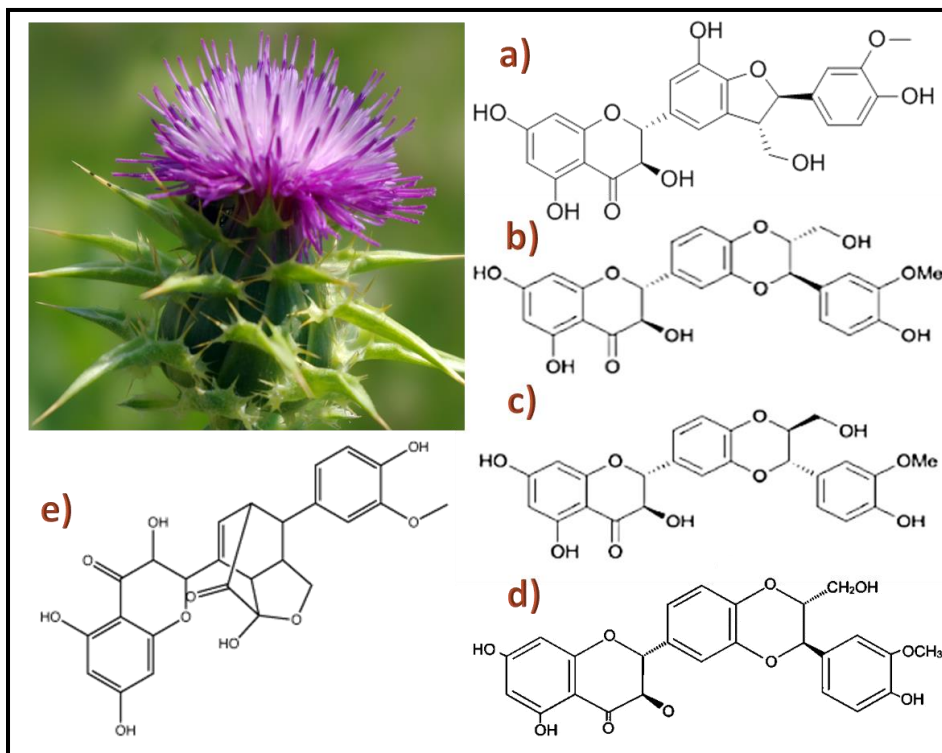


Figura 3. Fotografía de la planta *Silybum marianum* y las estructuras principales del extracto de silimarina: a) Silicristina, b) Silibinina A, c) Silibinina B, d) Silibinina y e) Silidianina.

Por otra parte, la silimarina es un extracto estandarizado y aislado de *Silybum marianum* (figura 3), el cual tiene como principal componente activo a la silibinina. Este extracto es utilizado para el tratamiento de varias enfermedades hepáticas, debido a su propiedad de eliminación de radicales libres y poder antioxidante, lo que permite la regulación de la permeabilidad y estabilización de la membrana celular, estimulación de la regeneración hepática, actividad anti-fibrótica, inmunomoduladoras, antivirales y anti-cáncer (Freitag y cols., 2015; Xiong & Guan, 2017). Por todo lo anterior, la silibinina es el estándar preferido en las pruebas de hepatoprotección *in vitro*.

1.1.4 Plantas medicinales en el tratamiento de las enfermedades hepáticas en México

En México las plantas medicinales son una alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos como opción hepatoprotectora. Alrededor del 60% de la población trata diversas enfermedades con algún tipo de remedio obtenido de plantas. Salazar y cols. (2008) evaluaron 15 extractos de plantas y determinaron su citotoxicidad y la actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa (XO), un tipo de enzima oxígeno-dependiente que origina un radical anión superóxido (O_2^-) y/o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y urato. En este trabajo se encontró que 13 de 15 extractos tuvieron un efecto inhibitorio en la enzima XO; *T. diffusa*, *J. mollis* y *C. foetidissima* presentaron la mayor actividad. Además, Torres y cols. (2014) describieron 13 plantas con actividad hepatoprotectora investigadas previamente, entre ellas: *Amole tuber*, *Centaurea americana*, *Cochlospermum vitifolium*, *Heterotheca inuloides*, *Hibiscus sabdariffa*, *Junglans mollis*, *Krameria ramosissima*, *Leucophyllum frutescens*, *Prosthechea michuacana*, *Psidium guajava*, *Rosmarinus officinalis*, *Turnera diffusa* y *Verbena carolina*.

1.5 Modelos y agentes inductores del daño hepático para la evaluación hepatoprotectora de productos naturales

La necesidad de clasificar compuestos con actividad hepatoprotectora en las investigaciones ha hecho que se requieran ciertos modelos de daño hepático, estos pueden ser *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* y se pueden utilizar para poder

determinar si un compuesto es hepatoprotector con ayuda de un agente inductor del daño hepático (Delgado-Montemayor, y cols., 2015).

Los modelos *in vitro* para la evaluación hepatoprotectora de productos naturales son utilizados para poder establecer mecanismos de acción a nivel celular y molecular, además tienen como ventaja el tiempo invertido y el uso de pequeñas cantidades de compuesto prueba a comparación de las pruebas *in-vivo*. Para la medición del efecto hepatoprotector se pueden utilizar hepatocitos frescos, cultivos primarios de hepatocitos y líneas celulares inmortalizadas como las HepG2, Hep3B, Huh-7, entre otras (Ahmad & Tabassum, 2012; Delgado-Montemayor y cols., 2015).

Existen varios agentes químicos inductores del daño hepático tales como el tetracloruro de carbono (CCl_4), acetaminofén, etanol, tiocetamida, etc. Los dos primeros son mayormente utilizados para investigación. Particularmente el CCl_4 es metabolizado por el citocromo P-450 en el retículo endoplasmático y mitocondria produciendo triclorometil peroxil ($\text{CCl}_3\text{O}^\cdot$), el cual es un radical libre que en los hepatocitos implica estimulación de la peroxidación lipídica. Por otro lado, el acetaminofén a altas dosis es oxidado por el citocromo P-450 a N-acetil-p-benzoquinona el cual es rápidamente unido a glutatión provocando su degradación produciendo así necrosis celular (Ahmad & Tabassum, 2012; Delgado-Montemayor y cols., 2015). Torres González y cols. (2017), encontraron que el CCl_4 es un mejor inductor de daño hepático a comparación del acetaminofén en la línea celular HepG2.

1.6 Relación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora.

Los antioxidantes son capaces de eliminar los radicales libres. Estabilizan el estrés oxidativo provocado por los ROS en la célula e inhiben la etapa de iniciación y propagación, que lleva a una finalización de la reacción y a un retraso del proceso de oxidación. Esta actividad se ha encontrado favorecida mayormente con compuestos fenólicos y flavonoides (Smilin Bell Aseervatham y cols., 2018).

Diversos estudios previos han demostrado la relación que existe entre la actividad antioxidante y hepatoprotectora (Al-Sayed, El-Lakkany, Seif el-Din, Sabra, & Hammam, 2014; Al-Sayed & Esmat, 2016; Chandrasekaran y cols., 2012; Hardenburg, Watada, & Wang, 1988; Huang y cols., 2018; Jothy, Aziz, Chen, & Sasidharan, 2012; Wanjari y cols., 2016).

Por todo lo anterior, resulta importante la búsqueda de fuentes antioxidantes en plantas, que promuevan la salud como posibles agentes terapéuticos hepatoprotectores.

1.7 *Centaurea americana*



Figura 4. Fotografía de la planta *Centaurea americana*.

Centaurea americana es una planta de la familia Asteraceae (de igual manera que la *Silybum marianum*), comúnmente conocida como “Jolly Joker” o flor de canasta. Se distribuye en la región norte del continente americano, comprendiendo los estados de Coahuila y Nuevo León en México y Arizona, Kansas, Louisiana, Missouri, Nuevo México, Oklahoma y Texas en E.U.A. (Shoeb y cols., 2006). Se ha encontrado la presencia de lactanos sesquiterpénicos en extractos de cloroformo (Ohno, Hirai, Yoshioka, Dominguez, & Mabry, 1973) y glucósidos lignanos en extractos metanólicos de la planta (Cooper, Laird, Nahar, & Sarker, 2001).

1.8 Antecedentes

Salazar R. y cols, (2008) determinaron por cromatografía en capa fina y espectrometría UV-vis que el extracto metanólico de la flor de *Centaurea*

americana presentaban efecto antioxidante a través de la captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Torres-González y cols, (2011) probaron el efecto hepatoprotector del extracto metanólico de la flor y la mezcla tallo/hoja de *Centaurea americana in vitro* en la línea celular Huh7. Midieron los niveles de AST y MDA, así como la actividad antioxidante por medio del método de reducción del DPPH y demostraron que el extracto metanólico de la flor resultó tener mayor actividad antioxidante que el extracto de la mezcla tallo/hoja. Además, ambos extractos redujeron los niveles de AST en el modelo de daño inducido con CCl₄ en células Huh7. Así también el tratamiento previo con ambos extractos resultó en la prevención de la peroxidación lipídica, por la disminución del incremento de los niveles de MDA. Posteriormente en la tesis doctoral realizada por Torres-González (2017) en la Universidad Autónoma de Nuevo León, se evaluó la actividad hepatoprotectora y la citotoxicidad del extracto metanólico de la planta *Centaurea americana* en la línea celular HepG2. Para determinar su toxicidad se comparó el extracto a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/mL contra la Silibinina y un control conformado por PBS (Buffer de fosfatos salino) con DMSO. Estos se expusieron a las células durante 1 y 12 horas y se determinó la viabilidad, LDH, AST, ALT, antioxidantes, SOD, GSH y MDA. A las 12 horas de la exposición no se encontraron diferencias significativas entre las determinaciones, sin embargo a 1 hora de exposición se presentaron diferencias significativas. No obstante, se encontró una viabilidad >60%, niveles de AST<50 UI/L, ALT<30 UI/L, antioxidantes totales >2mM, y niveles de MDA, SOD, GSH similares al control, por lo que concluyó que el extracto de *C.*

americana no era citotóxico. Además, se evaluó la actividad hepatoprotectora del extracto metanólico de *C. americana* en la línea celular HepG2. Se realizó un pretratamiento con silibinina y el extracto a tres diferentes concentraciones (10, 100 y 1000 µg/mL), para la posterior inducción de daño con CCl₄ 40 mM por 1h 30 min., lo cual resultó en la reducción de la elevación de la AST, así como la reducción de LDH, además previno la peroxidación. Así también, se hizo una evaluación cualitativa de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *C. americana* donde se utilizó DPPH como revelador, lo cual evidenció la presencia de compuestos antioxidantes. También se realizó la medición cuantitativa de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *C. americana* por medio del porcentaje de reducción del DPPH, encontrándose un valor de CE₅₀ de 17.05 ± 0.32 µg/ mL.

1.9 Justificación

Con base a los reportes previos de actividad antioxidante y hepatoprotectora de *Centaurea americana*, es de importancia llevar a cabo un aislamiento para obtener y caracterizar el o los compuestos responsables de la potencial actividad hepatoprotectora.

1.10 Objetivo General.

Aislar y caracterizar el o los compuestos con potencial actividad hepatoprotectora a partir del extracto metanólico de la flor de *Centaurea americana*.

1.10.1 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos crudo y diferenciales de la flor de *C. americana* y evaluar su actividad hepatoprotectora y antioxidante.
2. Aislar el o los compuestos con mayor actividad hepatoprotectora a partir del o los extractos más activos.
3. Caracterizar estructuralmente el o los compuestos aislados y evaluar su actividad biológica.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

- Botella de cultivo celular con ventilación de 75 cm².
- Cámara de Neubauer
- Capilares de 10µL
- Columna de vidrio para baja presión de 50 cm².
- Cubas cromatográficas de 121x108x80 mm.
- Embudo de separación de 1000 mL.
- Espátula
- Frascos de vidrio ámbar
- Gradillas.
- Licuadora
- Matraces bola de 100 mL
- Matraces bola de 1000 mL
- Matraces bola de 500 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 1000 mL
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL
- Pipetas automáticas de 10, 200 y 1000 µL.
- Pipetas serológicas estériles 5 mL y 10 mL.
- Placas de sílice 20 x 20 cm.
- Placas para cultivo celular de 24 y 96 pozos.
- Probetas de 25, 50, 250 mL.

- Puntillas para pipeta automática de volumen ajustable p200 y p1000.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Tubos de fondo cónico, estériles, graduados, de 15 y 50 mL.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Vasos de precipitado de 100 mL.
- Vasos de precipitado de 1000 mL.
- Vasos de precipitado de 250 mL.
- Vasos de precipitado de 50 mL.
- Vasos de precipitado de 500 mL.

2.2 Reactivos

- 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), Sigma-Aldrich Chemical Co.
- Acetato de etilo, Fermont.
- Acetona, Fermont.
- Ácido acético glacial, Fermont.
- Ácido Fórmico, Fermont.
- Advanced DMEM, Gibco.
- Agua bidestilada.
- Agua miliQ.
- Alcohol Butílico, Fermont.
- Alcohol Etilico, Fermont.
- Amortiguador de fosfato salino, Sigma-Aldrich Chemical Co.

- Antibiótico glucosado, Sigma-Aldrich.
- Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro (MTT, *por sus siglas en inglés*), Sigma-Aldrich Chemical Co.
- Azul de tripano, Sigma-Aldrich Chemical Co.
- Dimetil sulfóxido, Fermont.
- Hexano, Fermont.
- Metanol grado analítico, Fermont.
- Nitrógeno, Praxair.
- Quercetina, TCI America.
- Silibinina, Sigma-Aldrich Chemical Co.
- Silica gel 60 (0.040-0.063 mm), MERCK.
- Silica gel 60 (0.063-0.200 mm), MERCK.
- Suero Fetal Bovino, Gibco.
- Tetracloruro de carbono, A.C.S. Reagent, Sigma-Aldrich Chemical Co.
- Tripsina, Gibco.

2.3 Equipo

- Agitador shaker, Heidoph, UNIMAX 1010.
- Autoanalizador de bioquímica ILAB aries, Clinical Chemistry System.
- Autosampler, Waters, 717 plus.
- Balanza analítica, OHAUS PIONEER, PA214C.
- Balanza granataria, OHAUS PIONEER, PA3102.
- Baño de ultrasonido, Branson, 25108-DTH.

- Binary HPLC pump, Waters, 1525.
- Bomba de acuario, Elite, 802.
- Bomba de vacío, Gast, 1HAB-25-M100X.
- Bomba de vacío, Labconco, 117.
- Bomba de vacío, Welch, 2025.
- Bomba Smart line pump 100, Knauer, V5010.
- Campana de extracción, Lumister, CEE-120.
- Campana de extracción, Lumister, CEE-120.
- Campana de seguridad biológica, predo, CSB-120.
- Centrifuga, Thermo IEC centra CL3R.
- CO2 Incubator, MIDI 40, Thermo scientific.
- Colector automático de fracciones, Biorad, 2128.
- Equipo de rotavapor, HEIDOLPH, Laborota 2.
- Equipo de rotavapor, HEIDOLPH, Laborota 4000.
- Esterilizador de material, Sterilmatic, Market Forge.
- HPLC Waters 600.
- Incubadora, Blue M., 100A.
- Incubadora, Shell-lab, 1305-O.
- In-Line Degasser AF, Waters.
- Inverstoscopio, Olympus, CKX41.
- Lampara de UV, Spectroline, ENF-260C.
- Lector de microplacas, Thermo scientific, 357.
- Licuadora, Man, LMU-9090.

- Microcentrifuga, International, LEC-micro-MB.
- Microscopio, EAGLE, CM240.
- Detector de arreglo de diodos, Waters, 2996.
- Pistola de desecación, Degasa GmbH, O-6900.
- RMN marca Bruker modelo Avance DPX400 de 400MHz
- Vortex, VWR.Scientific Products, 58816121.

2.4 Material biológico

Se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2.

2.5 Material vegetal

Se usó la flor de *C. americana* seca, colectada en mayo-junio del año 2013 en el Barral, Villar de Santiago, N.L. La planta fue autenticada por el Herbario Institucional perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el siguiente código: UAN-17624.

3 METODOLOGÍA

3.1 Obtención del extracto crudo.

Se partió de la flor seca de *Centaurea americana*, se molió en licuadora y se pesaron 100 g. en matraces Erlenmeyer de un litro; se añadieron 750 mL metanol de manera que la planta seca se encontrara embebida en él disolvente, después se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró y el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

3.2 Obtención de los extractos diferenciales.

Se pesaron 10 g de extracto crudo y se suspendieron en 50 mL de agua con ayuda del equipo de sonicación. Después se añadió a un embudo de separación y se agregaron 35 mL de hexano; se agitó y se separó la fase orgánica. Este procedimiento se hizo por triplicado y se repitió posteriormente con acetato de etilo y butanol. Los extractos obtenidos se llevaron a evaporación a presión reducida y se almacenaron a 4°C en ambiente de N₂.

3.3 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo y los diferenciales de *Centaurea americana*.

Esto se llevó a cabo por medio del ensayo de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), el cual es un radical libre y estable que no se

dimeriza como otros radicales libres, debido a que el electrón desapareado tiene la libertad de deslocalizarse en la molécula. Esta deslocalización produce un color violeta oscuro en solución con etanol que absorbe a 517 nm. Cuando existe la presencia de un donador de hidrogeno, el DPPH se reduce y pierde el color violeta (Nur Alam y cols., 2013).

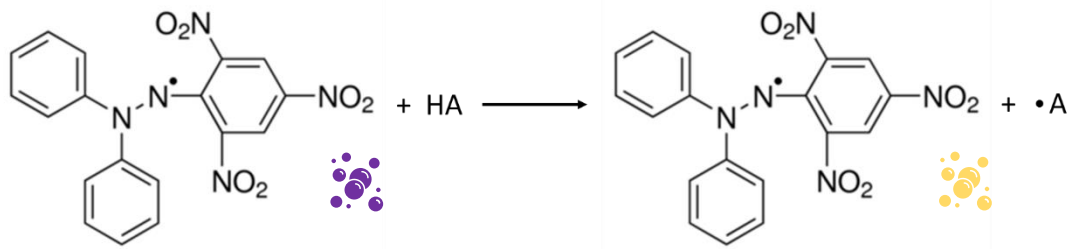


Figura 5. Esquema de reducción del radical DPPH.

Lo siguiente se llevó a cabo según el procedimiento establecido por Granados-Guzman y cols. (2017). Los extractos diferenciales, crudo y el control positivo (quercetina) se disolvieron en etanol y a partir de estas soluciones se realizaron diluciones seriadas en un intervalo de 250 a 1.95 $\mu\text{g/mL}$ en una placa de 96 pocillos a un volumen final de 100 μL . Posteriormente se añadieron 100 μL de DPPH 280 μM para un volumen final de 200 μL . Por último se mantuvo a oscuridad por 15 minutos y transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 540 nm, se utilizó como control positivo quercetina 260 $\mu\text{g/mL}$, como blanco etanol sin DPPH 280 μM y como control negativo etanol con DPPH 280 μM .

Para obtener la concentración reductora media, primero se calculó el porcentaje de reducción de la siguiente manera:

$$\% \text{ Reducción} = \frac{\text{Absorbancia control negativo} - \text{absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia control negativo}} \times 100$$

Finalmente se graficó la concentración en función del porcentaje de reducción de DPPH, con ayuda de la gráfica se obtuvo la ecuación de la recta y a partir de esta la concentración reductora media (CR₅₀).

3.4 Cultivo celular.

La línea celular HepG2 se mantuvo en crecimiento en medio D-MEM Advance (suplementado con suero fetal bovino 10% y 1% penicilina G 100 UI/mL) a una temperatura de 37°C con 5% CO₂ y una confluencia de 70 a 80 %.

3.4.1 Descongelamiento celular.

Se descongeló un vial con células HepG2, y se propagó en frascos de 75 cm², conteniendo medio de cultivo D-MEM Advanced suplementado. Después se colocó en la incubadora en condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂). Al día siguiente se verificó su confluencia por medio de un invertoscopio y una vez llegada una confluencia del 70- 80% se utilizaron para los ensayos. Las células que no se utilizaron para ensayos se siguieron propagando.

3.4.2 Propagación y conteo celular.

Se tomó una botella con células de la incubadora y se le retiró el medio, se enjuagó con 5 mL PBS 1x, después se añadió 3 mL de tripsina para posteriormente incubar a 37°C con 5% de CO₂ por 8 min. Transcurrido el tiempo se añadió 3 mL de medio y se llevó a centrifugación 2.5 minutos a 2000

rpm, finalmente se decantó el sobrenadante y el botón de células se suspendió en 1 mL de medio.

3.4.2.1 Propagación celular.

La suspensión se fraccionó y cada fracción se añadió a frascos de 75 cm² con 10 mL de medio suplementado para después incubar a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente se verificó su confluencia por medio de un invertoscopio y una vez llegada una confluencia del 70- 80% se utilizaron para los ensayos. Las células que no se utilizaron para ensayos se siguieron propagando.

3.4.2.2 Conteo celular.

Se realizó una solución conformada de 20 µL de azul de tripano y 50 µL de medio D-MEM suplementado en un vial de 250 µL, a esta solución se le añadió 10 µL de suspensión de células y se mezcló con la micropipeta gentilmente y se esperó un minuto para por último tomar 10 µL de la mezcla y colocarlos en la cámara de Neubauer. Finalmente se realizó el conteo de las células no teñidas de azul (células vivas) en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara Neubauer; este conteo se realizó por duplicado. Se promediaron los cuatro cuadrantes para obtener el total de células por cuadrante. Para calcular el número de células por mililitro se aplicó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{No. Células}}{\text{mL}} = (\text{Total de células}/4)(\text{Factor de dilución})(10^4)$$

Los cálculos fueron realizados de acuerdo con el número de células requeridas para cada ensayo.

3.5 Determinación de la citotoxicidad en células HepG2.

3.5.1 Determinación del recuento óptimo de células.

Se utilizó la línea celular HepG2 en condiciones estándar con una confluencia del 80-90%. El ensayo se realizó en placas de 96 pozos con el siguiente número de células por pozo: 2500, 5000, 10000, 20000, 40000, 60000, 80000 y 100000. Posteriormente se incubaron durante 24 horas, y transcurrido el tiempo se retiró el medio y se añadió 100 μ L MTT 0.5 mg/ mL durante tres horas a 37°C con 5% de CO₂. Se decantó el sobrenadante y se agregó 100 μ L DMSO, se esperó por 10 min y se midió la densidad óptica a 540 y 620 nm. Finalmente se eligió la cantidad de células que dieran una densidad óptica alrededor de 0.75 - 1.25 como lo establece la ATTC (2011). También se analizó de manera estadística si había diferencia significativa entre las medias obtenidas, por lo que se realizó una prueba de ANOVA de un factor.

3.5.2 Evaluación de la citotoxicidad del DMSO.

Se sembraron 60,000 células por pozo y se incubaron durante 24 horas, transcurrido el tiempo se añadió DMSO al 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125% y se incubaron durante 24 horas, después se retiró el medio y se añadió 100 μ L MTT 0.5 mg/ mL durante tres horas a 37°C con 5% de CO₂. Por último se decantó el sobrenadante y se agregó 100 μ L DMSO, se esperó por 10 min y se midió la densidad óptica a 540 y 620 nm. Finalmente se graficó concentración en función a la densidad óptica, se obtuvo la ecuación de la recta y se calculó la CC₅₀.

La densidad óptica obtenida en este ensayo fue directamente proporcional al número de células vivas. Se utilizaron como control de toxicidad doxorrubicina 8.8×10^{-3} % p/v y como control negativo medio de cultivo. Por último, se analizó de manera estadística si había diferencia significativa entre las medias obtenidas, por lo que se realizó una prueba de ANOVA de un factor.

3.6 Ensayo de hepatoprotección en células HepG2.

Se realizó el ensayo con la línea celular HepG2 mediante el daño inducido con CCl_4 con los extractos crudo y diferenciales según el procedimiento establecido en la tesis doctoral de Torres-González (2017). Se utilizó como marcador de daño la enzima aspartato aminotransferasa (AST), como control de hepatoprotección positivo se utilizó silibinina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en DMSO 0.125%, como control negativo: medio de cultivo con DMSO 0.125% y como control de daño positivo: CCl_4 40 mM en DMSO 0.125%.

Este ensayo se realizó en placas de 24 pozos donde se incubaron 800,000 células por pozo durante 12 horas. Transcurrido el tiempo se retiró el medio y se añadieron los extractos en las siguientes concentraciones: 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante una hora a 37°C con 5% de CO_2 , después de este tiempo se decantó el sobrenadante y se añadió CCl_4 40 mM durante dos horas y media. Finalmente se tomó el sobrenadante y se cuantificó en el equipo ILAB Aries, Clinical Chemistry System.

3.7 Aislamiento de compuestos mayoritarios con actividad antioxidante a partir del extracto de acetato de etilo.

El aislamiento se realizó a partir del extracto con mayor actividad antioxidante y hepatoprotectora. En general, el procedimiento a realizar fue el siguiente: se pesaron 300 mg de extracto diferencial y se hicieron pasar por una columna a baja presión con fase estacionaria octadecilsilano (C-18) con el sistema de elución mostrado en la tabla 1. Se recolectó 1.5 mL/min por tubo, y las fracciones obtenidas se concentraron y se analizaron por CCF (Cromatografía en Capa Fina). Posteriormente se determinó la actividad antioxidante cualitativa rociando DPPH 2 mg/mL en la capa fina; como resultado se observaron los compuestos con actividad antioxidante en color amarillo en un fondo violeta.

En este primer aislamiento se obtuvieron siete fracciones (1-7). Las fracciones que presentaron compuestos mayoritarios y con actividad antioxidante frente al DPPH fueron seleccionados para llevar a cabo el aislamiento biodirigido. A continuación se describe el aislamiento de compuestos a partir de éstas.

Tabla 1. Sistema de elución para el extracto de acetato de etilo.

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	40	60
35	60	40
75	80	20
110	100	0

Flujo 1.5 mL/min

3.5.1 Aislamiento de la fracción 1.

Se hizo pasar la fracción 1 por una columna C-18 con el sistema de elución mostrado en la tabla 2 y se recolectó a 1.5 mL/min por tubo.

Tabla 2. Sistema de elución para la fracción 1.

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	30	70
35	40	60
75	45	55
110	50	50

Flujo 1.5 mL/min

La subfracción 1.2 obtenida de la fracción 1 se sembró en una columna de exclusión molecular con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y metanol como fase móvil.

3.5.2 Aislamiento de la fracción 3.

La fracción 3 precipitó espontáneamente un sólido amorfo color amarillo, el cual fue lavado con agua varias veces.

3.5.3 Aislamiento de las fracciones 5, 6 y 7.

Para realizar el aislamiento de las fracciones 5, 6 y 7 se probaron las siguientes fases móviles en una columna en silica gel con un volumen de 2.5 mL, para seleccionar aquella con la que se lograba una mejor separación de los compuestos:

- 1) Hexano: acetato de etilo 2:8
- 2) Hexano: acetona 1:1
- 3) Acetato de etilo

4) Acetato de etilo: acetona 8:2.

Se eluyó con cinco volúmenes de columna.

3.5.3.1 Aislamiento de la fracción 6.

El aislamiento de la fracción 6 se realizó por cromatografía en columna de silica gel con fase móvil de acetato de etilo: acetona (8:2). Posteriormente se hizo una CCF y se eluyó con tolueno: acetona 1:1 para reducir el factor de retardo (RF) y observar si algún otro compuesto se encontraba presente.

3.8 Análisis por HPLC-DAD de los compuestos aislados

Para el análisis por HPLC-DAD se usó una columna de fase inversa Chromolith® Performance RP-18e (100 x 4.6 mm, monolítica) de Merck. Se utilizó el sistema de elución mostrado en la tabla 3, con un flujo de 0.3 ml/min, volumen de inyección de 5 µL y la detección se llevó a cabo a 254 nm.

Tabla 3. Sistema de elución para el análisis por HPLC.

Tiempo	% Metanol	% Agua
0	20	80
40	60	40
50	100	0

3.9 Análisis estructural de los compuestos aislados.

Se realizó la caracterización estructural de los compuestos aislados por medio de resonancia magnética nuclear. Se adquirieron los espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN, DEPT, COSY, NOESY, HMBC y HSQC. Para todos los análisis se utilizó MeOD como disolvente.

3.10 Evaluación de biológica de los compuestos aislados.

Se determinó la actividad antioxidante como se menciona en el punto 1.3, la actividad hepatoprotectora como en el punto 1.6 y se evaluó su citotoxicidad como se menciona en el punto 1.5.2.

4 RESULTADOS

4.1 Obtención del extracto crudo y diferenciales a partir de *Centaurea americana*.

Mediante extracción metanólica de *Centaurea americana* se obtuvo un extracto crudo con un porcentaje de recuperación de $18 \pm 2\%$. A partir del extracto crudo se obtuvieron los extractos diferenciales con porcentajes de recuperación que van desde 23 al 29% (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de recuperación de extractos diferenciales obtenidos del extracto crudo de *Centaurea americana*.

Extracto	% Recuperación
Hexánico	23 ± 5
Acetato de etilo	29 ± 5
Butílico	28 ± 7
Acuoso	26 ± 3

4.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudo y diferenciales de *Centaurea americana*.

Las CR_{50} obtenidas para los extractos crudo y diferenciales de *Centaurea americana* se encontraron entre $51 \mu\text{g/mL}$ hasta más de $250 \mu\text{g/mL}$, mientras que el control quercetina presentó una CR_{50} de $3.28 \mu\text{g/mL}$. El extracto con menor CR_{50} es el extracto de acetato de etilo, mientras que el de mayor CR_{50} fue extracto hexánico (tabla 5).

Tabla 5. Actividad antioxidante por medio del ensayo de reducción del DPPH 280 mM de los extractos obtenidos de *Centaurea americana*.

Muestra	CR ₅₀ (µg/mL)
Quercetina (Control)	3.28 ± 0.04
E. Crudo	90.97 ± 0.20
E. Hexánico	>250.00
E. Acetato de etilo	51.60 ± 0.12
E. Butílico	66.20± 0.18
E. Acuoso	78.40 ± 1.20

4.3 Determinación del número óptimo de células HepG2 (por pozo) para el ensayo de citotoxicidad.

En la figura 6 se muestra la curva de células HepG2 en donde se representa el número de células sembradas por pozo en función de su densidad óptica. Se puede observar que la curva presenta una tendencia lineal con una r^2 (constante de determinación) de 0.9966. El análisis ANOVA de un factor dio como resultado que hay diferencia significativa entre las diferentes cantidades de células HepG2 sembradas por pozo. Además, se puede ver en la figura 6 que el intervalo de trabajo de densidad óptica descrito anteriormente (3.5.1) cae entre 200,000 y 600,000 células.

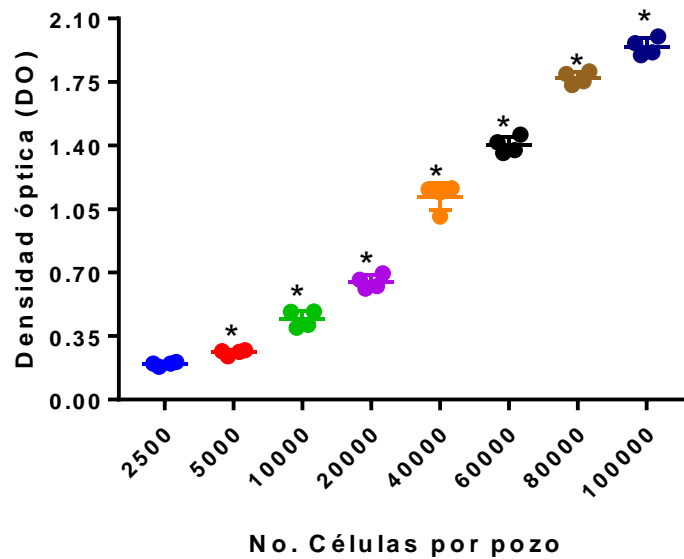


Figura 6. Gráfica determinación del número óptimo de células HepG2 para el ensayo de citotoxicidad. *P<0.0001 en comparación múltiple.

4.4 Evaluación de la citotoxicidad del DMSO en células HepG2.

En la figura 7 se observan los resultados de la evaluación de la citotoxicidad del DMSO en las células HepG2. Como resultado se obtuvo que entre 0.25 - 5% de DMSO hay diferencia significativa ($p < 0.005$) con respecto al control negativo (células no expuestas a daño celular). Al contrario a 0.125% de DMSO no hubo diferencia significativa, por lo que la reducción de la viabilidad celular es menor.

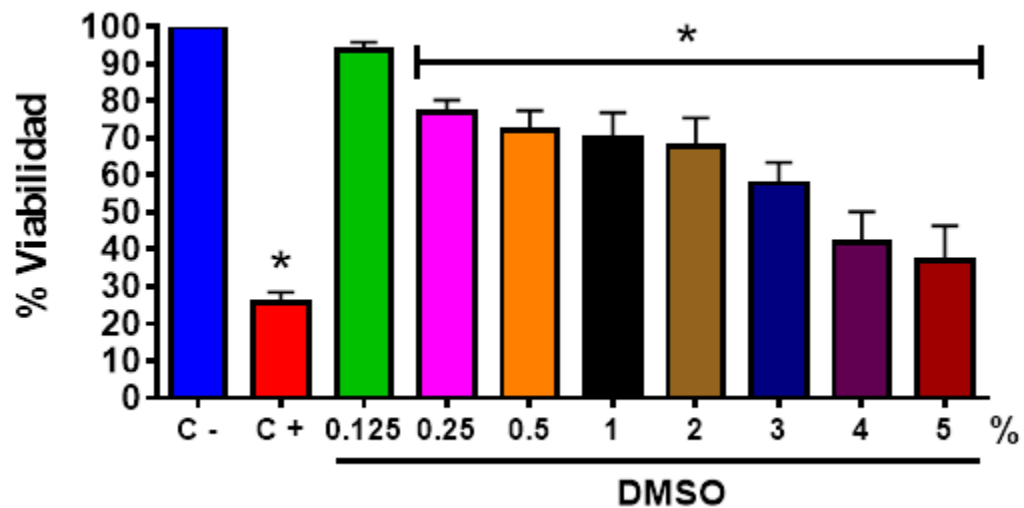


Figura 7. Gráfico de viabilidad celular debida al DMSO en diferentes concentraciones. Control negativo (C-): Medio D-MEM Suplementado, control positivo (C+): Doxorrubicina 8.8×10^{-3} % p/v. * $P < 0.005$ en comparación de C-.

4.5 Actividad hepatoprotectora del extracto crudo y los diferenciales de *Centaurea americana* en células HepG2 con daño inducido con CCl_4 40mM.

En la tabla 6 se presenta la actividad hepatoprotectora obtenida del extracto crudo y los diferenciales; esto se observa en función a la reducción de los niveles de AST en comparación con el control de daño. Los niveles de AST de los extractos variaron entre 65 y 146 UI/L. Todos los extractos a excepción del hexánico disminuyeron los niveles de AST con respecto al control de daño. Particularmente el extracto de acetato de etilo redujo los niveles de AST a menores concentraciones con respecto a los demás extractos, por lo que fue este fue el que presentó mayor actividad hepatoprotectora.

Tabla 6. Actividad hepatoprotectora de los extractos de *Centaurea americana* en células HepG2 con daño inducido con CCl₄ 40mM.

Muestra	Concentración (µg/mL)	AST (UI/L)
Control negativo (Medio D-MEM Suplementado)	-	45 ± 8
Control de daño (Medio D-MEM Suplementado + CCl ₄ 40 mM)	-	154 ± 14
Silibinina + CCl ₄ 40 mM.	100.00	65 ± 4
E. Crudo + CCl ₄ 40 mM.	10.00	96 ± 5
	100.00	85 ± 5
	1000.00	75 ± 6
E. Hexánico + CCl ₄ 40 mM.	10.00	135 ± 14
	100.00	131 ± 13
	1000.00	146 ± 17
E. Acetato etilo + CCl ₄ 40 mM.	0.18	118 ± 12
	1.81	98 ± 7
	18.14	99 ± 4
E. Butanólico + CCl ₄ 40 mM.	10.00	99 ± 6
	100.00	88 ± 4
	1000.00	65 ± 11
E. Acuoso + CCl ₄ 40 mM.	10.00	95 ± 4
	100.00	93 ± 5
	1000.00	78 ± 4

4.6 Aislamiento de compuestos con actividad antioxidante a partir del extracto de acetato de etilo.

A partir del extracto de acetato de etilo se obtuvieron siete fracciones las cuales fueron analizadas por CCF. En la figura 8 se puede observar las siete fracciones representadas en cada uno de los carriles de la cromatopla. En ellos se puede ver una gran variedad de compuestos por fracción, sin embargo solo las fracciones 1, 3 y 6 presentaron compuestos mayoritarios con actividad antioxidante. En la figura 8B se observan los compuestos seleccionados para llevar a cabo el aislamiento.

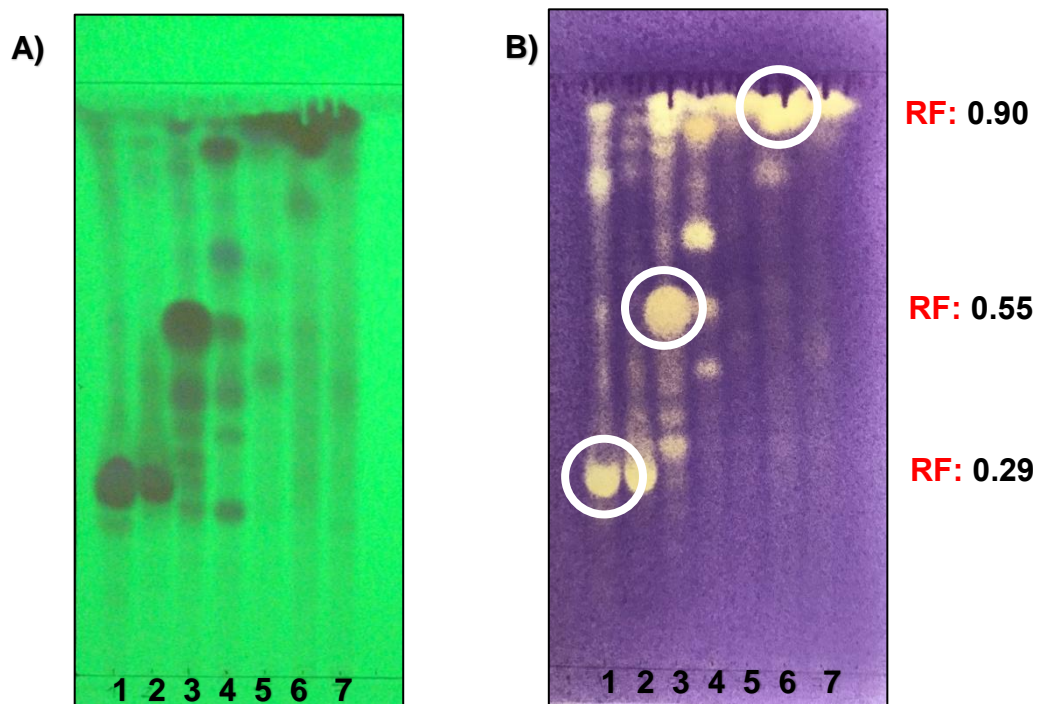


Figura 8. Cromatografía en capa fina de las siete fracciones obtenidas a partir de E. acetato de etilo, A) UV 254 nm, B) Revelada con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).

4.6.1 Aislamiento de la fracción 1.

De la fracción 1 se obtuvieron las subfracciones 1.1 y 1.2. En la figura 9 se puede observar que las dos presentaron compuestos mayoritarios con actividad antioxidante, sin embargo se eligió la subfracción 1.2 por presentar el menor número de compuestos aparentes.

De la columna de exclusión molecular realizada para la fracción 1.2 se obtuvo el primer compuesto aislado (C1), tal como se muestra en figura 10. Sin embargo, no presentó actividad antioxidante ante el DPPH.

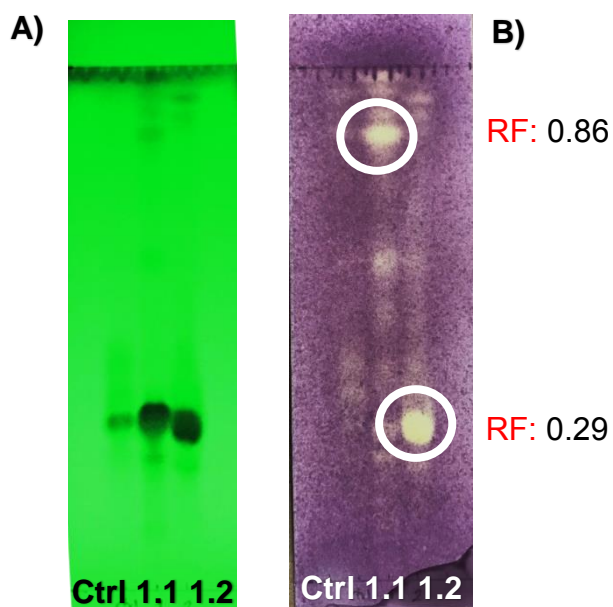


Figura 9. Cromatografía en capa fina de las dos subfracciones obtenidas de la fracción uno de acetato de etilo. A) UV 254 nm, B) revelada con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).

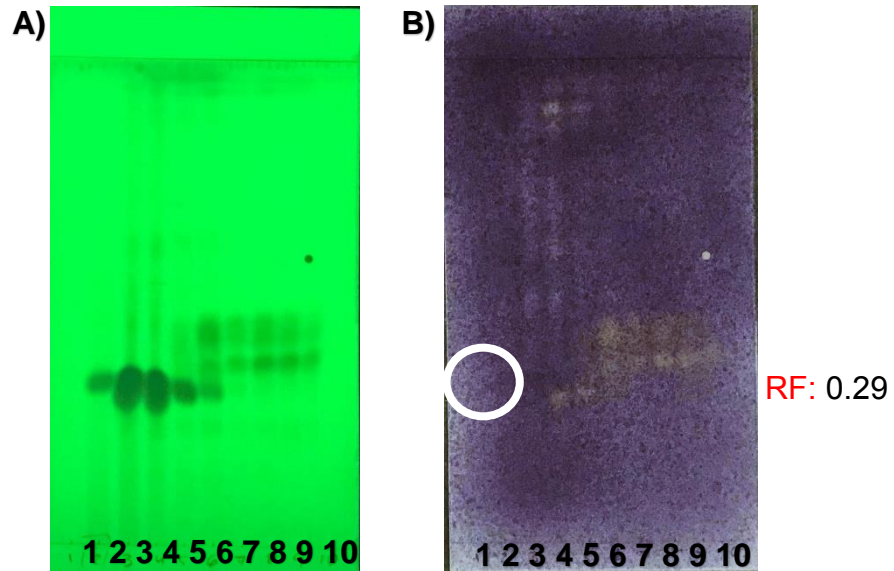


Figura 10. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la columna de Sephadex de la subfracción 1.2. A) UV 254 nm, B) revelada con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).

4.6.2 Aislamiento de la fracción 3

En la figura 11A se muestra el tubo que contiene el compuesto sólido amorfo, y que en la figura 11B y C se puede apreciar las cromatoplasmas para el compuesto a 254 nm y revelada con DPPH 2 mg/mL respectivamente. En las dos cromatoplasmas se puede observar la presencia de una sola banda, la cual presentó actividad antioxidante.

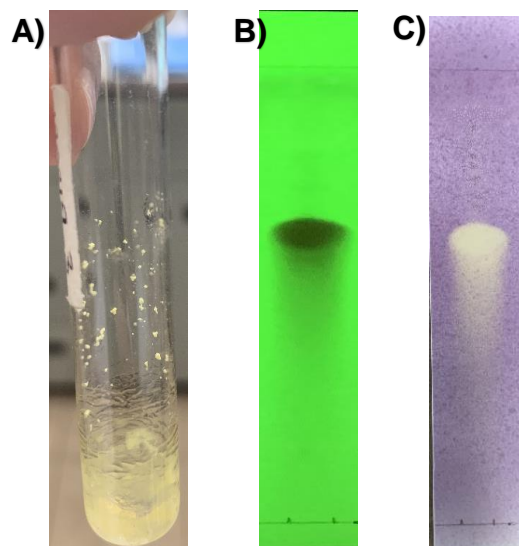


Figura 11. Tubo de ensayo y cromatografía en capa fina de C2. A) Compuesto precipitado, B) UV: 254 nm, C) revelado con DPPH 2 mg/mL. FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2).

4.6.3 Aislamiento de las fracciones no. 5, 6 y 7.

En la figura 12 se muestran las cromatoplasmas realizadas para cada una de las fases móviles probadas. Estas se observan en un contraste en blanco y negro debido a la mala calidad obtenida de la imagen a color, sin embargo es el correspondiente a la visualización en lámpara de UV a 254 nm.

Se puede observar que las cromatoplasmas de la figura 12A, B y C presentan diferentes compuestos para cada una de las fracciones (representadas en cada carril respectivamente) pero no se llegan a resolver, a diferencia de la cromatoplasma de la figura 12D donde se ve la resolución notable entre los compuestos de cada fracción. Aún así, solo la fracción 6 presenta un compuesto mayoritario, por lo que el aislamiento prosiguió con esta fracción.

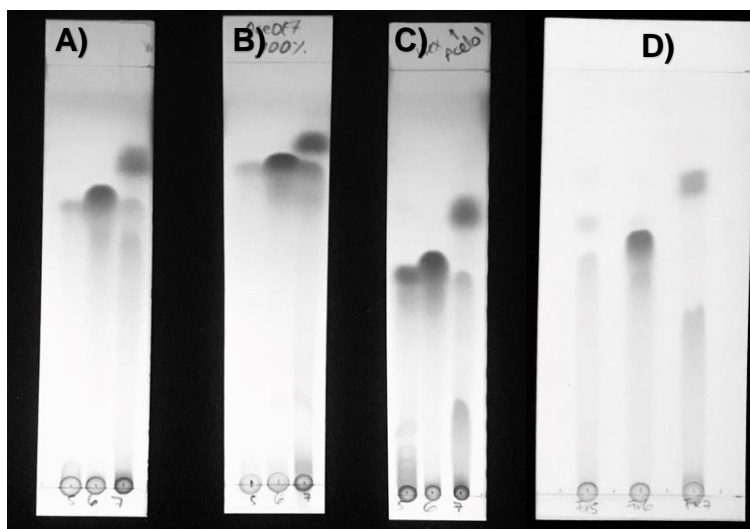


Figura 12. Cromatografía en capa fina de las fracciones no. 5, 6 y 7 eluidas con las siguientes fases móviles: A) hexano: acetato de etilo (2:8), B) acetato de etilo, C) hexano: acetona (1:1), D) acetato de etilo: acetona (8:2). UV 254 nm, en contraste blanco y negro.

4.6.3.1 Aislamiento de la fracción 6.

En la figura 13A se ve la placa perteneciente al resultado de la columna de silica gel realizada para la fracción 6, en la cual se observa que los primeros dos tubos aparentan tener un compuesto aislado. Además, al visualizarlo a 365 nm se observó una fluorescencia de color azul junto a la banda oscura, lo cual indica la presencia de un segundo compuesto (figura 13 B). En la figura 13D y E se puede apreciar el compuesto nuevamente eluido con otra fase móvil; en esta cromatoplaqa se puede ver la presencia aparente de un solo compuesto con actividad antioxidante.

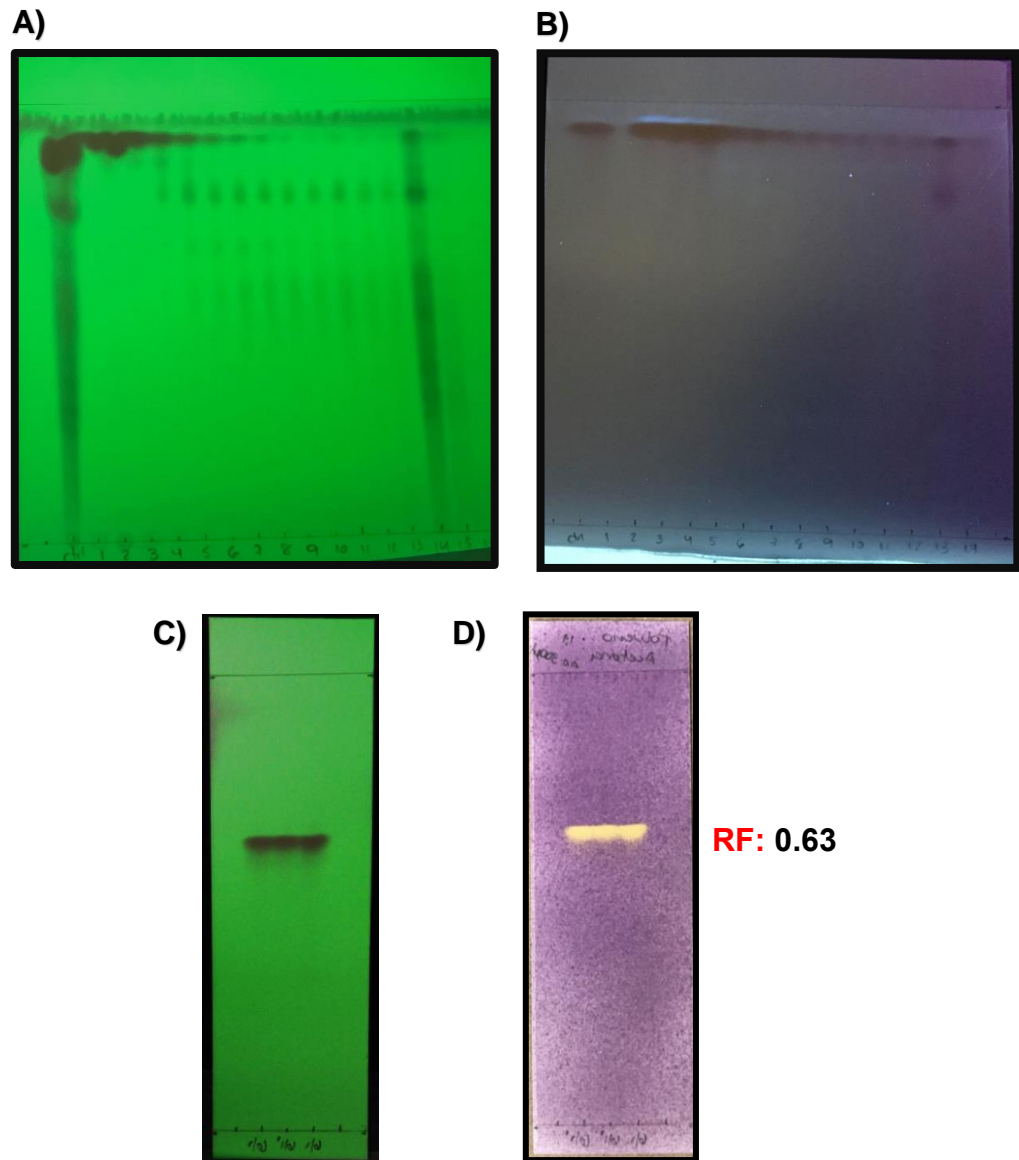


Figura 13. Cromatografía en capa fina del resultado de la columna de silica gel realizada para la fracción no. 6. UV A) 254 nm B) 365 nm, FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (25:1:1:2). C) UV 254 nm y D) revelado con DPPH 2 mg/mL. FM: tolueno: acetona (1:1).

4.7 Análisis por HPLC de los compuestos aislados

Se obtuvieron cromatogramas por HPLC (*Cromatografía de líquidos de alta resolución*, por sus siglas en inglés) del extracto de acetato de etilo y las fracciones 1, 3 y 6 de donde se obtuvieron los compuestos C1, C2 y la mezcla C3/C4 respectivamente. En la figura 14 se puede observar el cromatograma correspondiente al extracto de acetato de etilo;—se pueden visualizar la cantidad de compuestos que presenta el extracto, entre ellos los de interés.

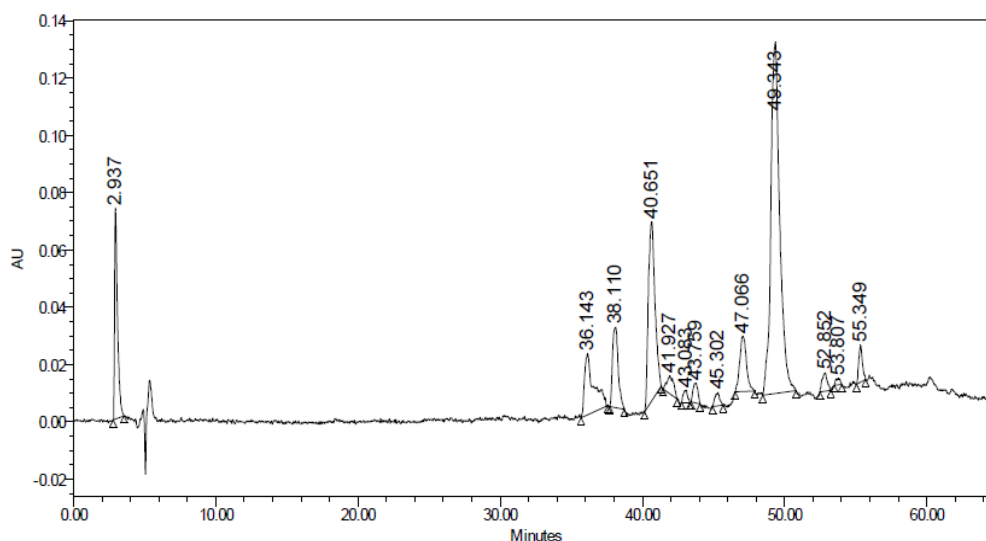


Figura 14. Cromatograma del extracto de AcOEt. Longitud de onda de lectura 254 nm.

En las figuras 15, 16 y 17 se pueden observar los cromatogramas correspondientes a las fracciones 1, 3 y 6 respectivamente. En ellos se puede apreciar la diferencia en los tiempos de retención obtenidos y la proporcionalidad de los compuestos, de acuerdo con los porcentajes de área que lo conforman.

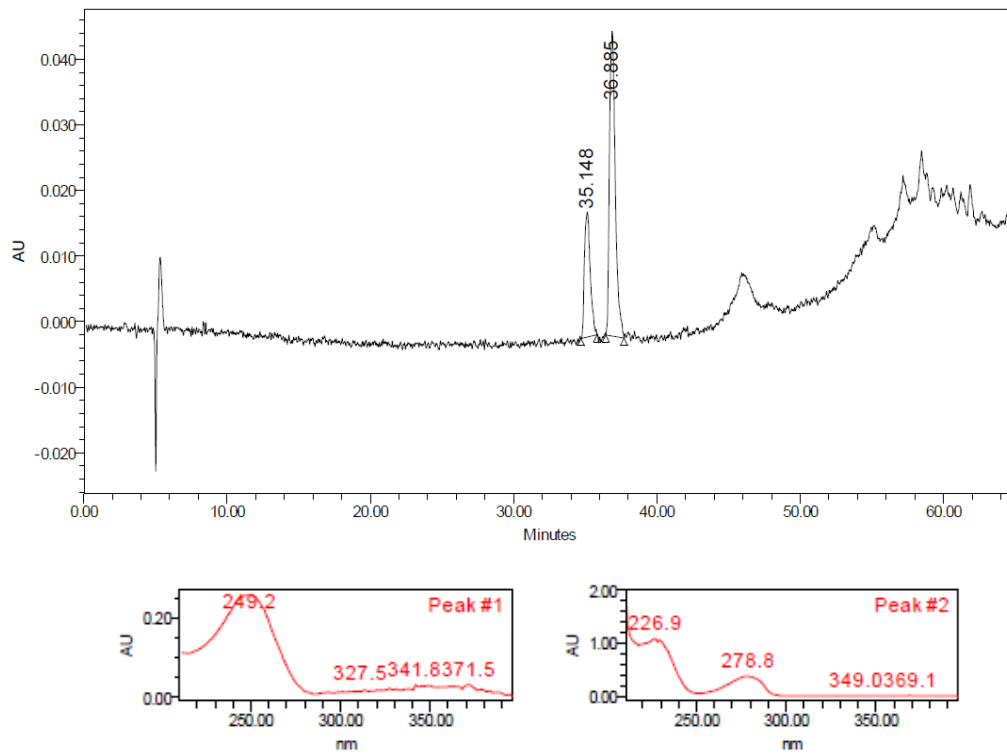


Figura 15. Cromatograma y espectros de absorción de la fracción 1 de acetato de etilo. Longitud de onda de lectura 254 nm.

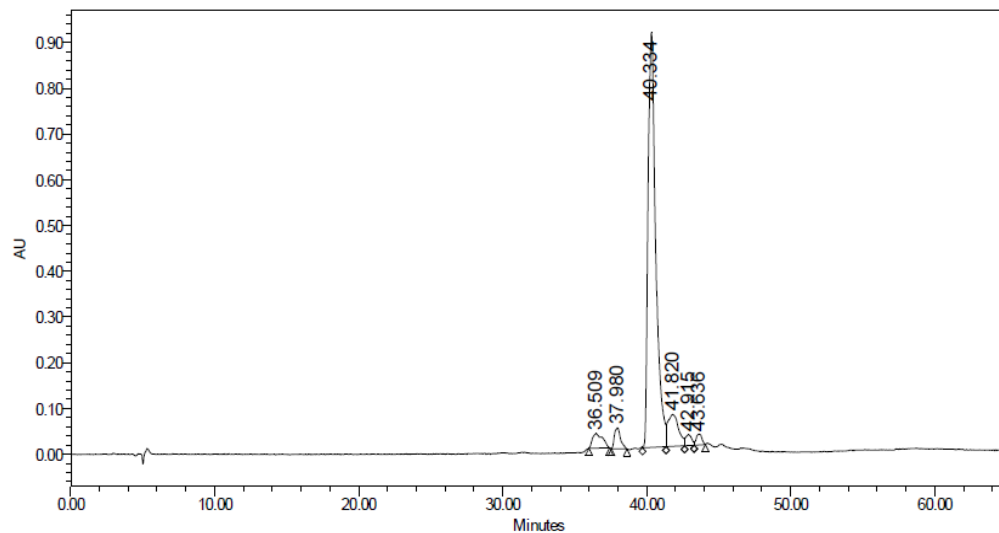


Figura 16. Cromatograma de la fracción 3 de acetato de etilo. Longitud de onda de lectura 254 nm.

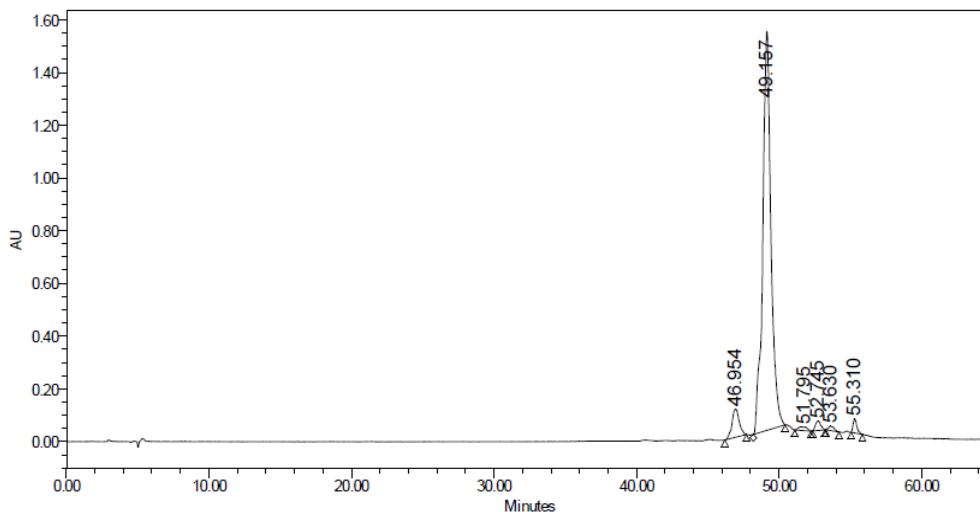


Figura 17. Cromatograma de la fracción 6 de acetato de etilo. Longitud de onda de lectura 254 nm.

En las figuras 18, 19 y 20 se muestran los cromatogramas pertenecientes a los compuestos aislados, así como los espectros de absorción de cada uno de los picos presentados. Particularmente se puede observar que C1 (figura 18 A) presenta tres picos con diferentes tiempos de retención, así como los espectros obtenidos de cada uno, además se obtuvo el cromatograma de una hidrolisis realizada a C1 en donde se observaron dos picos con diferentes tiempos de retención y sus espectros de UV. A diferencia de C1, C2 y C3 solo presentaron un pico con su correspondiente espectro de absorción.

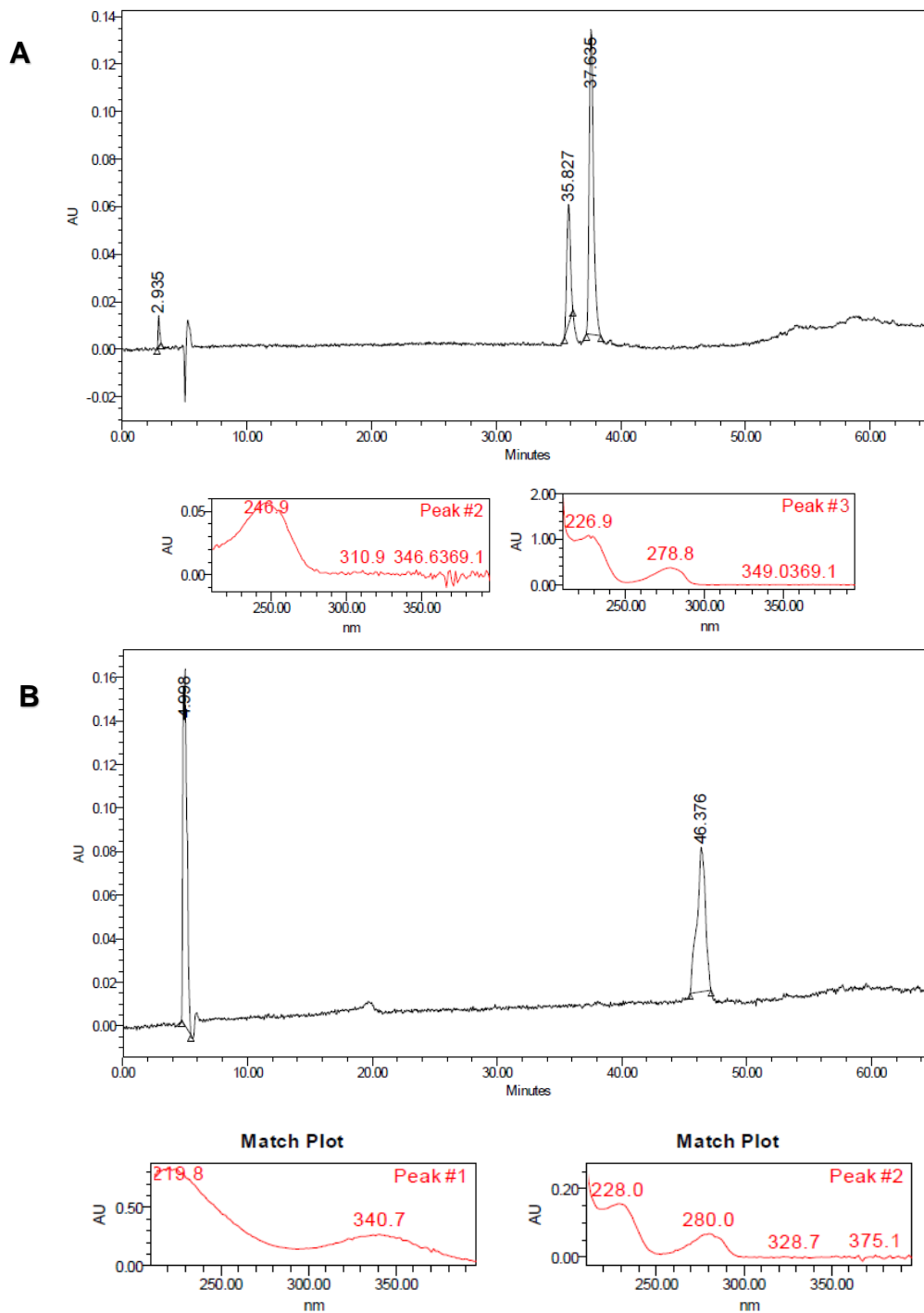


Figura 18. Cromatograma de C1, B) Producto de la hidrólisis de C1 con HCl 12 N a 100°C, así como sus espectros de absorción. Longitud de onda de lectura 254 nm.

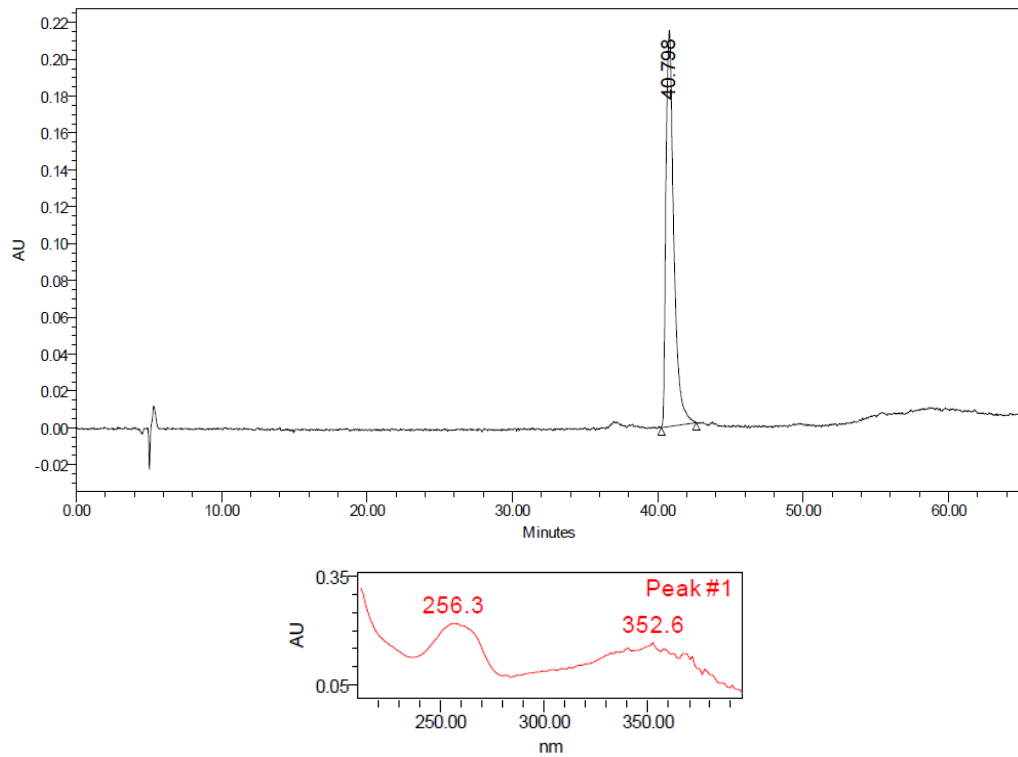


Figura 19. Cromatograma de C2 y espectro de absorción. Longitud de onda de lectura 254 nm.

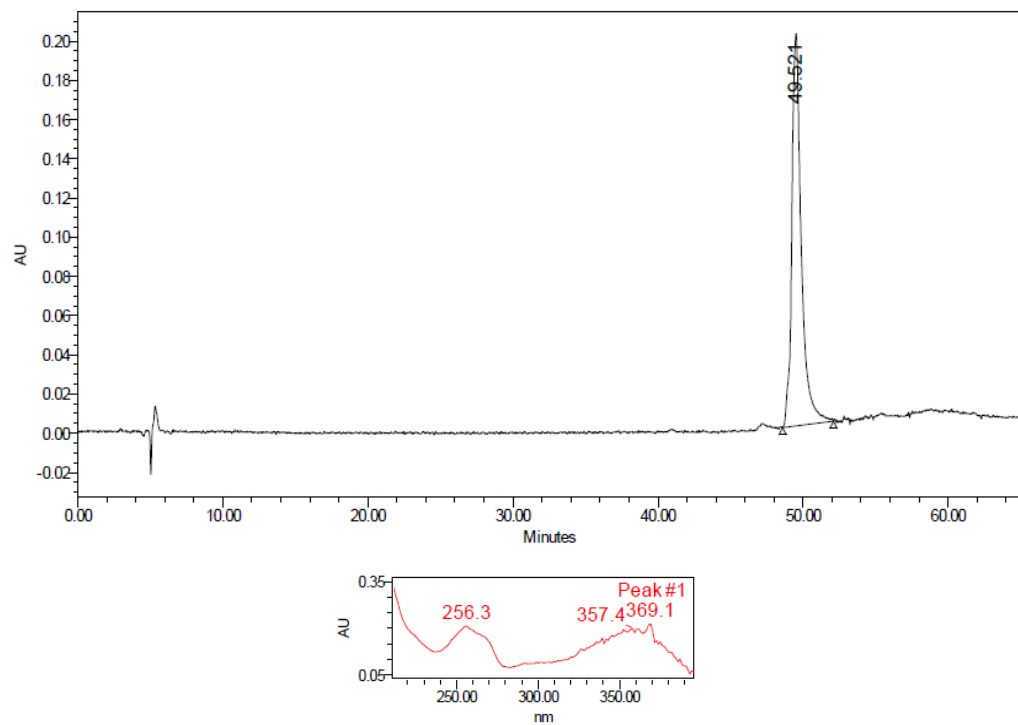


Figura 20. Cromatograma de C3 y espectro de absorción. Longitud de onda de lectura 254 nm.

4.8 Análisis estructural de los compuestos aislados.

Se obtuvieron espectros $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, DEPT 90 y 135, COSY, HMBC y HSQC correspondientes a C1, los cuales se muestran en las figuras 21-26.

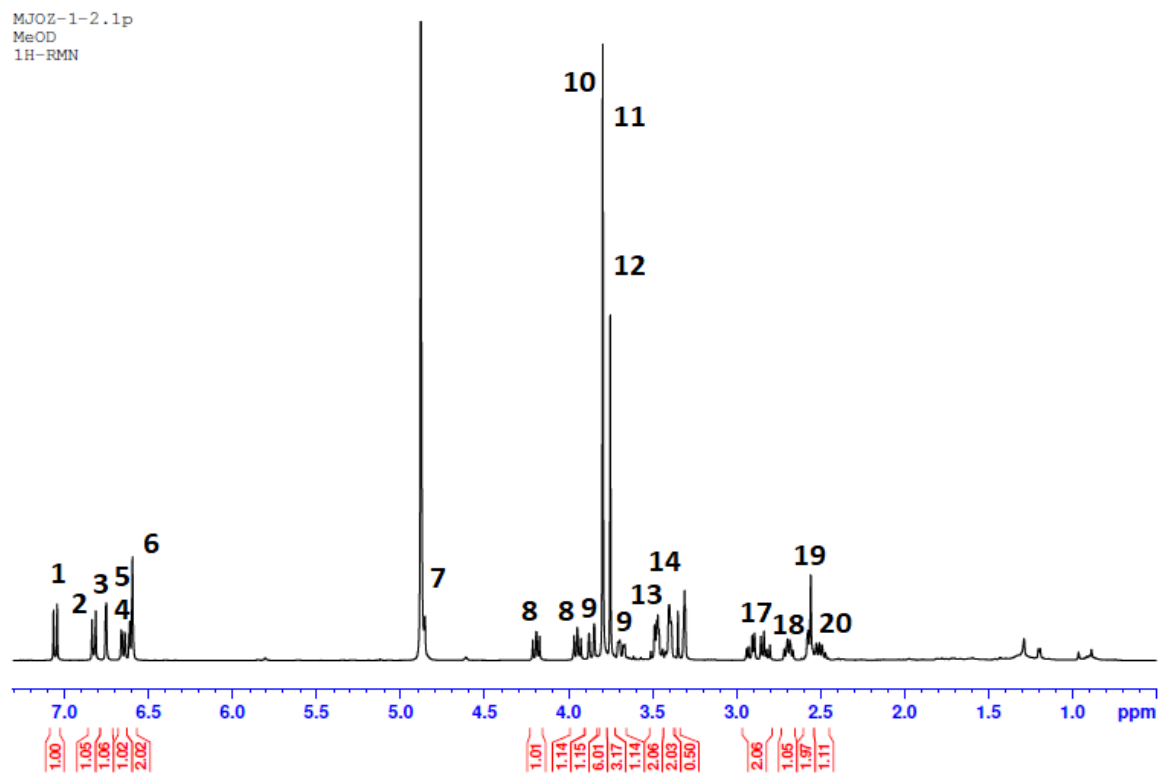


Figura 21. $^1\text{HRMN}$ del compuesto C1 en MeOD.

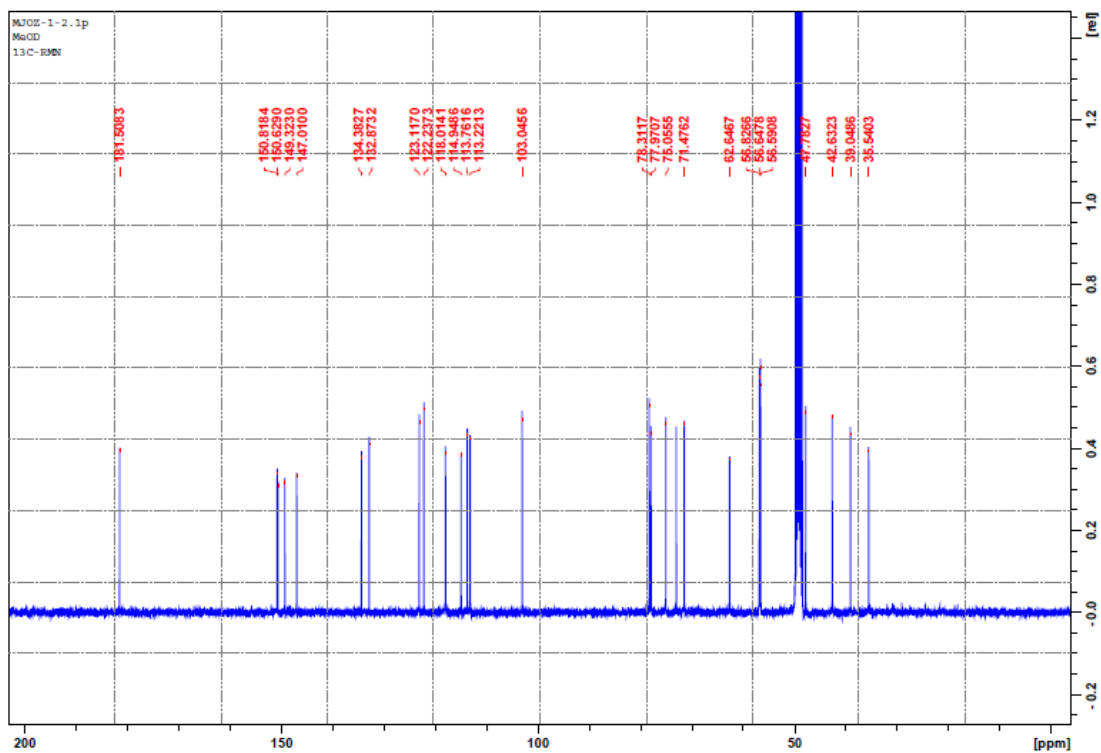


Figura 22. ^{13}C CRMN del compuesto C1 en MeOD.

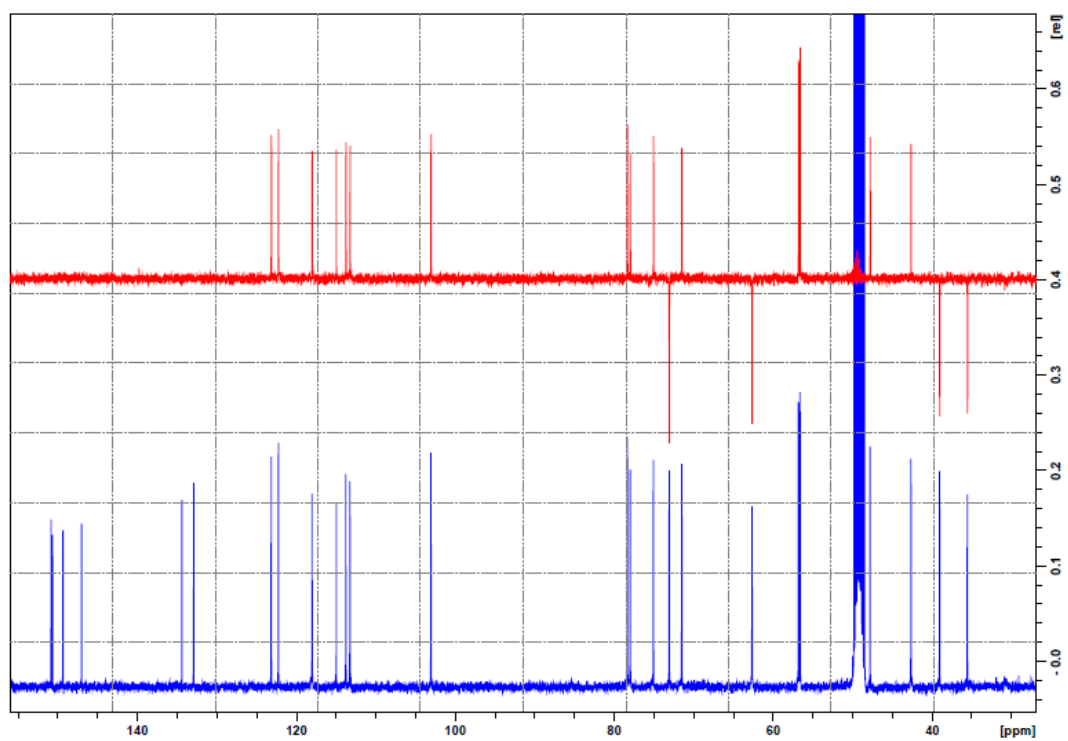


Figura 23. DEPT 135 vs ^{13}C CRMN del compuesto C1 en MeOD.

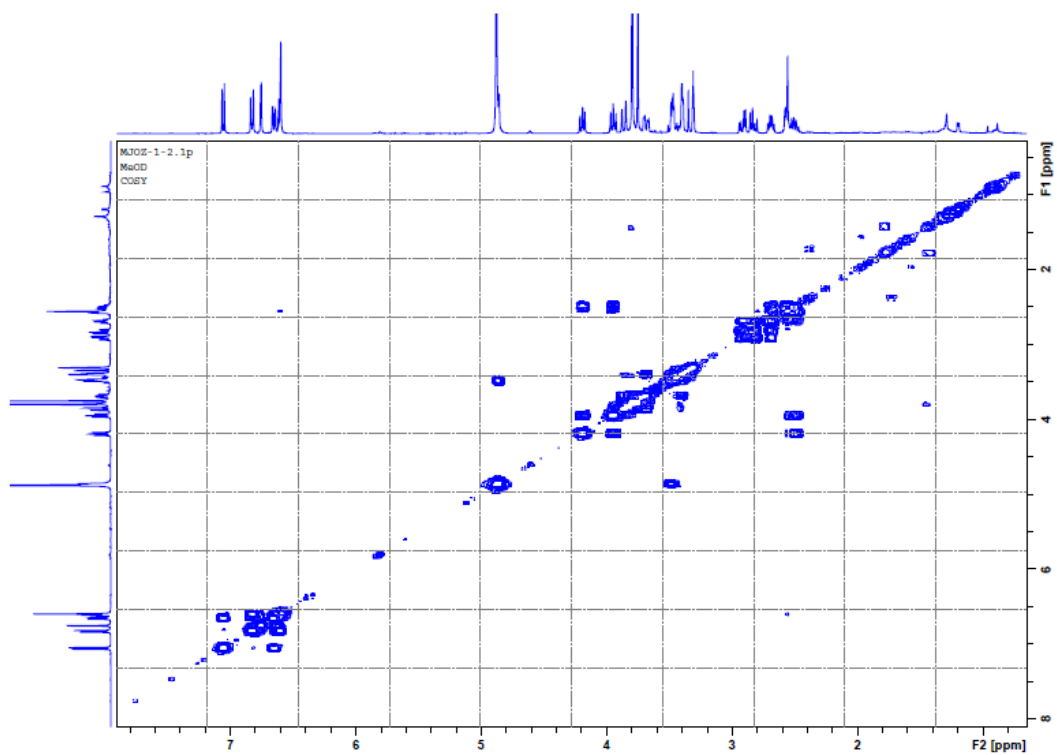


Figura 24. COSY del compuesto C1 en MeOD.

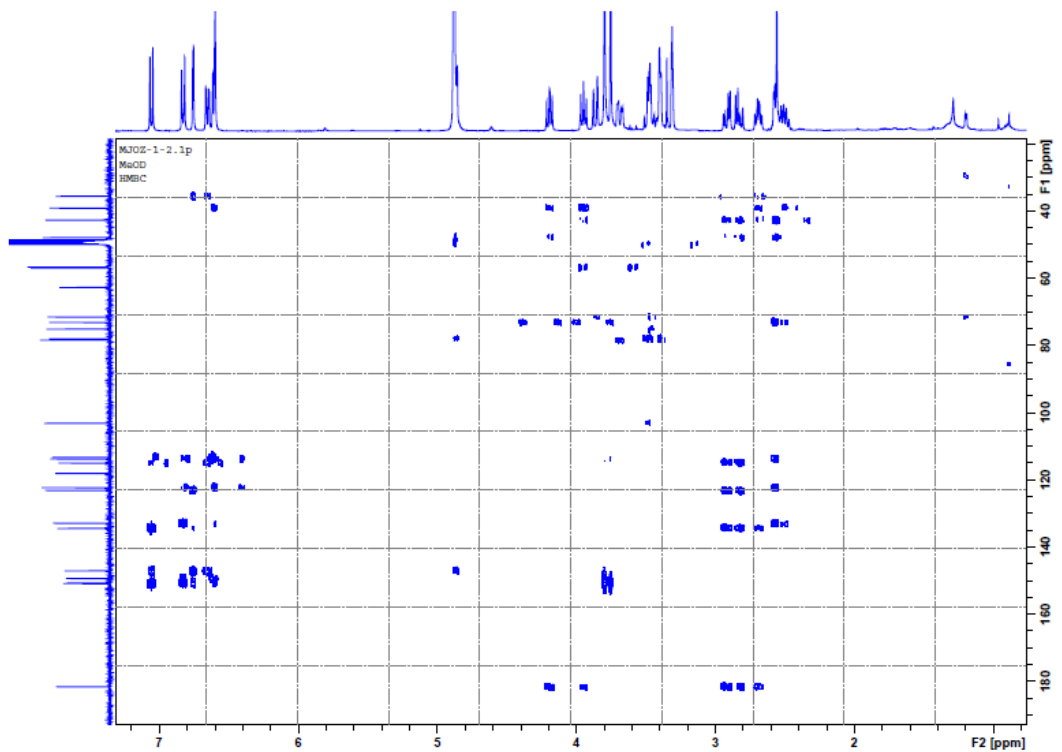


Figura 25. HMBC del compuesto C1 en MeOD.

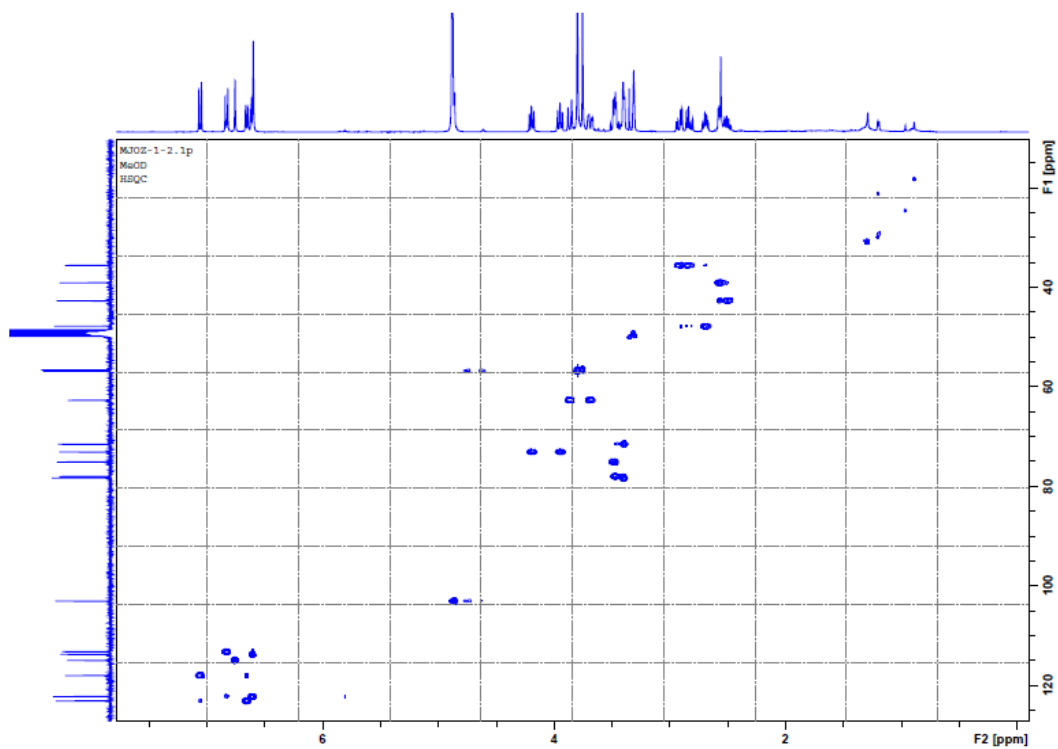


Figura 26. HSQC del compuesto C1 en MeOD.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de C1.

$^1\text{HRMN}$			$^{13}\text{CRMN}$	
# (^1H)	Integración	δ (ppm)	# (^{13}C)	δ (ppm)
-	-	-	1	181.5
-	-	-	2	150.8
-	-	-	3	150.62
-	-	-	4	149.32
-	-	-	5	147.01
-	-	-	6	134.38
-	-	-	7	132.87
4	1	6.65	8	123.11
5	1	6.60	9	122.23
1	1	7.05	10	118.01
3	1	6.75	11	114.94
6	1	6.60	12	113.76
2	1	6.82	13	113.22
7	1	4.86	14	103.04
15	1	3.40	15	78.31
14	1	3.47	16	77.97
13	1	3.47	17	75.05
8	2	4.06	18	73.05
16	1	3.39	19	71.47
9	2	3.77	20	62.64
11	3	3.79	21	56.82
10	3	3.79	22	56.64
12	3	3.75	23	56.59
18	1	2.69	24	47.78
20	1	2.56	25	42.63
19	2	2.50	26	39.04
17	2	2.87	27	35.54

Se obtuvieron los espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN, DEPT 135 y 90, COSY, HMBC y HSQC correspondientes al compuesto C2, los cuales se muestran en las figuras 27-32. En la tabla 8 se pueden observar las correlaciones ^1H - ^1H y ^1H - ^{13}C .

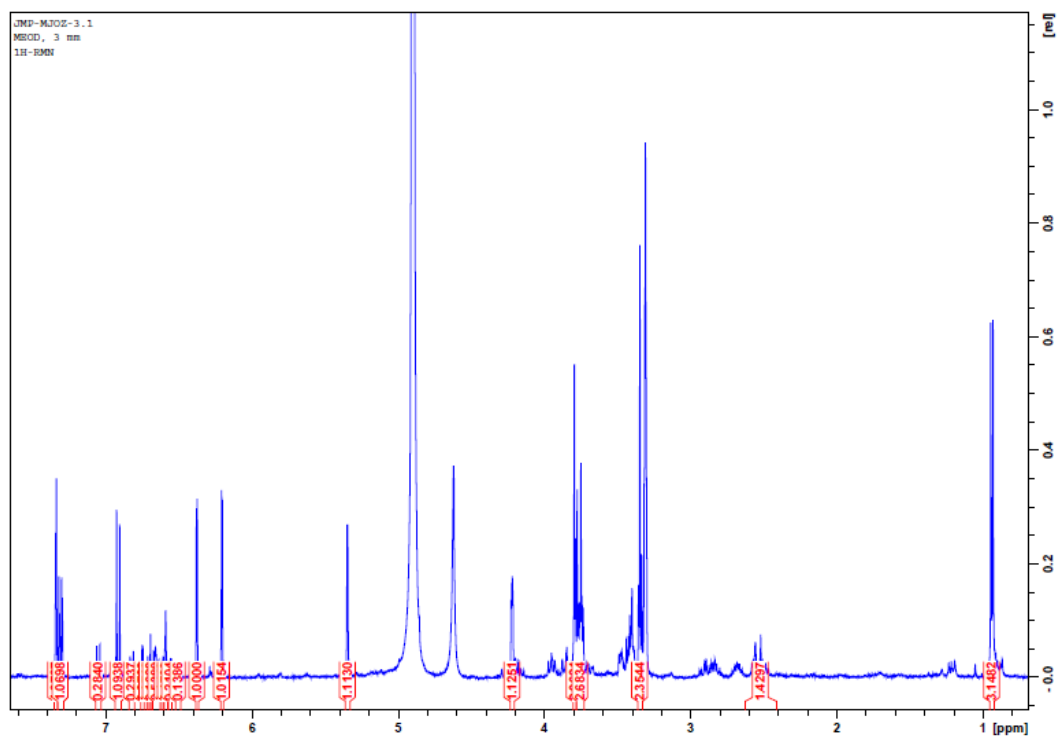


Figura 27. ^1H RMN del compuesto C2 en MeOD.

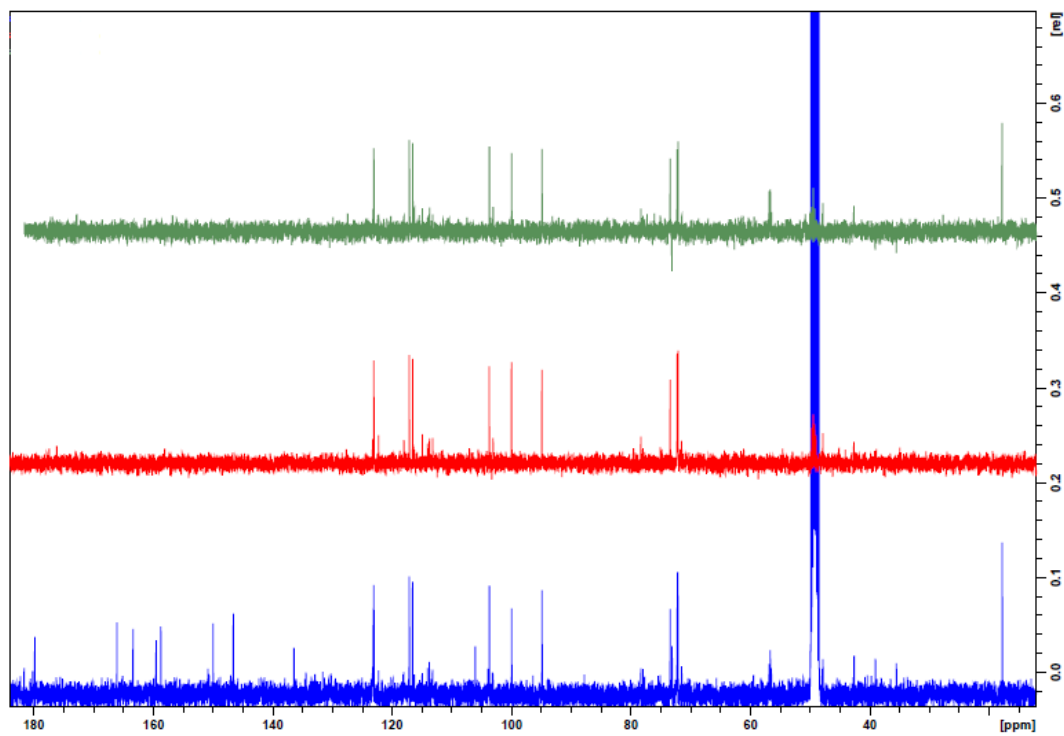


Figura 28. ^{13}C RMN vs DEPTS 90 y 135 del compuesto C2 en MeOD.

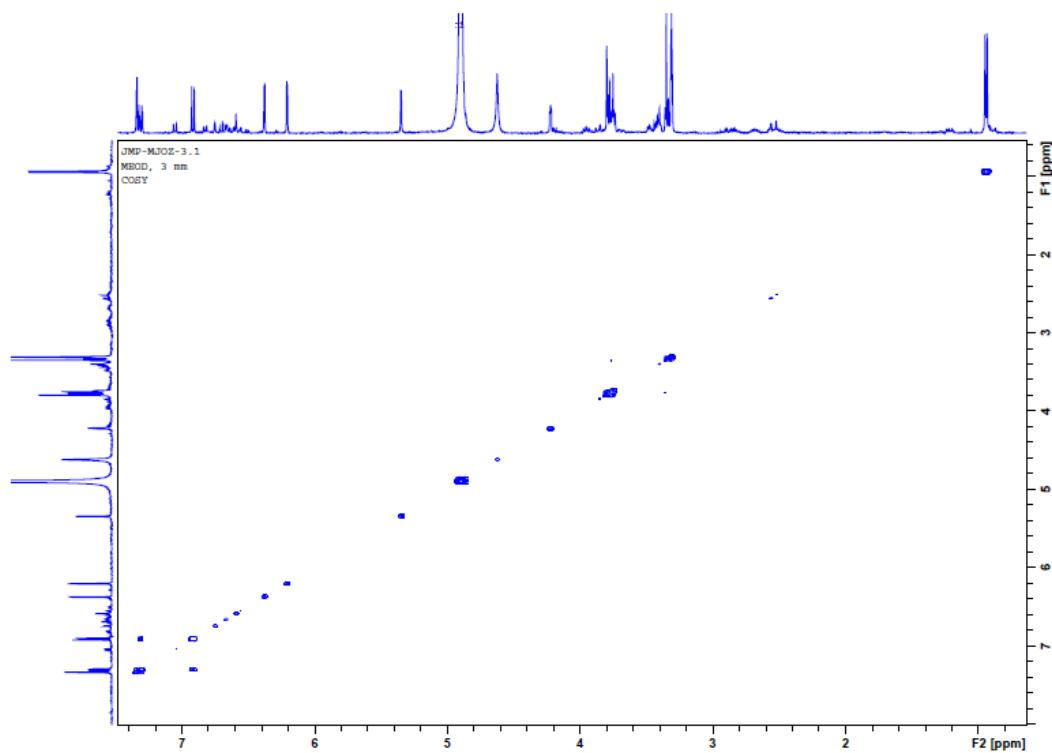


Figura 29. COSY del compuesto C2 en MeOD.

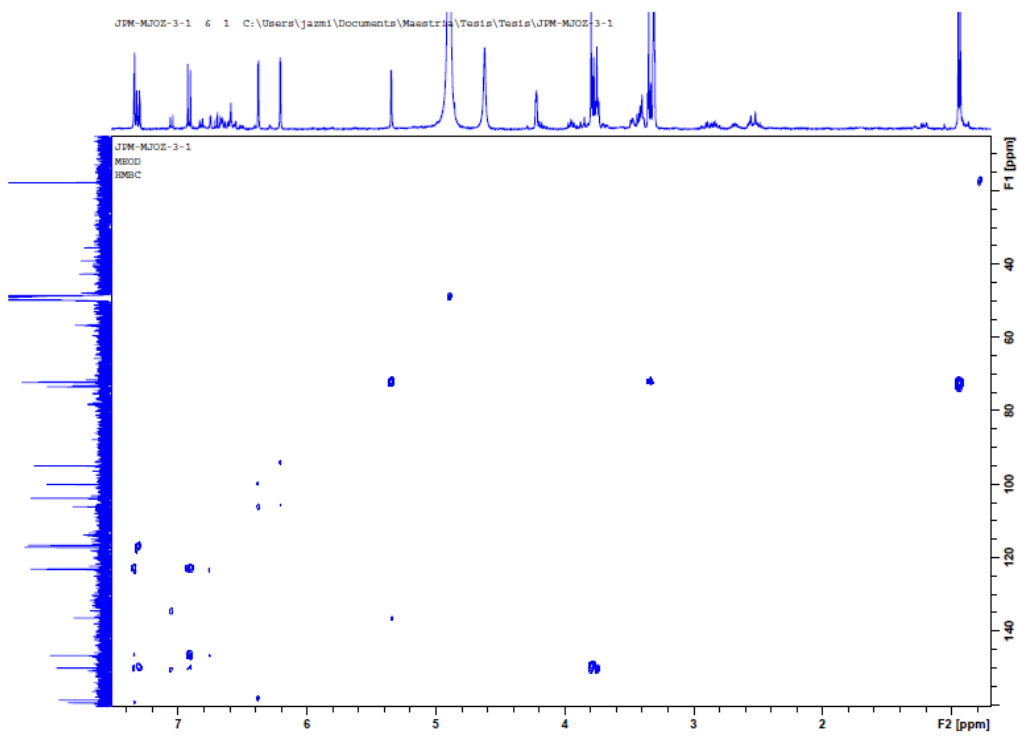


Figura 30. HMBC del compuesto C2 en MeOD.

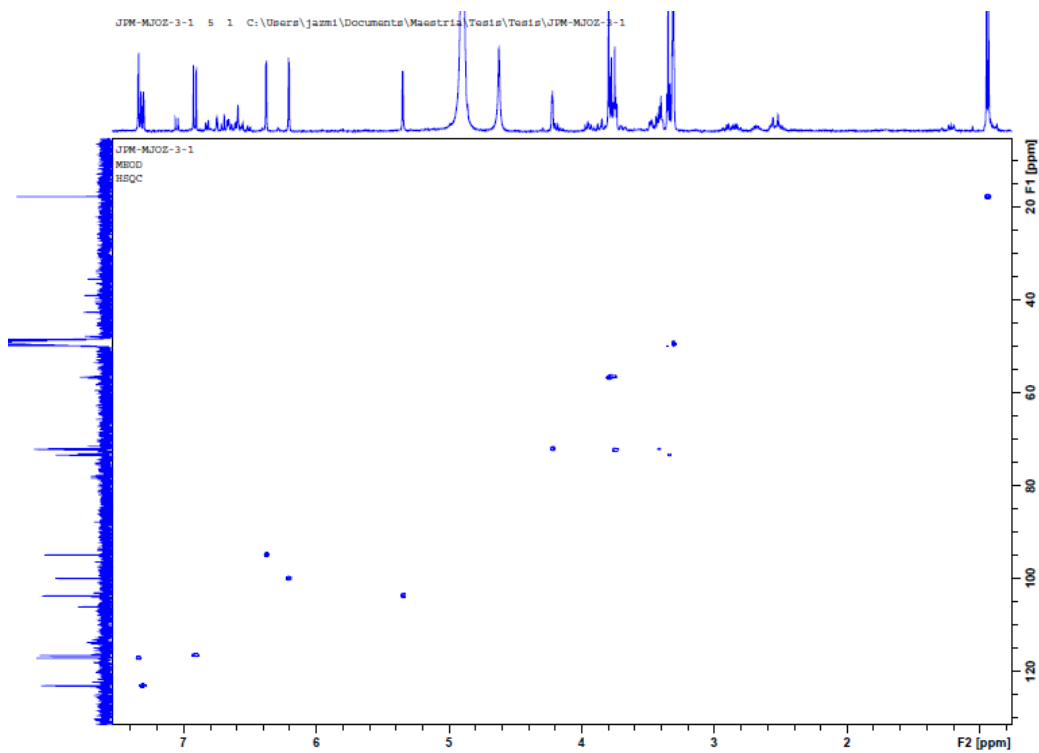


Figura 31. HSQC del compuesto C2 en MeOD.

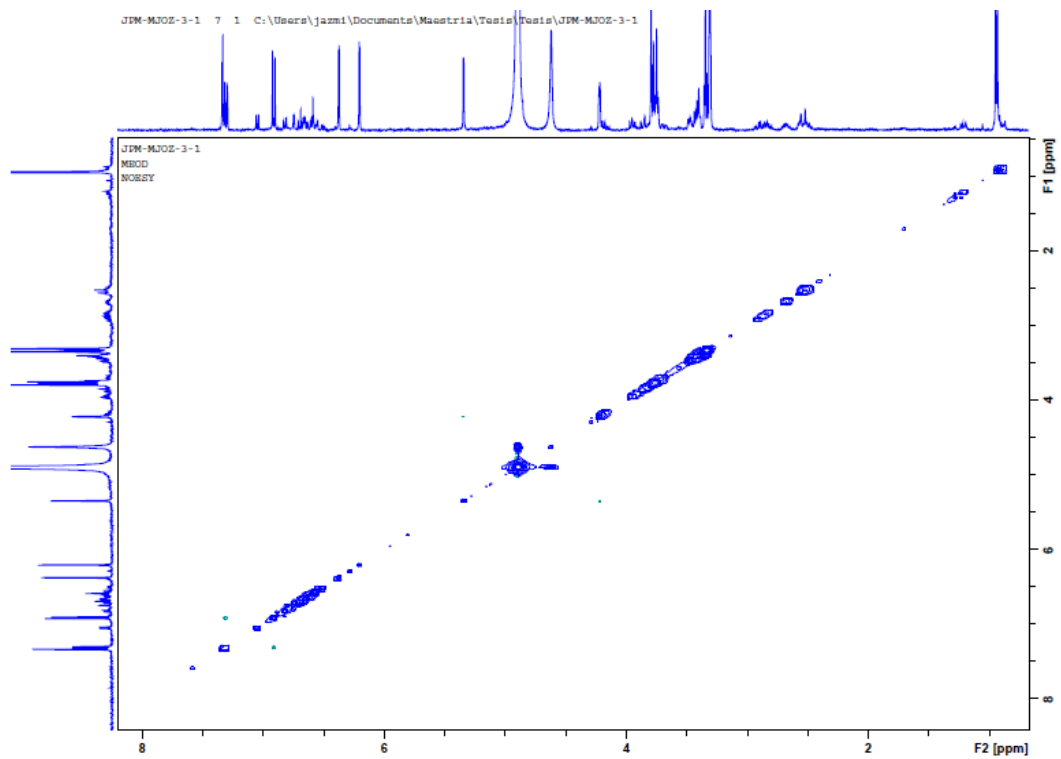


Figura 32. NOESY del compuesto C2 en MeOD.

Tabla 8. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del compuesto C2.

#	$^1\text{HRMN}$	$^{13}\text{CRMN}$
-	-	179.83
-	-	166.04
-	-	163.37
-	-	159.51
-	-	158.67
-	-	149.96
-	-	146.58
-	-	136.40
-	-	123.22
2	7.41	123.13
1	7.45	117.20
3	7.03	116.64
-	-	106.06
6	5.44	103.75
5	6.32	100.06
4	6.50	94.99
9	3.44	72.05
10	3.44	73.39
8	3.86	72.25
7	4.33	73.22
11	1.04	17.82

Se obtuvieron los espectros de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, DEPT 90 y 135, COSY, HMBC y HSQC correspondientes a la mezcla de C3 y C4, los cuales se muestran en las figuras 33-38. En la tabla 9 se pueden observar las correlaciones ^1H - ^1H y ^1H - ^{13}C .

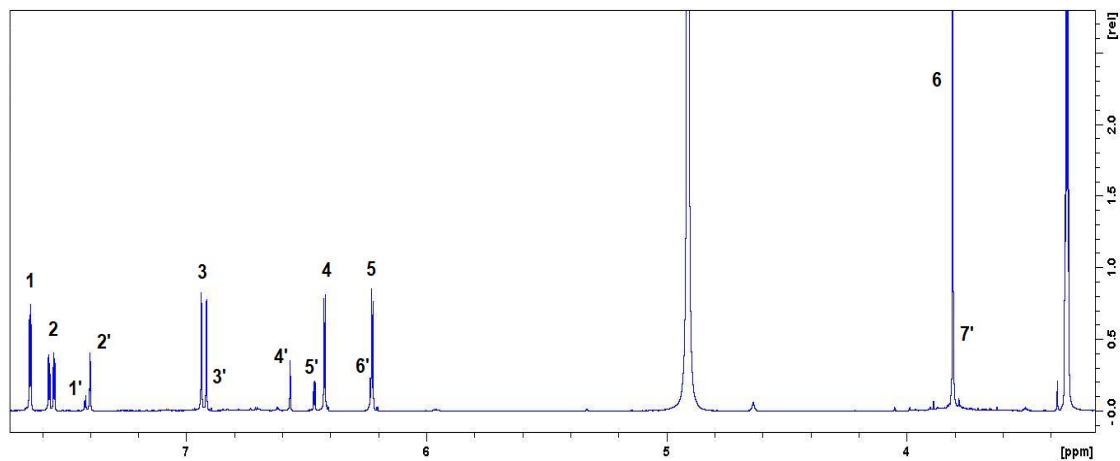


Figura 33. ¹H RMN del compuesto C3 y C4 en MeOD.

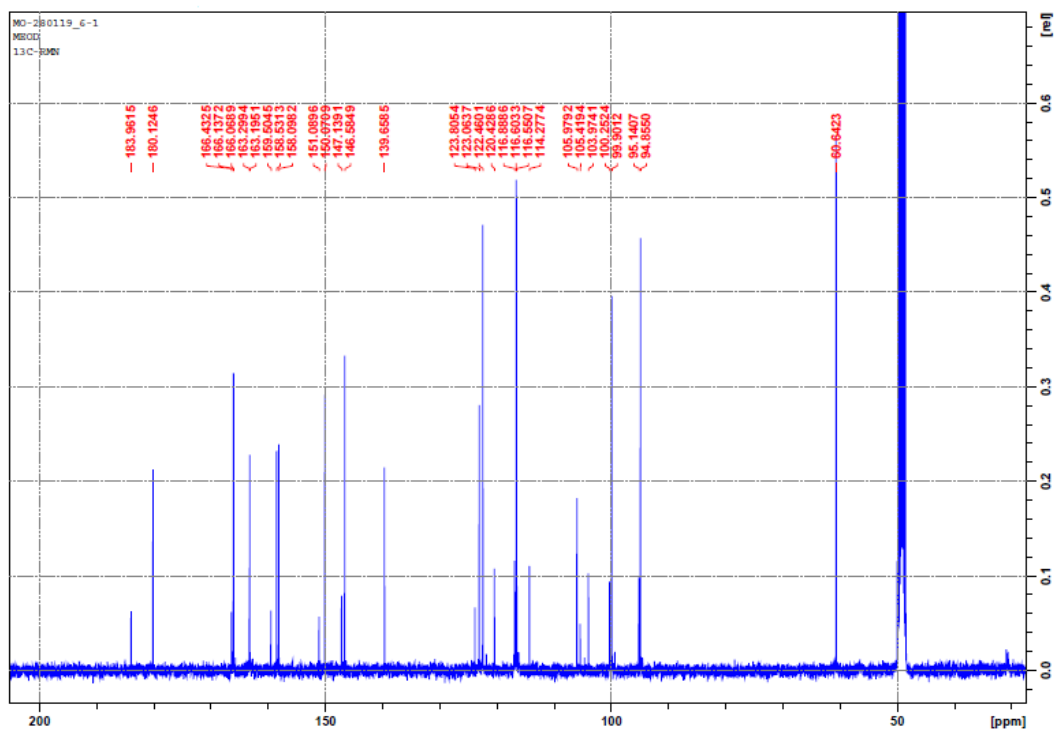


Figura 34. ¹³C RMN del compuesto C3 en MeOD.

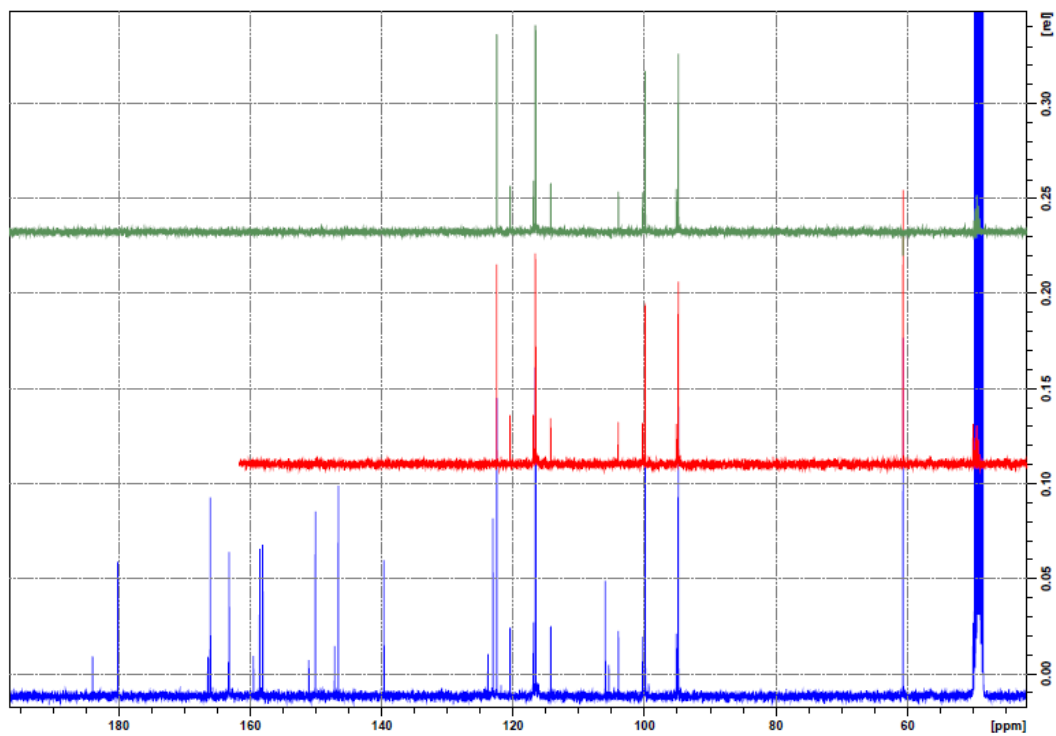


Figura 35. DEPT 135 vs ^{13}C RMN del compuesto C3 en MeOD.

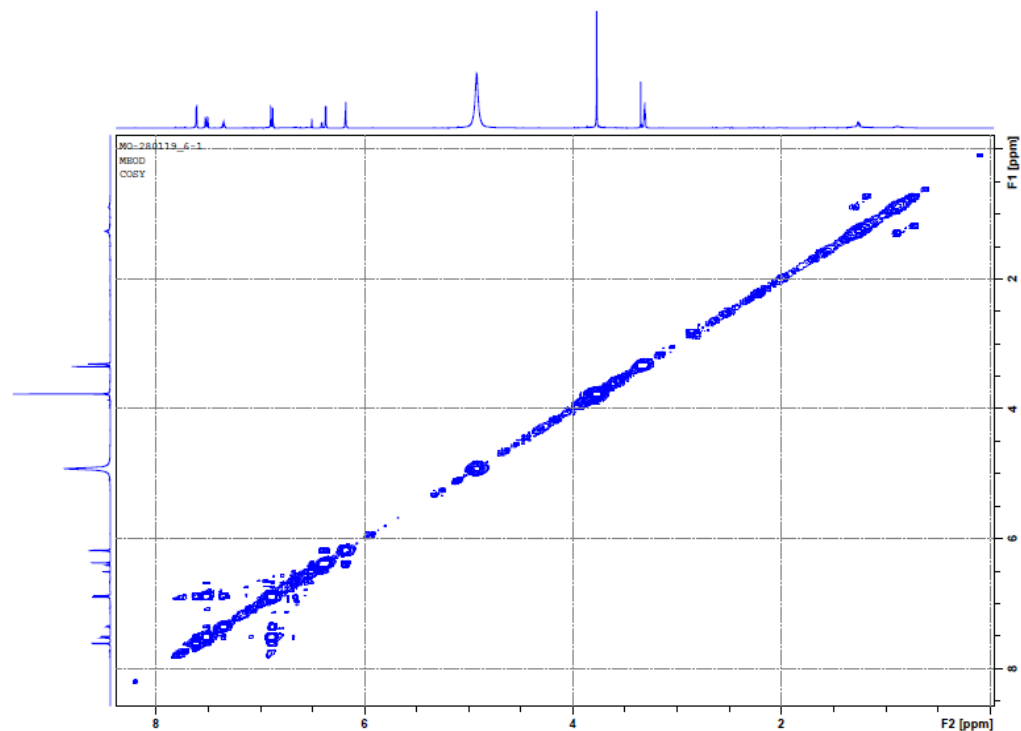


Figura 36. COSY del compuesto C3 en MeOD.

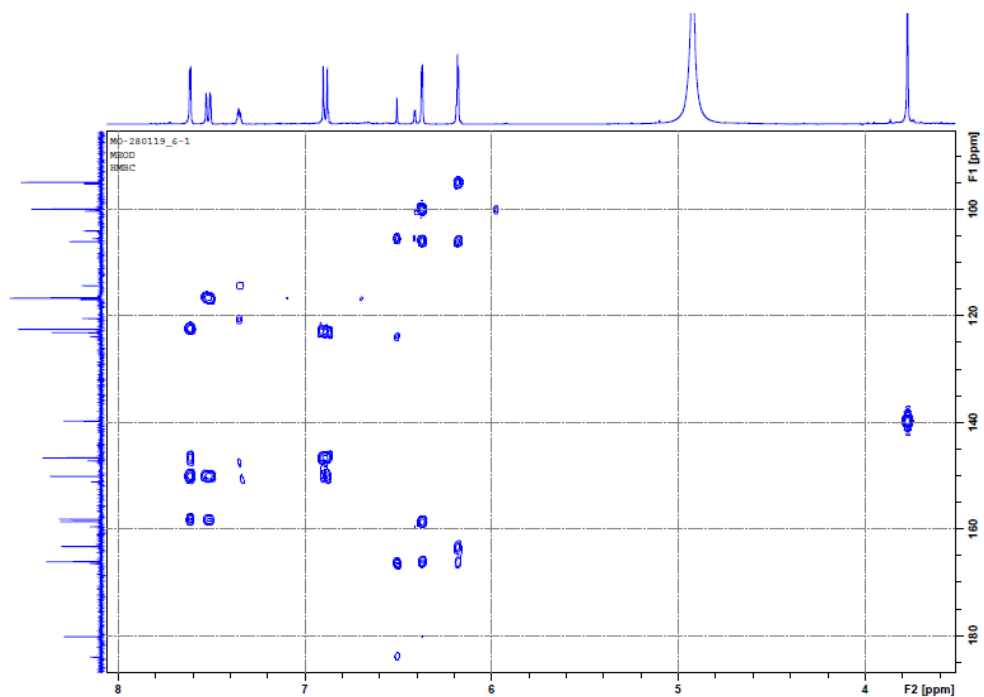


Figura 37. HMBC del compuesto C3 en MeOD.

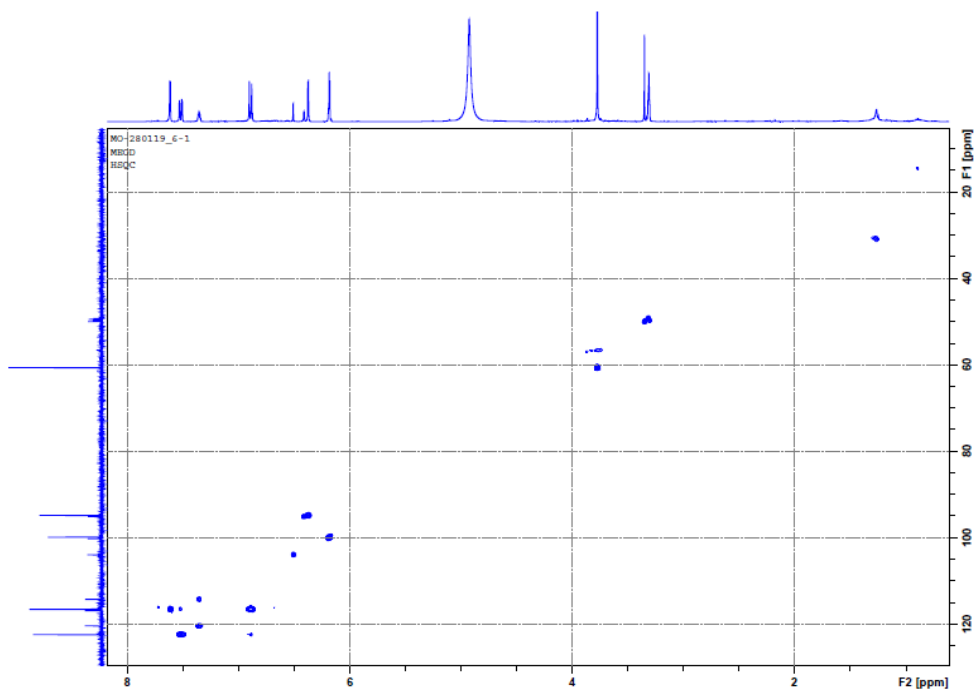


Figura 38. HSQC del compuesto C3 en MeOD.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del compuesto C3.

#	$^1\text{HRMN}$ (ppm)	$^{13}\text{CRMN}$ (ppm)
-	-	180.17
-	-	166.09
-	-	163.22
-	-	158.55
-	-	158.11
-	-	150.08
-	-	146.60
-	-	139.68
-	-	123.08
1	7.517	122.48
2	7.614	116.62
3	6.890	116.56
-	-	106.00
4	6.179	99.91
5	6.371	94.86
6	3.775	60.65

Tabla 10. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del compuesto C4.

#	$^1\text{HRMN}$ (ppm)	$^{13}\text{CRMN}$ (ppm)
-	-	182.4
-	-	164.9
-	-	164.5
-	-	161.7
-	-	157.9
-	-	149.5
-	-	145.6
-	-	122.2
1	7.407	118.9
3	6.923	115.3
2	7.396	112.7
-	-	103.9
4	6.563	102.4
6	6.228	98.7
5	6.462	93.6
7	3.847	59.1

4.9 Citotoxicidad y actividad antioxidante y hepatoprotectora de los compuestos aislados.

La citotoxicidad de los compuestos aislados se puede observar en la tabla 10, donde C1 y C2 no fueron tóxicos dentro del intervalo evaluado, a diferencia de la mezcla de C3/C4 donde se observó una CC_{50} de alrededor de 301 $\mu\text{g/mL}$. Así también, la actividad antioxidante se puede apreciar en la tabla 10, donde C2 y C3/C4 presentaron buena actividad comparado con el control de

quercetina. Sin embargo, C1 no redujo el DPPH a la concentración máxima probada (125µg/mL).

Tabla 11. Citotoxicidad y actividad antioxidante de los compuestos aislados de *Centaurea americana*.

Compuestos	CR ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)
Quercetina	6.19 ± 0.07	-
CCl ₄	-	0.24
C1	>125	>1000
C2	16.42 ± 0.46	>1000
C3/C4	7.64 ± 0.16	301.10 ± 74.19

Por otra parte, en la figura 39 se muestra la actividad hepatoprotectora de los compuestos aislados. Se observa que los compuestos presentaron una relación dosis-respuesta, donde a menor concentración menor es la actividad. Solo por encima de 100 µg/mL los compuestos presentaron diferencia significativamente con respecto al control de daño. El compuesto que presentó mayor actividad de todos los compuestos aislados fue C1.

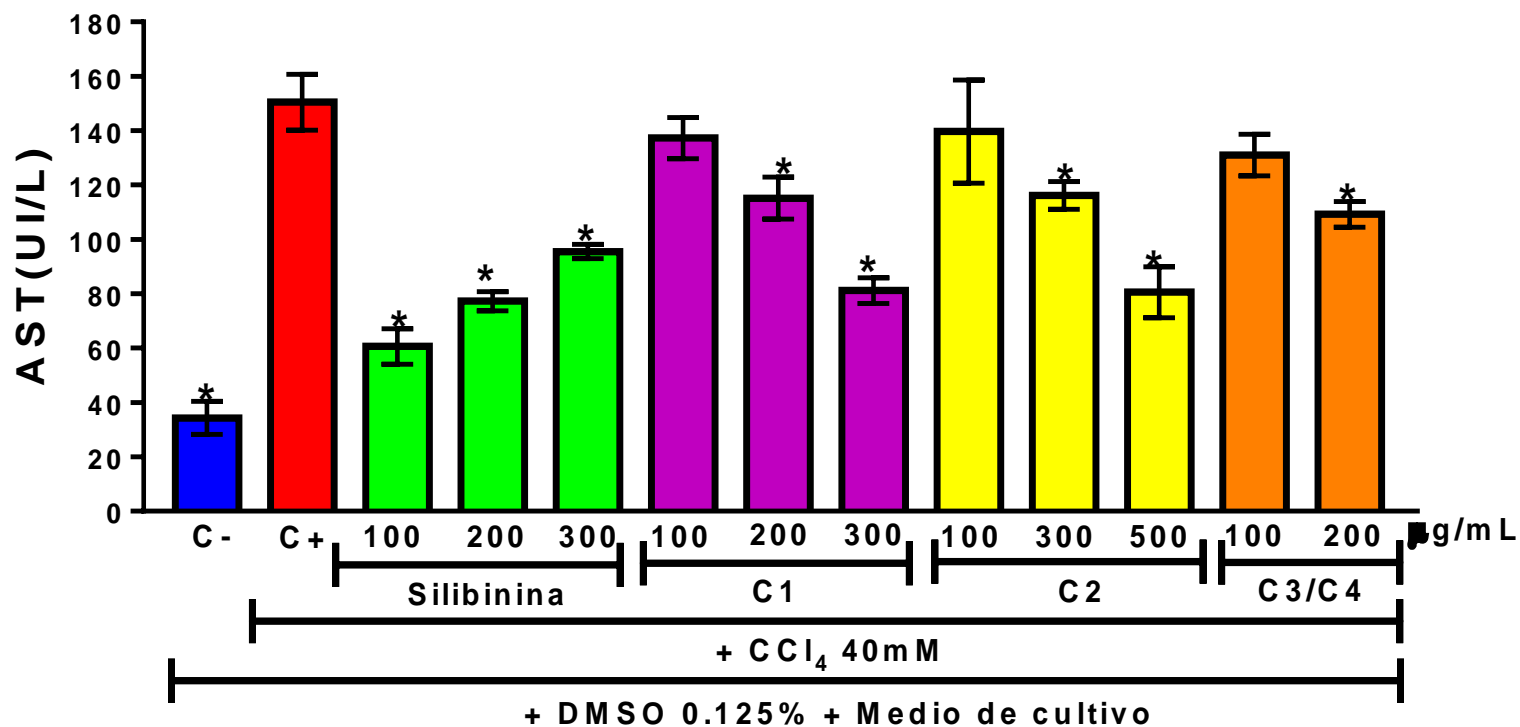


Figura 39. Gráfica de la actividad hepatoprotectora de los compuestos aislados y la Silibinina en células HepG2 con daño inducido con CCl₄. Control positivo (C+): Medio D-MEM Sup. + CCl₄, Control negativo (-): Medio D-MEM sup.

*P<0.001 en comparación con el C+. ANOVA de un factor.

4 DISCUSIÓN

La cirrosis es la etapa final de progresión de la enfermedad hepática crónica. En el 2016, la cirrosis hepática fue la cuarta causa de muerte en México. Particularmente, en el grupo de población económicamente activa de edad entre 35 y 55 años, fue la segunda causa principal de muerte (INEGI, 2018). De acuerdo a la tendencia en la prevalencia de estas enfermedades se estima que en los siguientes años seguirán siendo un problema de morbi-mortalidad, asociado al incremento de factores de riesgo como obesidad y alcoholismo (Méndez-Sánchez N, 2005; Kershenobich D, 2011). Los tratamientos actuales de las enfermedades hepáticas son diversos y no reducen uno de los principales eventos patogénicos de daño, el cual es el estrés oxidativo (Cesaratto L, 2004); debido a esto es relevante buscar alternativas de profilaxis para estas enfermedades. Los productos naturales, en particular los extractos de plantas, son una importante fuente para la obtención de potenciales agentes hepatoprotectores, ya que contienen una variedad de moléculas bioactivas con capacidad antioxidante (G. Li & Lou, 2018). De interés especial en este estudio son aquellas moléculas con capacidad de reducir el estrés oxidativo, el cual se relaciona con la actividad hepatoprotectora.

En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha reportado que del extracto crudo de la flor de *C. americana* se pudieran aislar moléculas para disminuir el estrés oxidativo, debido a su actividad antioxidante (Salazar & cols, 2008) y

hepatoprotectora (Torres-González & cols., 2011); así también Torres-González (2017) reportó que el extracto crudo de esta planta no era citotóxico y presentaba actividad hepatoprotectora en un intervalo de 10-1000 µg/mL. Por todo lo anterior, se decidió utilizar el extracto crudo de la flor de *C. americana* para aislar moléculas con potencial actividad hepatoprotectora. Los porcentajes de recuperación obtenidos del extracto crudo de *C. americana* en este trabajo fueron similares a los reportados anteriormente por Torres-González (2017).

El uso de métodos tradicionales como la extracción líquido-líquido, permiten producir fracciones con polaridad baja, media o alta. Los disolventes mayormente utilizados de menor a mayor polaridad son hexano, acetato de etilo, butanol y agua; esta alternativa permite obtener fracciones con un menor número de compuestos (Ebada y cols, 2008; G. Li & Lou, 2018). Por este motivo, en este trabajo se utilizó esta técnica de extracción diferencial con disolventes de diferentes polaridades. Se obtuvieron los porcentajes de recuperación que se presentan en la tabla 4; se observa que el extracto con mayor porcentaje de recuperación fue el de acetato de etilo, lo cual concuerda con lo reportado por Yirtici y cols. (2017) para *Centaurea fenzlii* respecto a que los extractos de acetato de etilo y sus combinaciones (acetato de etilo-hexano y acetato de etilo-metanol) presentaron mayor porcentaje de rendimiento.

Por otra parte, se ha demostrado que el aislamiento biodirigido por bioensayos genera información de los extractos o fracciones con respecto a su actividad biológica, y hacerlos a microescala reduce el tiempo de la obtención (Bucar,

Wube, & Schmid, 2013). Un ejemplo de ello es el método de determinación de la actividad antioxidante, el cual ha sido optimizado y validado a microescala por Granados-Guzman & cols. (2017). En el presente estudio se utilizó este método para determinar la actividad antioxidante de los extractos crudo y diferenciales. Los resultados mostraron que el extracto diferencial de acetato de etilo fue el que presentó mayor actividad antioxidante, seguido del extracto butanólico y acuoso; mientras que el extracto diferencial hexánico, no presentó actividad. Estos resultados fueron similares a los reportados por Azzouzi y cols. (2016) para *Centaurea choulettiana*.

Con respecto a la actividad hepatoprotectora, en la tesis doctoral de Torres-González (2017) se estableció el método para su evaluación en células HepG2. Siguiendo esta metodología se utilizó como inductor de daño el CCl₄ y como marcador de daño la AST. Para llevar a cabo los bioensayos, en primer instancia se determinó el número óptimo de células a usar; para lo cual se incubaron entre 2,500 a 100,000 células por pozo. La ATTC (2011) indica que el número de células a usar en el bioensayo disminuye la densidad óptica en un intervalo lineal de entre 0.75 y 1.25. Así mismo, Van de Loosdrecht y cols. (1994) reportan que en células de leucemia humana hay una excelente linealidad cuando se utilizan más de 50 000 células por pozo para el ensayo de MTT. En este estudio se observó que con 60,000 células por pozo se mantenía la linealidad y la densidad óptica, por lo que se decidió utilizar esta cantidad de células por pozo para el ensayo de citotoxicidad.

En segunda instancia, se evaluó la cantidad mínima requerida de DMSO para favorecer la solubilidad de los extractos en medio de cultivo sin afectar la viabilidad de las células utilizadas; ya que se ha probado que este compuesto tiene un efecto citotóxico a concentraciones elevadas (Miret & cols., 2006). Song & cols. (2012) evaluaron la citotoxicidad del DMSO en un intervalo de 0.005 a 5.0 % y reportaron que a una concentración de 0.1% todavía se mantenía la viabilidad celular al 100%, por lo que en este trabajo se probó un intervalo de 0.125 a 5% de DMSO. Lo anterior dio como resultado que a una concentración de 0.125% no había diferencia significativa respecto al control negativo (Figura 7), por lo que se decidió utilizar 0.125% de DMSO como disolvente.

Por otra parte, como ya se mencionó existe evidencia de la relación entre la actividad antioxidante y hepatoprotectora (Huang y cols., 2018). Respecto a la actividad hepatoprotectora, en el presente estudio el extracto de acetato de etilo fue el que mostro la mayor actividad al reducir significativamente los niveles de AST liberados al medio de cultivo en comparación con CCl₄, seguido del butanólico y acuoso. Previa investigación han reportado la relación entre la actividad antioxidante y hepatoprotectora (referencias, mas de una). Estos reportes concuerdan con la actividad que mostró el extracto de acetato de etilo, el cual presentó la mayor actividad antioxidante y niveles de AST bajos. Por esta razón se optó por elegir este extracto para seguir con el aislamiento biodirigido.

Del aislamiento del extracto de aceto de etilo se obtuvieron primeramente siete fracciones, de las cuales se eligieron las fracciones 1, 3 y 6 ya que estas presentaban compuestos mayoritarios con actividad antioxidante.

La fracción 1 se sometió a una separación cromatografica de la cual se obtuvieron dos subfracciones denominadas 1.1 y 1.2 (Figura 9), las cuales presentaron un componente mayoritario con actividad antioxidante. Se decidió continuar el aislamiento con la fracción 1.2 debido a que presentaba menor cantidad de componentes. Para evitar la pérdida de muestra durante el aislameinto subsecuente, se decidió trabajar con una columna cromatográfica de exclusión molecular emapacada con Sephadex LH-20 como fase estacionaria. De acuerdo a la literatura, en este tipo de columna la separación se da por efectos de exclusión por tamaño molecular y no por interacciones específicas como dipolo-dipolo, puente de hidrógeno o mecanismos de transferencia de carga; lo cual reduce drásticamente la pérdida de muestra durante la elución (Quattrocchi, De-andrizzi, & Laba, 1992). Como resultado de la separación de la subfracción 1.2 utilizando Sephadex LH-20 se obtuvo un compuesto aislado en la fracción 1 (como se muestra en la figura 10) el cual no mostró actividad antioxidante al ser revelado con DPPH. Sin embargo, se decidió evaluar la actividad hepatoprotectora al compuesto, por lo que a partir de la fracción 1 se obtuvo el primer compuesto aislado (C1).

Respecto a la fracción 3, esta fue sometida a diversas separaciones cromatográficas utilizando diferentes fases estacionarias y moviles, sin embargo no se logró la separación del componente mayoritario con actividad

antioxidante. A pesar de lo anterior, transcurrido un tiempo, se observó la precipitación espontánea de sólidos amorfos de color amarillo (Figura 11 A) que al eluirse en CCF de silica gel y revelado con DPPH 2 mg/mL resultó ser un compuesto aparentemente aislado con actividad antioxidante (Figura 11 B y C). Este fue el segundo compuesto obtenido (C2).

Antes de continuar con el aislamiento de la fracción 6 se debe mencionar que las fracciones 5 y 7 fueron una opción para el aislamiento. Como se puede observar en la figura 12A, B, C y D, las tres fracciones presentaban diferentes compuestos. También se puede ver en la figura 12D que la fase móvil de acetato de etilo: acetona 8:2 separó mejor los compuestos de las tres fracciones, sin embargo no se continuó el aislamiento con las fracciones 5 y 7 por dos razones: 1) la cantidad de muestra no era suficiente y 2) la fracción 7 presentaba compuestos difíciles de separar. Por todo lo anterior es que se decidió continuar el aislamiento con la fracción 6; para lo cual se trabajó con un sistema de elución acetato de etilo: acetona 8:2. Esto dio como resultado un componente aparentemente aislado (Figura 13) que al ser eluido nuevamente con tolueno:acetona 1:1 presentó una sola banda, correspondiente al tercer compuesto aislado (C3) con actividad antioxidante (figura 13 B y C).

Para la elucidación estructural de C1 se realizó un análisis detallado de las señales y correlaciones de los diferentes experimentos realizados por RMN (tabla 7 y 12); estos análisis dieron como resultado la estructura correspondiente de un glicósido lignano. En el espectro de ^{13}C RMN se puede

observar una señal a campo bajo perteneciente a C-1=181.5 ppm, para un carbono cuaternario perteneciente al carbono carbonílico de la lactona. Los carbonos C2=150.8 ppm, C-3=150.62 ppm, C-4=149.32 ppm, C-5=147.01 ppm, C-6=134.38 ppm, C-7=132.87 ppm, C-8=123.11 ppm, C-9=122.23 ppm, C-10=118.01 ppm, C-11=114.94 ppm, C-12=113.22 ppm y C-13=113.22 ppm corresponden a los dos anillos aromáticos del lignano. Los carbonos C-14=103.04 ppm, C-15=78.31 ppm, C-16=77.97 ppm, C-17=75.05 ppm, C-18=73.05 ppm y C19=71.47 ppm corresponden al glicósido, y los carbonos C-20= 62.64 ppm, C-21= 56.82 ppm, C-22=56.64 ppm, C-23= 56.59 ppm, C-24=47.78 ppm, C-25=42.63 ppm, C-26=39.04 ppm y C-27= 35.54 ppm corresponden a la lactona. Por otra parte, en el espectro de $^1\text{HRMN}$ los protones H-1=7.05 ppm, H-2=6.82 ppm, H-3=6.75 ppm, H-4=6.65 ppm, H-5=6.60 ppm y H-6=6.60 ppm observados a campo bajo pertenecen a los dos anillos aromáticos del lignano y los restantes (H-7=4.86 ppm, H-8=4.06 ppm, H-9=3.77 ppm, H-10=3.79 ppm, H-11=3.79 ppm, H-12=3.75 ppm, H-13=3.47 ppm, H-14=3.47 ppm, H-15=3.40 ppm, H-16=3.39 ppm, H-17=2.87 ppm, H-18=2.69 ppm, H-19=2.50 ppm y H-20=2.56 ppm) pertenecen a protones alifáticos (figura 21). Como se puede observar en la figura 40, los hidrógenos H-2, H-5 y H-6 se encuentran en anillo A del compuesto; distribuidos en meta con una $J_{5,6}=6.6$ Hz; mientras que H-2 y H-6 se acoplan en orto con una $J_{2,8}=8.38$ Hz. De manera similar en el anillo B, H-1 y H-4 se acoplan en orto con una $J=8.38$ Hz mientras que H-3 y H-4 se acoplan en meta con una $J=1.5$ Hz. Cada uno de los anillos aromáticos del lignano se encuentran di-sustituidos; el anillo A con dos grupos metoxilos y el B con un grupo metoxilo y una unidad

de glucosa. Por medio del espectro de HMBC se pudo establecer que C-9 y C-11 se acoplan con C-26 y C-27 respectivamente; los cuales permiten la unión con la lactona. Además H-7 se encuentra correlacionado con C-5 perteneciente al anillo B, por lo que aquí se da la unión del lignano con el glicósido. Del análisis por $^1\text{HMRN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ y las correlaciones por COSY, HMBC y HSQC, se determinó que la porción del azúcar es una glucosa, por todo lo anterior el compuesto elucidado fue la arctiina (figura 40). Las señales de protón obtenidas por Lü & cols. (2016) para la arctiina son similares a las obtenidas en este trabajo con respecto a C1.

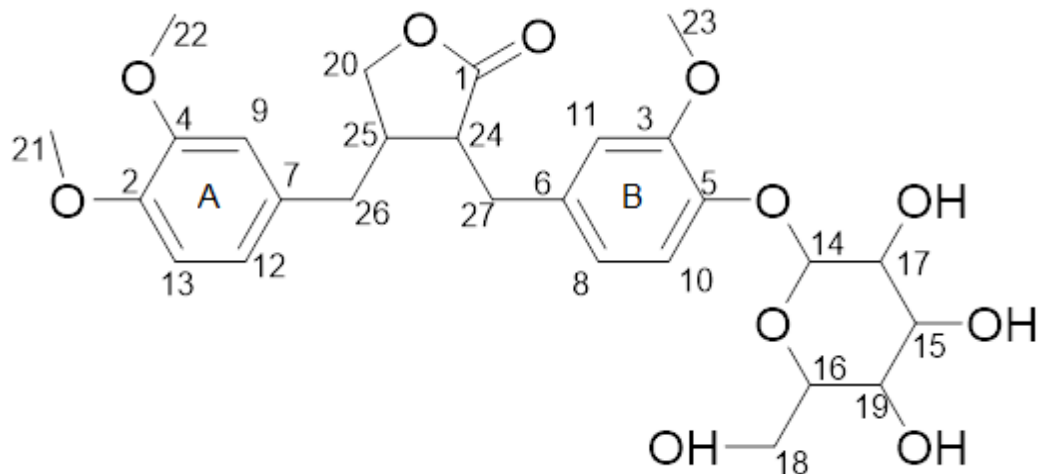


Figura 40. Molécula de Arctiina.

Del análisis por HPLC de la arctiina se pudo observar la presencia de dos señales con tiempo de retención de 35.8 y 37.6 min., también se obtuvieron los espectros de cada señal como se observa en la figura 18. Particularmente el espectro con $\lambda_{\text{máx1}}$: 278.8 y $\lambda_{\text{máx2}}$: 218.6 nm coincide con lo reportado por Shoeb & cols. (2007) para la arctiina. Por otra parte la otra señal, con tiempo de retención de 35.8 min pudo deberse a que el compuesto estaría degradándose o isomerizándose durante la elución en el HPLC. Sin embargo en el espectro de RMN solo se presentaron las señales correspondientes a la arctiina; lo que nos indica que el compuesto únicamente cambiaba al pasar por HPLC. Cabe resaltar que este compuesto ya fue reportado en *Centaurea americana* por Shoeb & cols. (2006).

Tabla 12. Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C1.

#	(^1H)		COSY (^1H - ^1H)	HSQC (^1H - ^{13}C)	HMBC (^1H - ^{13}C)
	Tipo de señal	J (Hz)			
1	d	8.38	4	10	5, 6
2	d	8.38	6	13	4, 7
3	d	1.5	6, 2	11	27, 8, 5
4	dd	8.38, 1.5	3, 1	8	27, 11
5	d	6.6	2	9	26, 13
6	d	6.6	2	12	9, 13, 7, 5
7	d	-	13	14	5
8	ddd	8.2	20	18	26, 25, 24, 1
9	ddt	11.8, $t=2.2$	15, 16, 12	20	15
10	s	-	11	22	4
11	s	-	10	21	2
12	s	-	-	23	3, 18
13	m	-	14, 7	17	16
14	s	-	13, 15, 16	16	19
15	m	-	16, 9	15	15, 16
16	s	-	15	19	15, 16
17	ddd	13.8, 7.2, 5.5	18	27	1, 6, 8, 11, 24, 25
18	td	7.6, 5.5	17, 20	24	26, 25, 6, 1
19	m	-	20	26	25, 24, 18, 12, 9, 7
20	m	-	8	25	26, 18, 7

Por otra parte, se realizó el análisis de las señales de $^{13}\text{CRMN}$ y $^1\text{HRMN}$ para la elucidación de C2; como resultado se obtuvo la estructura de un flavonoide glicosilado. En la figura 28 se pueden observar las señales correspondientes a los carbonos, de las cuales C-2=159.51 ppm, C-3=136.40 ppm, C-4=179.83 ppm, C-5=163.37 ppm, C-6=100.06 ppm, C-7=166.04 ppm, C-8=94.99 ppm, C-9=158.67 ppm, C-10=106.06 ppm, C-1'=123.22 ppm, C-2'=116.64 ppm, C-3'=146.58 ppm, C-4'=149.96 ppm, C-5'=117.20 ppm y C-6'=123.13 ppm pertenecen al flavonol, mientras que C-2''=103.75 ppm, C-3''=72.05 ppm, C-4''=73.39 ppm, C-5''=72.25 ppm y C-6''=73.22 ppm pertenecen a la ramnosa. En la figura 27 se pueden observar las señales de los protones, de las cuales H-1=7.45 ppm, H-2=7.41 ppm, H-3=7.03 ppm, H-4=6.50 ppm, H-5=6.32 ppm pertenecen al flavonol y H-6=5.44 ppm, H-7=4.33 ppm, H-8=3.86 ppm, H-9=3.44 ppm, H-10=3.44 ppm, H-11=1.04 ppm a la ramnosa. De los cinco protones, dos pertenecen al anillo A del flavonol y 3 al anillo B. El anillo A presenta una distribución de H-4 y H-5 en meta con una $J_{4,5}=2.12$ Hz, mientras que en el anillo B presenta una distribución de los hidrógenos H-1, H-2 y H-3 en orto con una $J_{2,3}=8.37$ Hz y en meta con una $J_{1,2}=2.12$ Hz. Por otra parte se puede observar que la unión de la ramnosa al flavonol se da por medio del C-3 como se muestra en la tabla 12, ya que el H-6 perteneciente al C-2'' de la ramnosa se correlaciona con el C-3 del flavonoide según el espectro de HMBC. Además debido a las correlaciones de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ y a la señal de C-7'' a campos altos perteneciente a un metilo unido a un grupo alquilo, se determinó que la porción del azúcar es la ramnosa. Con respecto a todo lo anterior y a las correlaciones de COSY, TOCSY, NOESY, HMBC y HSQC el

compuesto elucidado fue la quercetina 3-ramnosa, también conocido como quercitrina; la estructura se puede observar en la figura 41. Para el análisis por HPLC de C2 se observó un tiempo de retención de 40.7 min. y un espectro de absorción de UV visible con longitudes de onda máxima de 256.3 y 352.6 nm. Para este compuesto no se observaron impurezas en el cromatograma (figura 19); además, tanto las correlaciones obtenidas por RMN como por el espectro de absorción son similares a lo reportado por Fukunaga & cols. (1988). Cabe resaltar que quercitrina no ha sido reportado en esta la planta pero si en otras especies de *Centaurea* como *C. horrida* (Flamini & cols. 2002).

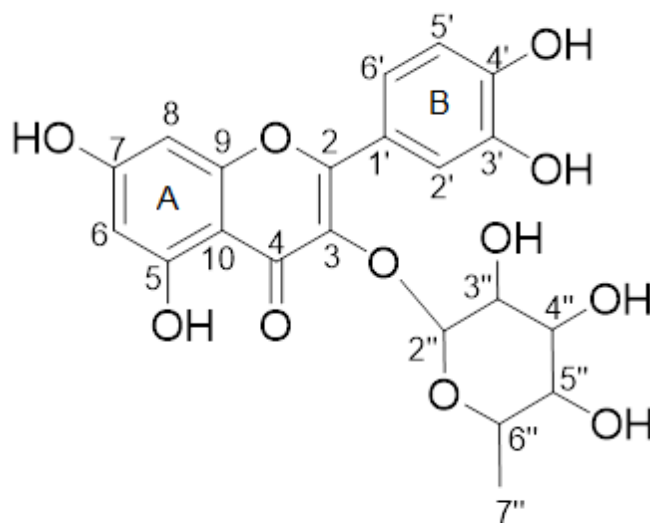


Figura 41. Quercetina 3-O-ramnósido o Quercitrina (C2).

Tabla 13. Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C2.

#	(^1H)		COSY (^1H - ^1H)	HSQC (^1H - ^{13}C)	HMBC (^1H - ^{13}C)
	Tipo de señal	J (Hz)			
1	d	2.12	2, 3	5'	6', 4', 2
2	dd	2.12, 8.37	1, 3, 11	6'	2', 4'
3	d	8.37	2	2'	6', 3'
4	d	2.12	5	8	6, 10, 2, 9
5	d	2.12	4	6	8, 7, 5
6	d	1.54	7, 8	2''	6'', 5'', 3
7	q	3.46, 1.54	6, 9	3''	-
8	-	-	7	5''	4'
9	-	-	11	4''	5'', 3''
10	-	-	11	6''	5'', 3''
11	d	6.12	9, 10	7''	5'', 3''

Así también, se hizo la elucidación de la mezcla de C3/C4. Como se puede ver en la figura 33, se aprecian dos compuestos por la diferencia de intensidades en las señales de ^1H RMN. En la figura 33 se observan seis señales correspondientes a C3 y siete señales correspondientes a C4. La mayoría de estas señales se encuentran a campo bajo, por lo que corresponden a protones pertenecientes a grupos aromáticos. También se pueden ver dos señales singuletes a campo alto; cada una integra para tres protones, por lo que se trata de metilos. Sin embargo, se encuentran desplazados entre 3.3-3.6 ppm, lo que significa que se encuentran unidos a un oxígeno, y se trata de dos grupos metoxilos.

Respecto a C3 se obtuvieron 16 señales de carbonos por $^{13}\text{CRMN}$, de los cuales C-2=166.09 ppm, C-3=139.68 ppm, C-4=180.17 ppm, C-5=163.22 ppm, C-7=166.09 ppm, C-9=158.55 ppm, C-10=106.00 ppm, C-3'=150.08 ppm, C-4'=122.48 ppm y C-6'=158.11 ppm son carbonos cuaternarios; C-6=99.91 ppm, C-8=94.86 ppm, C-1'=116.62 ppm, C-2'=146.60 ppm, C-5'=116.56 ppm son carbonos terciarios y $-\text{OCH}_3=60.65$ un metilo unido a oxígeno. Del espectro de $^1\text{HRMN}$ se pudieron observar cinco señales a campos bajos pertenecientes a grupos aromáticos; H-4=6.179 ppm y H-5=6.179 ppm pertenecientes al anillo A, distribuidos en meta con una $J_{4,5}=2.0$ Hz. Mientras que H-1=7.51 ppm, H-2=7.61 ppm, H-3=6.89 ppm, pertenecientes al anillo B, se encuentran distribuidas en orto con una $J_{2,3}=8.4$ Hz y en meta con una $J_{1,2}=2.1$ Hz. Además se puede apreciar en el espectro de $^1\text{HRMN}$ (figura 42) una señal singulete a campo alto que integra para tres hidrógenos, correspondiente a un grupo metoxilo $\text{O}-\text{CH}_3=3.77$ ppm. Debido a todo lo anterior y a las correlaciones $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, COSY, HSQC y HMBC presentadas en la tabla 12, se determinó que el compuesto C3 es la quercetina 3-metiléter (figura 42).

Para la elucidación de C4 en el espectro de $^{13}\text{CRMN}$ se tomaron en cuenta las 16 carbonos de menor intensidad (correspondientes a un compuesto minoritario) de los cuales $\text{C}=\text{O}=182.47$ ppm, $\text{C}\alpha=164.56$ ppm, C-1=164.90 ppm, C-3=145.61, C-4=122.28 ppm, C-1'=161.77 ppm, C-2'=149.55 ppm, C-4'=103.91 ppm y C-6'=157.97 ppm son carbonos cuaternarios, $\text{C}\beta=102.46$ ppm, C-2=112.75 ppm, C-5=115.36 ppm, C-6=118.90 ppm, C-3'=93.60 ppm y

C-5'=98.70 ppm son carbonos terciarios y O-CH₃ es un metilo unido a oxígeno. A diferencia de C3, C4 presenta una señal de carbonilo a campos más bajos (C-4=180.17 ppm); este tipo de señal se puede observar en las chalconas, las cuales son un tipo de flavonoide con un esqueleto carbonado C6-C3-C6 (Dominguez, 1988). Por otra parte, la fluorescencia es una de las propiedades de las chalconas; en la figura 13B, el compuesto C3 se ve como una banda oscura mientras C4 se observa en el fondo como una banda fluorescente. Con respecto a los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN y las correlaciones por COSY, HMBC y HSQC (tabla 15) se determinó que el compuesto es la chalcona, 2',3,4,4',6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona como lo reporta Sasaya (1965) y se puede observar en la figura 43.

Para la mezcla de quercetina 3-metiléter y 2', 3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona se observó una señal con tiempo de retención de 49.5 min. y longitudes de onda máxima de 256.3, 357.4 y 369.1 nm; no se observaron impurezas (figura 20). Sin embargo la mezcla de quercetina 3-metiléter y 2', 3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona no se pudieron separar con el método cromatografico utilizado. Además se puede ver en el espectro de UV-Vis que esta señal cromatografica presenta tres $\lambda_{\text{máx}}$; las que se deben al flavonoide (256.3 y 357.7 nm) y la chalcona (369.1nm); donde la $\lambda_{\text{máx1}}$ para las flavonas va de entre 250-300 nm para los flavonas y 370-410 nm para las chalconas (Dominguez, 1988). Quercetina 3-metiléter no ha sido reportada en *Centaurea americana*; sin embargo si ha sido reportada en otras especies como la *Centaurea glomerata Vahl* (Ahmed M. & cols., 1990). Por otra parte 2', 3, 4, 4',

6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona no ha sido reportada en ninguna especie de *Centaurea*.

Tabla 14. Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C3.

#	(^1H)		COSY (^1H - ^1H)	HSQC (^1H - ^{13}C)	HMBC (^1H - ^{13}C)
	Tipo de señal	J (Hz)			
1	d	2.1	1	5'	9, 6', 4', 3', 2, 2'
2	dd	8.4, 2.1	2, 3	2'	5', 1', 4', 6', 9
3	d	8.4	2, 3	1'	9, 6', 4', 3', 2, 2', 5', 1'
4	d	2.0	4	8	6, 10, 9, 6', 7
5	d	2.0	5	6	8, 10, 5, 7
6	s	-	6	CH3	3

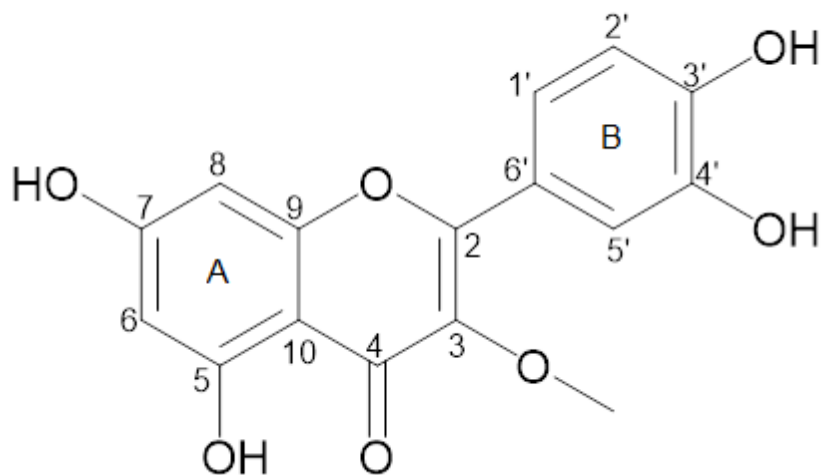


Figura 42. Quercetina 3-metiléter (C3).

Tabla 15. Correlaciones ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C correspondientes a los espectros de COSY, HSQC y HMBC de C4.

#	(^1H)		COSY (^1H - ^1H)	HSQC (^1H - ^{13}C)	HMBC (^1H - ^{13}C)
	Tipo de señal	J (Hz)			
1	dd	-	3	6	2, 6, 3
2	s	-	3	2	6, 3
3	d	-	1,2	5	6, 4, 3
4	s	-	5	B	α , 1, C=O
5	d	-	4,6	3'	5', 4', 6'
6	d	-	5	5'	4', 6'
7	s	-	-	CH3	A

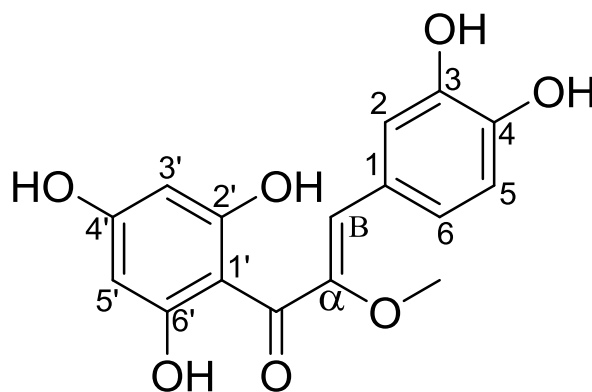


Figura 43. 2', 3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona (C4).

En resumen se aislaron cuatro compuestos, tres de ellos del tipo flavonoide (quercitrina, quercetina 3-metiléter y 2',3,4,4',6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona) y un glucósido lignano (arctiina).

Respecto a las actividades biológicas reportadas para este tipo de compuestos, los flavonoides llevan a cabo diversas funciones en la célula

eucariótica debido a la interacción con una gran cantidad de proteínas quinasas. También participan en vías importantes de desarrollo y diferenciación celular; una de las funciones más sobresalientes es su capacidad de atenuar radicales libres (Brunetti & cols., 2013) los cuales, son capaces de desencadenar diferentes patologías. Por otra parte, los compuestos lignanos se han utilizado como estrogénicos y antiestrogénicos, debido a la similitud estructural con el 17- β -estradiol. También se ha reportado su uso en la prevención del cáncer y diabetes, así como antioxidante (Xueming & Touré, 2010).

Como se muestra en la tabla 11 los compuestos de tipo flavonoides (quercitrina, quercetina 3-metiléter/ 2',3,4,4',6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona) presentaron una actividad antioxidante similar a quercetina. Así mismo, se ha reportado que la quercitrina presenta una CR_{50} de 4.45 ± 0.17 $\mu\text{g/mL}$ (X. Li & cols., 2016), la quercetina 3-metiléter una CR_{50} 14.17 ± 0.69 $\mu\text{g/mL}$ (Lee & cols., 2015) mientras que de la 2',3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona no se había reportado su actividad antioxidante. Sin embargo Zhuang & cols. (2017) reportaron que en general las chalconas tienen la capacidad de actuar como antioxidante de diferentes maneras, por ejemplo regulando el balance óxido reducción o activando enzimas antioxidantes, entre otros mecanismos.

Por otra parte, la arctiina no redujo el DPPH dentro de las concentraciones probadas con una $CR_{50} > 125$ $\mu\text{g/mL}$, lo que coincide con lo reportado por Shoeb & cols. (160 $\mu\text{g/mL}$). Así también que Lü & cols (2016) reportan que la

arctiina presenta una actividad baja en la atenuación del radical DPPH. Sin embargo se han descrito otros mecanismos por los cuales la arctiina reduce el estrés oxidativo. Wu & cols. (2009) evaluaron la actividad antioxidante de la arctiina *in vivo* en ratas Sprague-Dawley en el daño renal inducido por albumina sérica bovina catiónica, mediante la medición de SOD (superóxido dismutasa) y malondialdehído (MDA). La SOD es una enzima que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, debido a esto, es una importante defensa antioxidante en las células expuestas a oxígeno; la disminución de SOD es un indicador de estrés oxidativo. El MDA, es el producto final de la peroxidación lipídica, lo cual es inducido por la acción de los radicales libres producidos en estrés oxidativo, por ello un incremento en los niveles de MDA es traducido a una falla de los mecanismos de defensa antioxidante. En este estudio se reportó que la arctiina redujo los niveles de MDA e incremento los niveles de SOD.

Para la determinación de la actividad hepatoprotectora de los compuestos aislados, primero se evaluó la citotoxicidad; esto con el fin de seleccionar las concentraciones a utilizar en el bioensayo. En el presente estudio, se observó que la arctiina no mostró citotoxicidad a las diferentes concentraciones evaluadas (10-1000 µg/mL) en las células HepG2 a 24h. Esto coincide con lo reportado para la arctiina en otras líneas celulares (Yang & cols, 2014; Shoeb & cols, 2007). Por otro lado, difiere de lo publicado por Moritani & cols. (1996), quienes reportaron una IC₅₀ de 2.6 ± 0.27 µg/mL en HepG2 a 72h; sin embargo

esto es explicado por la diferencia en el tiempo de exposición, ya que se ha descrito que a mayor tiempo de exposición se observa citotoxicidad.

Debido a la baja cantidad de compuesto aislado, se evaluaron las concentraciones de 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$ de arctiina para el ensayo de hepatoprotección, en el cual se pudo observar una tendencia dosis-respuesta, ya que a mayor concentración de arctiina mayor fue el efecto hepatoprotector. Esto se puede apreciar en la figura 39 donde a una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ se ve una diferencia significativa con una $P < 0.001$ con respecto al control de daño. Esto concuerda con lo reportado por Yang & cols. (2014) quienes evaluaron el efecto hepatoprotector de la arctiina y otros lignanos mediante el daño inducido con D-galactosamina en la línea celular HL-7702 a una concentración de 1×10^{-5} M; la arctiina presentó una buena actividad respecto a otros lignanos probados. En este mismo estudio, observaron una relación actividad-estructura, donde los lignanos glucosilados con un anillo de tetrahidrofurano son los que poseen una mayor actividad hepatoprotectora.

Respecto a la actividad de quercitrina, esta no mostró ser tóxica en el intervalo de concentraciones evaluadas (tabla 11). Al respecto, Kim & cols. (2004) probaron la citotoxicidad de este compuesto en cinco líneas celulares de cáncer (A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 y HCT-15); como resultado, quercitrina fue uno de los compuestos con mayor grado de citotoxicidad. Cabe resaltar que Kim & cols. (2004) mantuvieron durante 24 h más el contacto del compuesto con las células en comparación al tiempo trabajado en este estudio. Por otra parte, Ahmed & cols. (2016) reportaron que la quercetina 3-

ramnósido presentó una IC_{50} de 84.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la línea celular HepG2 con un tiempo de exposición del compuesto de 72 h utilizando $1-2 \times 10^3$ células por pozo. Englobando lo reportado con lo obtenido en este trabajo las IC_{50} podrían ser similares en proporción al número de células usadas y el tiempo de exposición; a mayor número de células menor CC_{50} , y a mayor tiempo de exposición mayor CC_{50} . Debido a que en un intervalo de entre 10 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la quercitrina no fue tóxica en las células y a la baja cantidad de quercitrina obtenida en este estudio, se eligieron las concentraciones de 100, 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el ensayo de hepatoprotección. Lo anterior dio como resultado que a mayor concentración, mayor era la diferencia significativa con respecto al control de daño ($P < 0.001$); esto de forma similar a lo obtenido para la arctiina (tabla 11). Por su parte, Truong & cols. (2016) reportaron la actividad hepatoprotectora de la quercetina 3-ramnósido en ratones con daño inducido con acetaminofén; como resultado obtuvieron una relación dosis respuesta, tal como se presenta en este trabajo. Además en esta tesis a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hubo mayor diferencia significativa con respecto al control de daño, en comparación con el control de hepatoprotección de silibinina.

Por ultimo, con respecto a la actividad citotóxica de la mezcla de quercetina 3-metiléter y 2',3,4,4',6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona se obtuvo una CC_{50} $301.1 \pm 74.19 \mu\text{g}/\text{mL}$ lo que representa la mayor toxicidad de los compuestos probados (tabla 11), sin embargo la CC_{50} no fue tan baja como lo reportado por Sun & cols., (2015) para la quercetina 3-metiléter, esto concuerda con la

citotoxicidad reportada para este compuesto por Sun & cols., (2015) en la línea celular HepG2 y CF-7.

Por otra parte, no hay reportes de la actividad hepatoprotectora y su citotoxicidad de la 2',3,4,4',6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona encontrada en este estudio; sin embargo hay reportes de que en general las chalconas hidroxisustituidas son citotóxicas sobre líneas celulares tumorales (Go & cols., 2005). Lo descrito anteriormente concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Para el ensayo de hepatoprotección de mezcla de quercetina 3-metiléter y 2',3,4,4',6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona se evaluaron las concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ menor a CC_{50} obtenida (tabla 11). Como resultado de este ensayo se obtuvo que a 200 $\mu\text{g/mL}$ hay diferencia significativa con respecto al control de daño, además que se puede ver el mismo patrón dosis-respuesta encontrado en arctiina y quercitrina. No se han encontrado reportes de la actividad hepatoprotectora de quercetina 3-metiléter y 2',3,4,4',6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona, sin embargo se ha determinado la actividad de quercetina 3-metiléter en ratones con daño inducido con acetaminofén; donde se observó una reducción del 34 % de daño (Küpeli & cols., 2006). Por otra parte se ha reportado que algunas tipos de chalconas presentan un riesgo de hepatotoxicidad y que pueden actuar en sinergismo junto con algunos inductores de daño como el acetaminofén.

Además se observó en los resultados del ensayo de hepatoprotección que la silibinina presentaba un patrón inverso a la dosis-respuesta encontrado en los

compuestos aislados; ya que a menor concentración, mayor era el efecto hepatoprotector. Sin embargo este patrón se debe a que a concentraciones altas, la silibinina es tóxica por lo que hay mayor producción de niveles de AST y se pierde la actividad hepatoprotectora; esto en un lapso de 24 h (Vakili, Z. & cols, 2018).

Finalmente, en la figura 44 se muestra un resumen visual del aislamiento biodirigido guiado de la actividad antioxidante debida a la reducción del DPPH. Al mismo tiempo, se puede observar el seguimiento del aislamiento desde el inicio; también los extractos, fracciones y compuestos que presentaron actividad antioxidante.

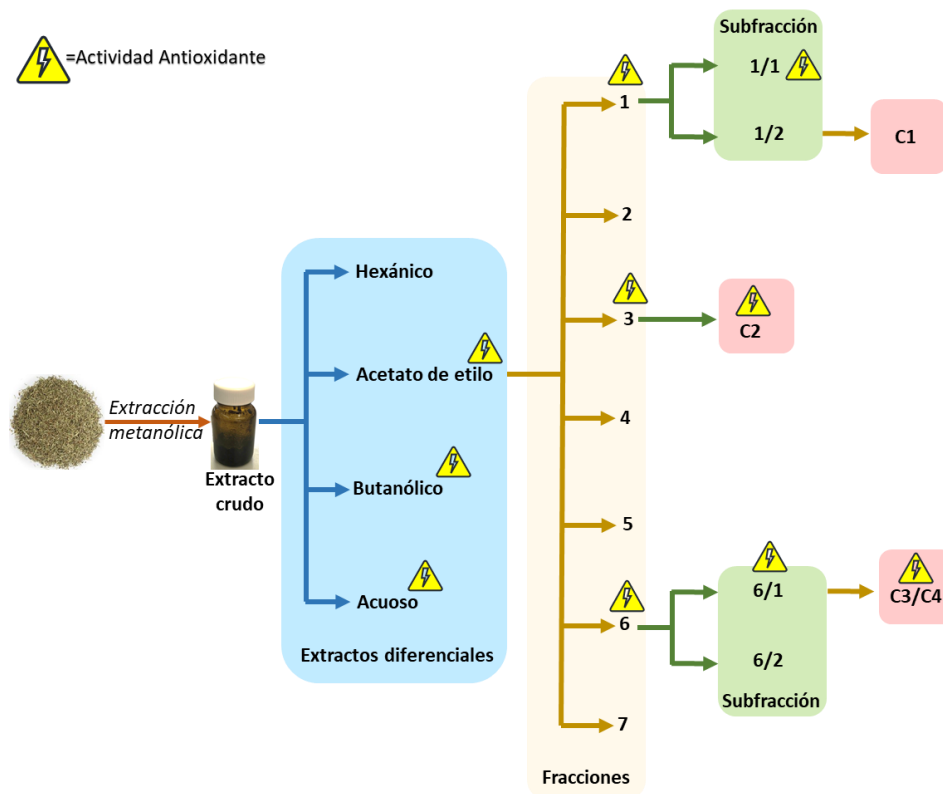


Figura 44. Resumen del aislamiento bioguiado a partir de *Centaurea americana*.

5 CONCLUSIONES

- La mayoría de los extractos obtenidos presentaron actividad antioxidante y hepatoprotectora, con excepción del extracto hexánico.
- El extracto de aceto de etilo mostró la mayor actividad antioxidante y hepatoprotectora.
- Se aislaron e identificaron cuatro compuestos a partir del extracto de acetato de etilo: arctiina, quercitrina, quercetina 3-metileter y 2', 3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona.
- La quercitrina y la mezcla de quercetina 3-metileter y 2', 3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona presentaron actividad antioxidante, mientras que la arctiina no la presentó.
- La arctiina y la quercitrina no fueron tóxicos en el intervalo probado de concentraciones ($CC_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$).
- La mezcla de quercetina 3-metiléter y 2', 3, 4, 4', 6'-pentahidroxi- α -metoxi chalcona presentó una CC_{50} de $301.1 \pm 74.19 \mu\text{g}/\text{mL}$ y se puede considerar como ligeramente tóxica.
- Los tres compuestos aislados mostraron actividad hepatoprotectora, sin embargo, la Silibinina presentó mejor actividad.

6 PERSPECTIVAS

- Continuar el aislamiento biodirigido del extracto diferencial de aceto de etilo, e iniciarlo con el butanólico y acuoso.
- Determinar el mecanismo por el cual la arctiina presenta actividad hepatoprotectora.
- Probar la actividad biológica de los compuestos aislados en otros modelos de daño hepático.

7 REFERENCIAS

- Ahmad, F., & Tabassum, N. (2012). Experimental models used for the study of antihepatotoxic agents. *Journal of Acute Disease*, 85–89. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60064-5](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60064-5)
- Ahmed, H., Moawad, A., Owis, A., AbouZid, S., & Ahmed, O. (2016). Flavonoids of *Calligonum polygonoides* and their cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2119–2126. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1146778>
- Ahmed M., Z., Osama M., S., & Ahmed F., H. (1990). Chemical investigation of centaurea glomerata Vahl. *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(5).
- Al-Sayed, E., El-Lakkany, N. M., Seif el-Din, S. H., Sabra, A.-N. A., & Hammam, O. A. (2014). Hepatoprotective and antioxidant activity of *Melaleuca stypelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmaceutical Biology*, 52(12), 1581–1590. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.908398>
- Al-Sayed, E., & Esmat, A. (2016). Hepatoprotective and antioxidant effect of ellagitannins and galloyl esters isolated from *Melaleuca stypelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *PHARMACEUTICAL BIOLOGY*, 54(9), 1727–1735. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1125933>
- ATTC. (2011). MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. *American Type Culture Collection*, 6597, 1–6. <https://doi.org/ATCC 30-1010K>
- Azzouzi, D., Bioud, K., Demirtas, I., Gul, F., Sarri, D., Benayache, S., ... Mekkiou, R. (2016). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Extracts. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19(10). <https://doi.org/10.2174/1574888X11666161102092319>

- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Retrieved July 5, 2018, from http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro_atlas.html
- Brunetti, C., Ferdinando, M. Di, Fini, A., Pollastri, S., & Tattini, M. (2013). Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci*, 14, 14. <https://doi.org/10.3390/ijms14023540>
- Bucar, F., Wube, A., & Schmid, M. (2013). Natural product isolation-how to get from biological material to pure compounds. *Nat. Prod. Rep.*, 30, 525. <https://doi.org/10.1039/c3np20106f>
- Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol*. 2004; 3(3):86-92.
- Chandrasekaran, C., Dethe, S., Mundkinajeddu, D., Pandre, M., Balachandran, J., Agarwal, A., & Hiraganahalli, D. (2012). Hepatoprotective and antioxidant activity of standardized herbal extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 8(30), 116. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.96553>
- Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. (2006). <https://doi.org/10.1177/10870571105283787>
- Cooper, G., Laird, A., Nahar, L., & Sarker, S. (2001). Lignan glucosides from the seeds of *Centaurea americana* (compositae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 30, 65–67.
- De Cossio, M. G. (2009). Guía metodológica para la estructuración de planes y programas de estudio para el diplomado de herbolaria, para el fortalecimiento de la práctica médica. Retrieved July 5, 2018, from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/38484/HerbolariaCIFRH_S.pdf
- Delgado-Montemayor, C., Cordero-Pérez, P., Salazar-Aranda, R., & Waksman-Minsky, N. (2015). Models of hepatoprotective activity assessment. *Medicina Universitaria*, 17(69), 222–228. <https://doi.org/10.1016/J.RMU.2015.10.002>

- Dominguez, X. A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica* (4a ed.). México: LIMUSA.
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., & Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3(12), 1820–1831. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.182>
- Flamini, G., Bulleri, C., & Morelli, I. (2002). Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(11), 1051–1054. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00055-8)
- Freitag, A. F., Fernando, G., Cardia, E., Ambrósio, B., Rocha, D., Aguiar, R. P., ... Cuman, N. (2015). Hepatoprotective Effect of Silymarin (*Silybum marianum*) on Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/538317>
- Fukunaga, takehiko, nishiya, koichi, kajikawa, ikuko, watanabe, yoshikuni, suzuki, nobuo, takeya, koichi, & Itokawa, hideji. (1988). Chemical Studies on the Constituents of *Hyphear Tanakae* Hosokawa from Different host trees. *Chem. Pharm. Bull*, 36(3), 1180–1184. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/36/3/36_3_1180/_pdf/-char/en
- Go, M., Wu, X., & Liu, X. (2005). Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties. *Current Medicinal Chemistry*, 12(4), 483–499. <https://doi.org/10.2174/0929867053363153>
- Granados-Guzman, G., Salazar-Aranda, R., Garza-Tapia, M., Castro-Rios, R., & Waksman de Torres, N. (2017). Optimization and Validation of Two High-Throughput Methods Indicating Antiradical Activity. *Current Analytical Chemistry*, 13(6), 499–507. <https://doi.org/10.2174/1573411013666170118111516>
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Tratado de Fisiología médica* (12a ed.). Barcelona, España.: Elsevier España, S.L.

- Hardenburg, R. E., Watada, A. E., & Wang, C. Y. (1988). *Almacenamiento comercial de frutas, legumbres y existencias de floristerías y viveros*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(6), 635–642. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2015.69084>
- Huang, Z. Q., Chen, P., Su, W. W., Wang, Y. G., Wu, H., Peng, W., & Li, P. B. (2018). Antioxidant activity and hepatoprotective potential of quercetin 7-rhamnoside in vitro and in vivo. *Molecules*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051188>
- IMSS. (2008). *GPC. Insuficiencia hepática: IMSS-038-08*. Retrieved from http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/038_GPC_InsufHepaticaCronica/IMSS_038_08_GRR.pdf
- IMSS. (2010). *GPC. Diagnóstico y tratamiento de la infección crónica por virus de hepatitis B: IMSS-419-10*. Retrieved from www.cenetec.salud.gob.mxhttp://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html
- IMSS. (2013). *GPC. Hepatitis autoinmune Clínica: IMSS-701-13*. Retrieved from <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/catalogoMaestroGPC.html>
- IMSS. (2014). *GPC. Enfermedad hepática Grasa No Alcohólica del Adulto: IMSS-719-14*. Retrieved from <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/IMSS-719-14/RR.pdf>
- INEGI. (2016). Mortalidad. Retrieved November 18, 2018, from <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- INEGI. (2018). *COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 525/18*. Retrieved from <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemografico/DEFUNCIONES2017.pdf>
- Jannu, V., Goud Baddam, P., Kumar Boorgula, A., & Reddy Jambula, S. (2012). A Review on Hepatoprotective Plants. *Int. J. Drug Dev. & Res*,

- 4(3), 1–8. Retrieved from <http://www.ijddr.in/drug-development/a-review-on-hepatoprotective-plants.pdf>
- Joshy, C., Thahimon, P. A., Kumar, R. A., Carla, B., & Sunil, C. (2016). Hepatoprotective, anti-inflammatory and antioxidant activities of *Flacourtia montana* J. Grah leaf extract in male Wistar rats. *Bolletín of Faculty of Pharmacy*, *54*, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.001>
- Jothy, S. L., Aziz, A., Chen, Y., & Sasidharan, S. (2012). Antioxidant Activity and Hepatoprotective Potential of *Polyalthia longifolia* and *Cassia spectabilis* Leaves against Paracetamol-Induced Liver Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/561284>
- Kim, Y.-K., Kim, Y. S., Choi, S. U., & Ryu, S. Y. (2004). *Isolation of Flavonol Rhamnosides from Loranthus tanakae and Cytotoxic Effect of Them on Human Tumor Cell Lines*. *Arch Pharm Res* (Vol. 27). Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF02980044.pdf>
- Kershenobich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, Gonçalves FL, Quiroz JF, Rodriguez-Perez F, Rosado B, Wallace C, Negro F, Silva M. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int*. 2011 Jul;31 Suppl 2:18-29.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2013). *Robbins Patología Humana* (9a ed.). Barcelona, España.: Elsevier.
- Küpelí, E., Orhan, D. D., & Yesilada, E. (2006). Effect of *Cistus laurifolius* L. leaf extracts and flavonoids on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*(3), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.038>
- Lee, Y. H., Kim, H. J., Yoo, H., Jung, S. Y., Kwon, B. J., Kim, N.-J., ... Lee, Y. S. (2015). Synthesis of (2-amino)ethyl derivatives of quercetin 3-O-methyl ether and their antioxidant and neuroprotective effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*(15), 4970–4979. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.023>
- Li, G., & Lou, H. X. (2018). Strategies to diversify natural products for drug

- discovery. *Medicinal Research Reviews*, 38(4), 1255–1294. <https://doi.org/10.1002/med.21474>
- Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- Li, X., Jiang, Q., Wang, T., Liu, J., Chen, D., Li, X., ... Chen, D. (2016). Comparison of the Antioxidant Effects of Quercitrin and Isoquercitrin: Understanding the Role of the 6"-OH Group. *Molecules*, 21(9), 1246. <https://doi.org/10.3390/molecules21091246>
- Lü, H., Sun, Z., Shan, H., & Song, J. (2016). Microwave-assisted extraction and purification of arctiin and arctigenin from fructus arctii by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 54(3), 472–478. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv168>
- Marcellin, P., & Kutala, B. K. (2018). Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver International*, 38(December 2017), 2–6. <https://doi.org/10.1111/liv.13682>
- Méndez-Sánchez N, Villa AR, Chávez-Tapia NC, Ponciano-Rodríguez G, Almeda-Valdés P, González D, Uribe M. Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatol*.2005 Jan-Mar;4(1):52-5.
- Moritani, S., Nomura, M., Takeda, Y., & Miyamoto, K. (1996). Cytotoxic Components of Bardanae Fructus (Goboshi). *Biol. Pharm. Bull.*, 19(11), 1515–1517.
- Nagalekshmi, R., Menon, A., Chandrasekharan D., & Cherupally, K. (2011). Hepatoprotective activity of *Andrographis Paniculata* and *Swertia Chirayita*. *Food Chem. Toxicol*, 49, 3367–3373. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S0278691511004789/1-s2.0-S0278691511004789-main.pdf?_tid=79d1b174-792a-4ff6-a8d0-f5397449999e&acdnt=1529090415_79d240fba62afebdb605bba6d441f21e

- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79, 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nur Alam, M., Jahan Bristi, N., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Ohno, N., Hirai, H., Yoshioka, H., Dominguez, X. A., & Mabry, T. J. (1973). Cynaropicrin: A sesquiterpene lactone from *Centaurea americana*. *Phytochemical Reports*, 221(1971), 221–222.
- OMS. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Ginebra, Suiza. Retrieved from www.who.int
- OMS. (2018). Las 10 principales causas de defunción. Retrieved November 18, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Quattrocchi, O., De andrizzi, S. A., & Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC*. Argentina: Artes Gráficas Farro SA.
- Roig, B., & Thomas, O. (2003). Rapid estimation of global sugars by UV photodegradation and UV spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 477(2), 325–329. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01427-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01427-7)
- Salazar, R., Pozos, M. E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M. C., & Waksman, N. (2008). Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 166–170. <https://doi.org/10.1080/13880200701498952>
- Sasaya, T. (1965). Flavonoids of willow wood. *Enshurin Kenkyu Hokoku*, 24(1), 177–234.
- Shoeb, M., Macmanus, S. M., Jaspars, M., Kong-Thoo-Lin, P., Nahar, L., Celik, S., & Sarker, S. D. (2007a). *Bioactivity of two Turkish endemic Centaurea species, and their major constituents*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* (Vol. 17). Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n2/02.pdf>
- Shoeb, M., Macmanus, S. M., Jaspars, M., Kong-Thoo-Lin, P., Nahar, L., Celik,

- S., & Sarker, S. D. (2007b). *Bioactivity of two Turkish endemic Centaurea species, and their major constituents*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* (Vol. 17). Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n2/02.pdf>
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, P. K., ... Sarker, S. D. (2006). Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*, 67(21), 2370–2375. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.012>
- Smilin Bell Aseervatham, G., Arul Ananth, D., & Sivasudha, T. (2018). The Liver: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. In *The Liver* (pp. 239–246). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803951-9.00020-3>
- Song, Y. M., Song, S.-O., Jung, Y.-K., Kang, E.-S., Cha, B. S., Lee, H. C., & Lee, B.-W. (2012). Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. *Autophagy*, 8(7), 1085–1097. <https://doi.org/10.4161/auto.20260>
- Sun, Y.-J., Hao, Z.-Y., Si, J.-G., Wang, Y., Zhang, Y.-L., Wang, J.-M., ... Chen, H. (2015). Prenylated flavonoids from the fruits of *Sinopodophyllum emodi* and their cytotoxic activities †. <https://doi.org/10.1039/c5ra16136c>
- Torres-González, L., Muñoz-Espinosa, L. E., Rivas-Estilla, A. M., Trujillo-Murillo, K., Salazar-Aranda, R., Waksman, N., Cordero-Pérez, P. (2011). Protective effect of four Mexican plants against CCl 4-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Annals of Hepatology*, 10(1), 73–79. Retrieved from <http://www.annalsofhepatology.com/revista/numeros/2011/HP111-12-Protective.pdf>
- Torres González, L., Waksman Minsky, N., Muñoz Espinosa, L. E., Salazar Aranda, R., Pérez Meseguer, J., & Cordero Pérez, P. (2017). In vitro assessment of hepatoprotective agents against damage induced by acetaminophen and CCl 4. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(39). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1506-1>

- Torres, L., Waksman, N., Perez, J., & Muñoz, L. (2014). Review of plants with hepatoprotective activity evaluated in Mexico. *Medicina Universitaria*, 16(65), 181–183.
- Torres, Liliana. (2017). *Evaluación de agentes hepatoprotectores en el daño inducido por tetracloruro de carbono y acetaminofen y su aplicación en la evaluación de un extracto de Centaurea americana*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Truong, V. L., Ko, S. Y., Jun, M., & Jeong, W. S. (2016). Quercitrin from *Toona sinensis* (Juss.) M. Roem. attenuates acetaminophen-induced acute liver toxicity in HepG2 cells and mice through induction of antioxidant machinery and inhibition of inflammation. *Nutrients*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/nu8070431>
- Vakili Zahir, N., Nakhjavani, M., Hajian, P., Shirazi, F. H., & Mirzaei, H. (2018). *Evaluation of Silibinin Effects on the Viability of HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma) and HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) Cell Lines*. *Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (Vol. 17). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937096/pdf/ijpr-17-261.pdf>
- van de Loosdrecht, A. A., Beelen, R. H. J., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., & Langenhuijsen, M. M. A. C. (1994). A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Immunological Methods*, 174(1–2), 311–320. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90034-5)
- Wanjari, M. M., Gangoria, R., Dey, Y. N., Gaidhani, S. N., Pandey, N. K., & Jadhav, A. D. (2016). Hepatoprotective and antioxidant activity of *Bombax ceiba* flowers against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Hepatoma Research*, 2(6), 144. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2015.55>

- Wu, J.-G., Wu, J.-Z., Sun, L.-N., Han, T., Du, J., Ye, Q., ... Zhang, Y.-G. (2009). Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats. *Phytomedicine*, 16(11), 1033–1041. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.005>
- Xiong, F., & Guan, Y.-S. (2017). Cautiously using natural medicine to treat liver problems. *World J.Gastroenterol*, 23(19), 3388–3395. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i19.3388>
- Xueming, X., & Touré, A. (2010). Lignans : Source , Antioxidant. *COMPR REV FOOD SCI F*, 9(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00105.x>
- Yang, Y.-N., Huang, X.-Y., Feng, Z.-M., Jiang, J.-S., & Zhang, P.-C. (2014). Hepatoprotective Activity of Twelve Novel 7'-Hydroxy Lignan Glucosides from *Arctii Fructus*. <https://doi.org/10.1021/jf501859x>
- Yirtici, Ü., Göger, F., Sarimahmut, M., & Ergene, A. (2017). Cytotoxic and apoptotic effects of endemic *Centaurea fenzlii* Reichardt on the MCF-7 breast cancer cell line. *Tutk J Biol*, 41, 370–377. <https://doi.org/10.3906/biy-1609-74>
- Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry Graphic abstract HHS Public Access. *Chem Rev*, 117(12), 7762–7810. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>