

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BIOPROSPECCIÓN DE FRUTOS SILVESTRES DEL NORTE DE MÉXICO

POR

IMELDA NOEHMÍ MONROY GARCÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

2022

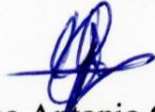
BIOPROSPECCIÓN DE FRUTOS SILVESTRES DEL NORTE MEXICANO

Comité de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

Presidente



Dr. Marco Antonio Guzmán Lucio

Secretario



Dra. Catalina León Rivas

Vocal



Dra. Irma Edith Carranza Torres

Vocal



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Hay tanto que agradecer, sin embargo, mi espacio en este documento es reducido, así que intentaré ser breve.

Gracias a mi director de tesis, Dr. José Ezequiel Viveros Valdés por sus enseñanzas, por su apoyo y comprensión, por mantenerme motivada, pero sobre todo por su amistad, muchísimas gracias.

Gracias a mi comité de tesis, Dr. Marco Antonio Guzmán Lucio, Dra. Catalina Leos Rivas, Dra. Irma Edith Carranza Torres, Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala por todas sus asesorías, apoyo, por compartirme su conocimiento, gracias a todos Ustedes que de alguna manera intervinieron en la realización de esta investigación.

Gracias al Instituto Tecnológico de Los Mochis por otorgarme la comisión para continuar con mi preparación, incrementando así, la calidad educativa de nuestros alumnos.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada.

Gracias a la Universidad Autónoma de Nuevo León por recibirme como alumna, por brindarme un espacio y recursos para la realización de esta investigación y en especial al Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas y a todas las personas que trabajan en él. Al maestro Sergio García, Dra. Caty Rivas, Dr. Eduardo Sánchez, Dr. Gilberto García, Dr. Mizael y a mis compañeros de laboratorio Oscar, Homero, Joel que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, a resolver mis dudas, a compartirme técnicas, reactivos, equipos y además por escuchar mis logros y frustraciones, pero sobre todo por compartir momentos muy agradables. En especial agradezco a mi amiga Karlita por su invaluable amistad durante estos años. De todo corazón les doy las gracias.

Gracias al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por permitirme hacer los ensayos con células. Muchas gracias a la Dra. Pilar Carranza, Dra. Edith Carranza y

Chelito por todo su apoyo, enseñanzas, pero sobre todo por su buena vibra. Hacen que sea un gusto llegar al laboratorio.

Gracias al Grupo de Investigación de Polifenoles de la Universidad de Salamanca, España por permitirme realizar una estancia para la elaboración de los perfiles químicos de mis frutas. Gracias a la Dra. María Teresa Escribano, Dr. Ignacio García-Estévez por facilitarme el uso de sus instalaciones y equipos y por el tiempo que dedicaron para cumplir con los objetivos de la estancia.

Y, gracias a mi esposo Juvenal y a mis hijas Milena y Daria por su amor y apoyo incondicional. Por su paciencia y solidaridad en mis momentos de estrés. A mis niñas gracias por aguantar mis prisas, mis ausencias derivadas de mis experimentos. Gracias por sus abrazos que me recargaban de energía para continuar con mi doctorado.

DEDICATORIA

A mi esposo e hijas les dedico esta tesis con todo mi amor

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1. Importancia de los frutos silvestres en la alimentación.....	5
3.2. Uso de productos naturales como antioxidantes.....	6
3.3. Compuestos fenólicos.....	8
3.4. Relación estructura-actividad.....	10
3.5. Compuestos fenólicos y diabetes mellitus.....	11
3.6. Compuestos fenólicos y cáncer.....	13
3.7. Perfiles químicos y análisis metabólicos.....	20
3.8. Frutos silvestres.....	21
3.8.1. <i>Ehretia tinifolia</i>	21
3.8.2. <i>Sideroxylon lanuginosum</i>	22
3.8.3. <i>Arbutus arizonica</i>	23
3.8.4. <i>Ziziphus obstusifolia</i>	24
3.8.5. <i>Condalia hookeri</i>	26
3.8.6. <i>Pyracantha coccinea</i>	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	29
5. HIPÓTESIS.....	30
6. OBJETIVOS.....	31
6.1. Objetivo general.....	31
6.2. Objetivos específicos.....	31

7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
7.1. Obtención del material vegetal.....	32
7.2. Obtención de extractos.....	32
7.3. Determinación de la capa antioxidante y antirradical.....	33
7.3.1. Actividad antirradical por DPPH.....	33
7.3.2. Actividad antirradical por ABTS.....	33
7.3.3. Protección de hemólisis de eritrocitos humanos.....	34
7.4. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.....	35
7.5. Actividad inhibitoria de enzimas digestivas.....	36
7.5.1. Inhibición de α -glucosidasa.....	36
7.5.2. Inhibición de α -amilasa.....	37
7.5.3. Inhibición de lipasa pancreática.....	37
7.6. Actividad antineoplásica.....	38
7.7. Perfiles químicos de compuestos fenólicos.....	39
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
9.1. Rendimiento de los extractos.....	42
9.2. Contenido de fenoles y flavonoides totales y actividad antirradical y antioxidante.....	42
9.3. Análisis de perfiles fenólicos por CLAR-DAD-EM/EM.....	45
9.4. Inhibición de enzimas digestivas.....	53
9.4.1. Inhibición α -glucosidasa.....	53
9.4.2. Inhibición α -amilasa.....	55

9.4.3. Inhibición lipasa pancreática.....	55
9.5. Actividad antineoplásica.....	56
10. CONCLUSIÓN.....	58
11. PERSPECTIVAS.....	59
12. BIBLIOGRAFÍA.....	60
13. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Estudios epidemiológicos en los que se analiza el posible efecto de diversos alimentos vegetales o polifenoles puros frente al riesgo de padecer distintos tipos de cáncer en humanos	15
2. Estudio sobre el efecto anticancerígeno de polifenoles puros o alimentos ricos en polifenoles sobre animales de experimentación	17
3. Método de gradiente de concentración de solventes de la fase móvil para la separación de los compuestos fenólicos por HPLC	40
4. Porcentaje de rendimientos obtenidos de los extractos de frutos silvestres	42
5. Contenido de fenoles totales, contenido de flavonoides totales y capacidad antioxidante/antirradical de extractos de frutos silvestres	43
6. Identificación tentativa de compuestos fenólicos del extracto de <i>E. tinifolia</i> determinada por HPLC-DAD-MS/MS	48
7. Identificación tentativa de compuestos fenólicos del extracto de <i>E. tinifolia</i> determinada por HPLC-DAD-MS/MS	52
8. Inhibición de enzimas digestivas y actividad antiproliferativa de extractos de frutos silvestres	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura general de los principales grupos de flavonoides	9
2. Estructura general de los principales grupos de ácidos fenólicos	9
3. Mecanismo químico de la acción antioxidante de los polifenoles	10
4. Estructura orto-dihidroxi relacionada con la mayor actividad de polifenoles	11
5. Fases de intervención de los polifenoles en el proceso de carcinogénesis	18
6. Frutos de <i>Ehretia tinifolia</i>	22
7. Frutos maduros de <i>Sideroxylon lanuginosum</i>	23
8. Flores y frutos de <i>Arbutus arizonica</i>	24
9. Frutos de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	25
10. Ramas con hojas y frutos de <i>Condalia hookeri</i>	27
11. Frutos maduros de <i>Pyracantha coccinea</i>	27
12. Protocolo para la preparación de la solución del radical ABTS ^{•+}	34
13. Estructura química del ácido rosmarínico y del ácido litospérmico	46
14. Cromatograma del análisis de compuestos fenólicos de <i>E. tinifolia</i> (registrados a 280 nm)	47
15. Fragmentación retro-Diels-Alder (RDA)	49
16. Cromatograma del análisis de compuestos fenólicos de <i>S. lanuginosum</i> (registrados a 280 nm)	50
17. Estructura química de la quercetina-glucósido	51
18. Estructura química de la acarbosa y voglibosa	53

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

AAPH	Dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Cepa de referencia certificada (American Type Culture Collection)
AR	Ácido rosmarínico
CA	Catequina
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CFeT	Contenido de fenoles totales
CFIT	Contenido de flavonoides totales
cMyc	Proteína reguladora de la expresión génica
CYP19	Aromatasa
DAD	Detector de arreglo de diodos
DEN	Dietilnitrosamina
DM	Diabetes mellitus
DMBA	7,12-dimetilbenz[a] antraceno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGC	Epicatequin galato

EGCG	Epigallocatequin galato
EM	Espectroscopía de masas
EM/EM	Espectroscopía de masas en tándem
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration)
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GSH	Glutación reducida
GPx	Glutación peroxidasa
HeLa	Células de cáncer cervicouterino de humano
HepG2	Células de cáncer de hígado humano
HT-29	Células de cáncer de colon humano
IES	Ionización por electrospray
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAM	Metilazoximetanol
MeOH	Metanol
NNK	4-metilnitrosamina-1-(3-piridil)-1-butanona
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)
PF	Peso fresco
PNPG	<i>p</i> -nitrofenil glucopiranosido
PNPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
P/V	Peso/Volumen
QG	Quercetin-glucósido

RDA	Fragmentación retro-Diels-Alder
SOD	Superóxido dismutasa
t-BOOH	Terbutil-hidroxi-peróxido
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al trolox
V/V	Volumen/Volumen

1. RESUMEN

La bioprospección se entiende como el aislamiento, identificación, clasificación, caracterización bioquímica y genética de productos naturales con potencial uso biotecnológico para beneficio del ser humano, y con el objetivo de encontrar compuestos bioactivos que representen un valor comercial significativo en áreas como la industria, alimentos y otros productos y/o productos farmacéuticos. En relación con esto, se ha demostrado que ciertos metabolitos en su mayoría de naturaleza fenólica desempeñan papeles importantes como agentes quimiopreventivos de numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer y diabetes. En este estudio se evaluó la composición fenólica, las actividades antioxidantes, antiproliferativas y la inhibición enzimática digestiva de los extractos metanólicos retenidos en amberlita de los frutos silvestres comestibles *Ehretia tinifolia*, *Sideroxylon lanuginosum*, *Arbutus arizonica*, *Ziziphus obtusifolia*, *Condalia hookeri* y *Pyracantha coccinea*. Los resultados mostraron que estos extractos son ricos en antioxidantes. *E. tinifolia* presentó el mayor contenido de compuestos fenoles totales (64.7 ± 2.6 mg GAE/100 g PF). Sin embargo *S. lanuginosum* tuvo un contenido mayor de flavonoides (21.4 ± 1.5 mg GAE/100 PF). El análisis CLAR-DAD-EM/EM mostró que el ácido rosmarínico es el principal polifenol en *E. tinifolia* y el glucósido de quercetina en *S. lanuginosum*. El contenido de polifenoles en *E. tinifolia* se relacionó con una capacidad significativa de captación de radicales libres: DPPH ($CE_{50} = 0.32 \pm 0.03$ mg/mL), TEAC (4134 ± 9.7 μ M TE/g extracto seco) e inhibición de la hemólisis ($CI_{50} = 58.55 \pm 2.4$ mg/ml). Los extractos fueron capaces de inhibir la α -glucosidasa, inhibir parcialmente la α -amilasa y no mostraron inhibición contra la lipasa, siendo *E. tinifolia* y *S. lanuginosum* los que presentaron mayor actividad inhibitoria. De igual manera estos dos frutos, mostraron actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer HeLa, HT-29 y MCF-7. Estos resultados revelan que estos extractos de frutas silvestres son ricos en fitoquímicos beneficiosos para la salud y tienen un potencial significativo para la elaboración de alimentos funcionales.

1. ABSTRACT

Bioprospecting is the systematic study of nature dedicated to finding compounds with possible uses for the benefit of human health, that may have significant commercial value in sectors such as industry, food and/or pharmaceuticals. In this connection, certain metabolites, mostly phenolic compounds, have been shown to play important roles as chemopreventive agents for numerous diseases, including cancer and diabetes. In this study, the phenolic composition, antioxidant and antiproliferative activities and digestive enzyme inhibition of methanolic extracts in amberlite retained from wild edible fruits *Ehretia tinifolia*, *Sideroxylon lanuginosum*, *Arbutus arizonica*, *Ziziphus obtusifolia*, *Condalia hookeri* and *Pyracantha coccinea* were evaluated. The results showed that these extracts are rich in antioxidants. *E. tinifolia* presented the highest content of total phenolic compounds (64.7 ± 2.6 mg GAE/100 g PF). However, *S. lanuginosum* had a higher content of flavonoids (21.4 ± 1.5 mg GAE/100 FP). HPLC-DAD-MS/MS analysis showed that rosmarinic acid is the main polyphenol in *E. tinifolia* and quercetin glycoside in *S. lanuginosum*. The content of polyphenols in *E. tinifolia* was related to a significant ability to scavenge free radicals: DPPH ($EC_{50} = 0.32 \pm 0.03$ mg/mL), TEAC (4134 ± 9.7 μ M TE/g dry extract) and inhibition of hemolysis ($IC_{50} = 58.55 \pm 2.4$ mg/ml). The extracts were able to inhibit α -glucosidase, partially inhibit α -amylase and showed no inhibition against lipase, with *E. tinifolia* and *S. lanuginosum* showing the highest inhibitory activity. Similarly, these two fruits showed antiproliferative activity against HeLa, HT-29 and MCF-7 cancer cell lines. These results reveal that these wild fruit extracts are rich in phytochemicals beneficial to health and have significant potential for the development of functional foods.

2. INTRODUCCIÓN

La bioprospección de productos naturales consiste en el aislamiento, identificación, clasificación, caracterización bioquímica y genética, con potencial uso biotecnológico para beneficio del ser humano, y con el objetivo de encontrar compuestos bioactivos que representen un valor comercial significativo en áreas como la industria, alimentos y otros productos y/o productos farmacéuticos (Kewalanand, 2018). En este sentido, estudios científicos indican que ciertos productos naturales pueden contener moléculas, especialmente polifenoles, que juegan un papel relacionado como agentes quimiopreventivos contra muchas enfermedades (Quiñones, 2012). Es bien conocida la estrecha relación entre la salud y la alimentación. El padre de la medicina, Hipócrates, dijo: “Que la comida sea tu medicina, y la medicina tu alimento”. Con esta frase memorable recordamos el valor de una buena alimentación, la cual se ha vuelto una tendencia alimentaria en el siglo XXI (Hernández-Brenes y Serna-Saldivar, 2003). Estos aspectos han revolucionado lo que comemos hoy en día y los cambios que se prevén en el futuro y la tendencia se ha volcado hacia los alimentos funcionales o nutraceuticos, los cuales se definen como “cualquier alimento o componente del mismo que confiere un beneficio demostrado a la salud de las personas” (Jones y Varady, 2008).

Por otro lado, es sabido que los radicales libres son producto del metabolismo energético de manera fisiológica en el organismo, sin embargo, estos radicales pueden aumentar bajo ciertas condiciones tales como contaminación ambiental, tabaquismo, exposición a la radiación UV, entre otras; lo cual está implicado en el daño a diversos compuestos bioquímicos, como, proteínas, carbohidratos lípidos y ácidos nucleicos (Cross et al. 1987). Así, el consumo de productos vegetales se ha relacionado con efectos benéficos a la salud, lo cual puede ser en parte a la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos presentes en estos alimentos. Los polifenoles pueden disminuir la cantidad de radicales libres en las células y con ello protegerlas contra el daño oxidativo que provocan numerosas sustancias, desempeñando una importante función en la prevención de numerosas enfermedades (Quiñones et al. 2012).

Los frutos silvestres obtenidos de árboles, arbustos y enredaderas poseen una gran cantidad de compuestos fenólicos localizados principalmente en su piel y pulpa, y pueden representar ser una buena fuente de compuestos antioxidantes en la dieta (Guimarães et al. 2014). Tomando lo anterior como base y dado que los productos con alto contenido de antioxidantes han adquirido gran importancia debido a la posibilidad de que su consumo ayude en la prevención de ciertas enfermedades, el propósito de este estudio fue determinar el potencial nutracéutico de los frutos silvestre comestibles: silvestres *Ehretia tinifolia* (Pingüica), *Sideroxylon lanuginosum* (Coma), *Ziziphus obtusifolia* (Ziziphus), *Condalia hookeri* (Brasil), *Arbutus arizonica* (Madroño), *Pyranantha coccinea* (Piracanto), para lo cual se tiene contemplado cuantificar la actividad antioxidante mediante el secuestro de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales, determinar el efecto inhibitorio de los frutos sobre α -amilasa y α -glucosidasa; enzimas relacionadas en el metabolismo de los carbohidratos. También se determinó la citotoxicidad de los extractos obtenidos de los frutos sobre las líneas celulares de adenocarcinoma mamario, cervicouterino y colon (MCF-7 y HeLa, HT-29 respetivamente) los cánceres más letales y frecuentes dentro de la población femenina mexicana. Así mismo se determinaron los perfiles fenólicos para establecer una correlación entre la presencia de polifenoles con el efecto biológico, por cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a un detector con arreglo de diodos (CLAR-DAD) y espectroscopía de masas (CLAR-EM/EM).

3. ANTECEDENTES

3.1. Importancia de los frutos silvestres en la alimentación

La dieta es uno de los factores de evolución más identificados en la historia humana, y durante este proceso evolutivo la forma de alimentarnos ha experimentado muchos cambios (Arroyo 2008). Desde el pasado, las frutas silvestres comestibles han desempeñado un papel muy importante para complementar la dieta del ser humano. Sin embargo, la dependencia de estas frutas ha disminuido gradualmente a medida que se han introducido más frutas cultivadas. No obstante, en las áreas tribales todavía son ampliamente usadas como complemento de su necesidad básica de alimentos. Algunos de ellos se conservan para su uso en período de sequía o se venden en el mercado rural. Además de su uso tradicional como alimento, tienen muchas ventajas potenciales: Son disponibles, tienen un valor alimenticio nutritivo, proporcionan minerales como sodio, potasio, magnesio, hierro, calcio, fósforo, etc., son fuente de fibra y además de ser resistentes a muchas enfermedades y, a menudo, se usan en diferentes formulaciones de 'Ayurveda' en la medicina popular india (Turner et al. 2011). Debido a lo anterior es importante prestar especial atención para mantener y mejorar esta importante fuente de abastecimiento alimentario. Para esto, se debe estimular una aceptación más amplia y sostenida de las frutas silvestres como componentes dietéticos importantes (Tardío et al. 2006).

Por último, definimos variedades silvestres, a las especies vegetales que son nativas a determinado sitio; de tal forma que constituyen el patrimonio natural de un ecosistema, país o región biogeográfica las cuales se diferencian de las cultivadas en que éstas se adaptan a las condiciones de suelo donde crecen, su valor nutritivo, su maduración, así como sus usos (FAO 1996). Debido a esta adaptación, se forman sistemas homeostáticos donde se mantienen niveles de producción ante cualquier agresión como enfermedades, plagas o eventos climatológicos adversos (FAO 1996).

3.2. Uso de productos naturales como antioxidantes

Según la teoría moderna de la biología y la medicina, las especies reactivas del oxígeno están involucradas en varios trastornos patológicos. Sin embargo, su acción dañina puede ser bloqueada por sustancias antioxidantes que eliminan los radicales libres y desintoxican el organismo. Las nuevas investigaciones coinciden en que los alimentos ricos en antioxidantes juegan un papel esencial en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cánceres y enfermedades neurodegenerativas.

Las especies reactivas al oxígeno (EROS) son moléculas altamente reactivas, muy inestables que contienen uno o más electrones desapareados, ocasionando daños a otras moléculas secuestrando sus electrones para obtener la estabilidad (Sharif Ali et al. 2008). Las especies reactivas al oxígeno generan daño oxidativo principalmente en proteínas, lípidos, carbohidratos, enzimas y ácidos nucleicos, lo que puede convertirse en trastornos patológicos (Prior et al. 1998; Cámara et al. 2011).

La formación de radicales libres se lleva a cabo por causas intrínsecas o extrínsecas (ambientales, nutricionales o farmacológicas) (Halliwell 1994). Las EROS, se producen naturalmente en el cuerpo humano por el metabolismo energético, principalmente en los complejos de transferencia de electrones y que tienen al oxígeno como el último aceptor de electrones. Ejemplos de ellos son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, los cuales se producen tanto en condiciones fisiológicas patológicas como normales (Esra-Birben et al. 2012).

Por otra parte, en el organismo se producen antioxidantes de manera endógena y además algunos alimentos son fuentes importantes de antioxidantes exógenos. Éstos protegen de la oxidación que causan los radicales libres, tanto a nivel intracelular como de membrana. Ambos sistemas antioxidantes actúan en conjunto protegiendo los diferentes sistemas y órganos (Quintanar y Calderón 2009).

Los principales antioxidantes que podemos encontrar en los alimentos de origen vegetal son algunas vitaminas como la C y E, minerales como el cobre, selenio, magnesio, carotenoides como el β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, y los polifenoles como ácidos fenólicos, flavonoides, quercetina, hesperidina y catequinas (Quintanar y Calderón 2009). El consumo de estos compuestos están asociados con menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes mellitus y a la disminución de procesos inflamatorios, evitando la oxidación del colesterol LDL e inhibiendo la formación de sustancias procancerígenas (Strain y Benzie 1999).

Los compuestos antioxidantes se pueden clasificar en tres grupos dependiendo su mecanismo de acción (Halliwell 1994):

- **Antioxidantes primarios:** Representan la primera línea de defensa contra las EROS, impidiendo la formación de radicales libres. El mecanismo de acción comprende: a) la descomposición enzimática de H_2O_2 e hidroperóxidos; b) proteínas con capacidad de quelación de iones metálicos oxidantes, y c) removiendo EROS mediante acción enzimática.
- **Antioxidantes secundarios:** Una vez superado el nivel de antioxidantes primarios, el organismo cuenta con un segundo nivel de protección llamado sistema antioxidante secundario. Éstos evitan la propagación de EROS “atrapándolos” e impidiendo así la iniciación de la reacción oxidativa en cadena.
- **Antioxidantes terciarios:** Este sistema tienen la capacidad de reparar o eliminar las moléculas que se han dañado. En este grupo se encuentran las enzimas reparadoras del ADN, la sulfóxido reductasa, endonucleasa apurínica/apirimidínica y polimerasa β (Taufert y Marin 2014).

Por lo anterior descrito, los antioxidantes juegan un rol importante en la prevención o alivio de enfermedades crónicas, como cáncer, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, cataratas, arteriosclerosis, asma, hepatitis, artritis y inmunodeficiencia (Siddhuraju y Becker 2007). Estos, reducen el daño oxidativo que causan las EROS a los

componentes celulares. Por otra parte, el uso de los antioxidantes de origen sintético en alimentos está sujetos a una estricta regulación, relacionado a la incertidumbre que han presentado en materia de seguridad. Debido a esto se ha incrementado el interés en la búsqueda de antioxidantes obtenidos de fuentes naturales para disminuir el daño oxidativo provocado por EROS (Jaitak et al. 2010).

Desde hace años, las plantas y sus derivados se han utilizado en distintos campos como la medicina y nutrición, en la industria alimentaria como saborizantes y bebidas, y otros usos industriales como repelentes, perfumes, cosméticos, cigarrillos, etc. Así, antes de que los medicamentos de origen sintético se desarrollaran en el siglo XIX, casi todas las terapias medicinales se basaban en plantas, ya que en estas se encuentran una gran variedad de fitoquímicos, en su mayoría metabolitos secundarios con actividad biológica (Djeridane et al. 2006).

3.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo de compuestos sintetizados por el metabolismo secundario de las plantas, los cuales intervienen en diversas funciones como mecanismo de defensa frente a agresiones externas por depredadores y organismos patógenos, regulación del crecimiento, resistencia a enfermedades y estrés, pigmentación, polinización, entre otros. Adicionalmente, pueden conferir sabores y colores a los frutos y plantas. Estructuralmente estos compuestos se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Scalbert y Haslam 1987).

Los polifenoles tienen la capacidad donar protones o electrones con lo que estabilizan a los radicales libres, previniendo así el daño oxidativo de biomoléculas. Esta propiedad podría ser la responsable en la prevención de patologías derivadas del estrés oxidativo y del envejecimiento celular.

De acuerdo con Bravo (1988), los compuestos fenólicos se pueden clasificar en dos grupos, flavonoides y no flavonoides.

Los flavonoides están compuestos por dos anillos aromáticos unidos a través de un oxígeno heterocíclico. De acuerdo con la posición del heterociclo y al grado de hidrogenación se pueden subclasificar como, flavonas, antocianinas, flavanoles, isoflavonas, flavonoles, flavanonas, etc. Los flavonoides generalmente se encuentran en la naturaleza como glucósidos. (Figura 1).

Los no flavonoides están compuestos principalmente por ácidos fenólicos donde los más representativos son el ácido benzoico y el ácido cinámico (Figura 2). Otros ejemplos de ácidos fenólicos son los estilbenos, taninos y ligninas

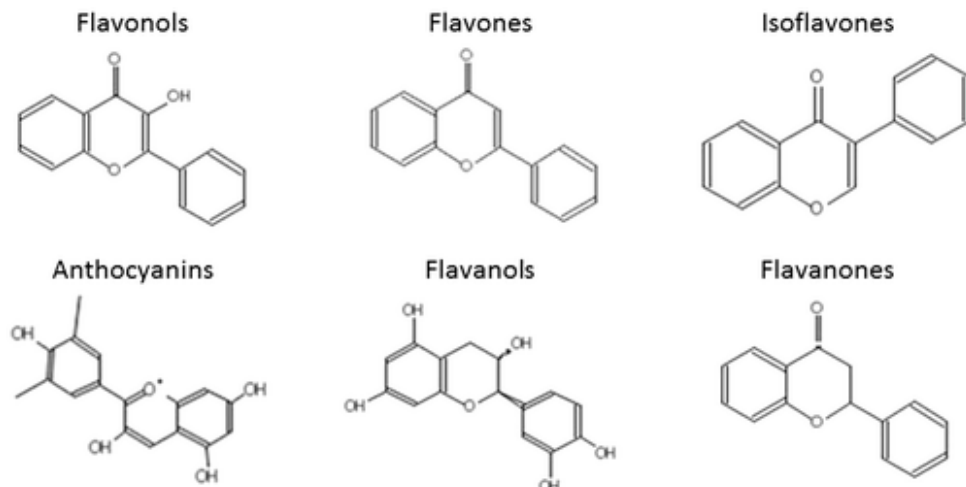


Figura 1. Estructura general de los principales grupos de flavonoides (Bravo, 1988)

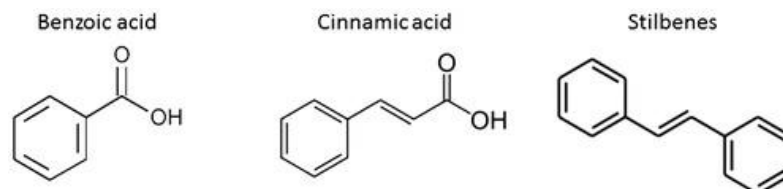


Figura 2. Estructura general de los principales ácidos fenólicos (Bravo, 1988)

Con relación a los efectos benéficos atribuidos a la ingesta de compuestos fenólicos, la industria alimentaria ha demostrado un interés creciente en el estudio de estos compuestos. Se han reportado estudios epidemiológicos donde se ha relacionado la ingesta de alimentos ricos en compuestos fenólicos con una menor incidencia de enfermedades crónicas como diabetes, desórdenes cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson, cáncer, entre otras. (Bravo 1998; Mohamed 2014).

3.4. Relación estructura-actividad

La estructura química de los compuestos fenólicos posee diferentes números de grupos hidroxilo, los cuales determinan su capacidad antioxidante, debido a que estos grupos ceden electrones o hidrógenos, neutralizando a las especies reactivas de oxígeno. Por ejemplo, el radical flavínico (mucho menos reactivo) se forma a partir de los flavonoides (Figura 3). Además, otros polifenoles como la quercetina y otras flavanonas tienen la capacidad quelar iones metálicos como el cobre o el hierro, involucrados en la formación de EROS a través de la reacción de Fenton. Por último, los compuestos fenólicos poseen intermedios radicalarios estables, debido a la deslocalización por resonancia en el anillo aromático del electrón desapareado y a la ausencia de posiciones para el ataque por el oxígeno molecular (Siquet et al. 2006).

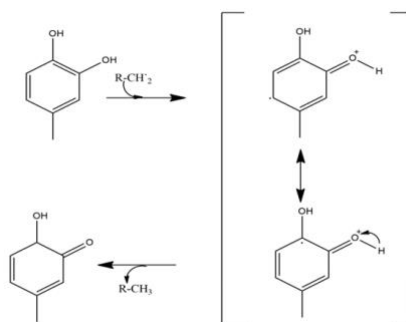


Figura 3. Mecanismo químico de la acción antioxidante de los polifenoles (Quiñones et al. 2012)

La relación entre la estructura y la actividad es determinante sobre la actividad biológica de los diferentes compuestos fenólicos. El número y la posición de grupos hidroxilo, la

glicosilación y otras sustituciones determinan la actividad de secuestro de radicales por los compuestos fenólicos.

Las moléculas que llevan grupos orto-dihidroxi o 4-hidroxi-3-metoxilo poseen una actividad antioxidante significativamente mayor que las que no tienen tal funcionalidad. Así, las diferencias que presentan las moléculas en la capacidad antioxidante reside en las diferencias estructurales de metoxilación, hidroxilación, glicosilación. No obstante, la sustitución de grupos OH por glicósidos disminuye la capacidad antioxidante. (Figura 4) (Cai et al. 2006).

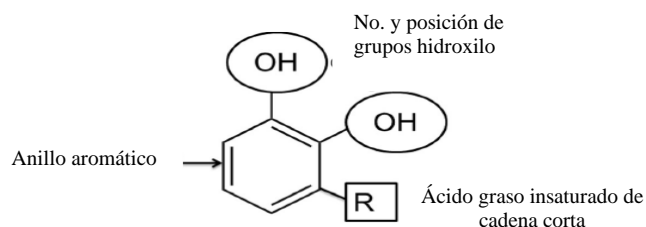


Figura 4. Estructura orto-dihidroxi relacionada con la mayor actividad biológica de polifenoles (Cai et al. 2006)

3.5. Compuestos fenólicos y diabetes mellitus

La Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés) define a la diabetes mellitus (DM) como un síndrome clínico dentro del cual se engloban diversos trastornos metabólicos de carácter crónico, cuyo nexo en común es una elevada concentración de glucosa en sangre secundaria a una disminución de secreción de insulina. La hiperglucemia ocasiona complicaciones a nivel microvascular, macrovascular y/o neuropático (Ramos-Ibarra 2006). Sin embargo, en algunas ocasiones la DM progresa lentamente y la detección no oportuna ocasiona aumento al costo del tratamiento y la carga de la enfermedad (ADA 2014).

La DM representa un problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que en 2035 los casos de DM diagnosticados alcancen que los 592 millones, representando un 8.8% de la población mundial. La diabetes se encuentra entre las principales causas de muerte a nivel mundial. En México, es la segunda causa de muerte y la primera causa de años de vida saludables perdidos; en 2011, los costos para atender a los pacientes con diabetes se estimaron en 7.7 mil millones de dólares (INSP 2016). Debido a esto, la DM ha sido declarada como emergencia epidemiológica en nuestro país (Secretaría de Salud 2016).

Existen numerosas investigaciones donde se presentan evidencias en las que se relaciona el estrés oxidativo en la patogénesis y en las complicaciones de la DM. La manera en la que aumenta dicho estrés puede variar, sin embargo, los principales detonantes se atribuyen a un descontrol de la glicemia y la hipertrigliceridemia. El mecanismo por el se forman los radicales libres en personas que viven con diabetes incluyen tanto el aumento en la glucosilación de carácter no enzimático y la auto-oxidativa, así como al estrés metabólico, el cual resulta de cambios energéticos del metabolismo a nivel de mediadores inflamatorios y del sistema antioxidante endógeno. En relación con lo anterior, Şardaş et al. (2001) evaluaron la cantidad de EROS producidas en pacientes con diabetes y encontraron un aumento de H_2O_2 , OH y O_2^- , lo que provocaba daño al ADN tanto nuclear como mitocondrial de linfocitos en sangre periférica.

El incremento de las EROS disminuye la actividad de la insulina en la periferia, provoca disfunción de las células β del páncreas y contribuye al desarrollo de complicaciones crónicas. En pacientes con diabetes los mecanismos antioxidantes y oxidantes se encuentran en desequilibrio, presentando bajos niveles de glutatión, enzimas y vitaminas antioxidantes en plasma (Shori 2015). También, se ha documentado en pacientes con DM un incremento en la peroxidación lipídica provocada por radicales libres, por lo que el consumo de antioxidantes que eviten su propagación podría evitar el desarrollo de las complicaciones de esta enfermedad. (Matough et al. 2012).

Por otra parte, una práctica para evitar la hiperglicemia postprandial es prevenir la absorción de carbohidratos después del consumo de alimentos. El tratamiento y control para los pacientes con DM tiene diferentes opciones farmacológicas tales como insulina

y otros fármacos que comprenden a los inhibidores de la α -glucosidasa, sulfonilurias, biguanidas y glinidas los cuales son usados de manera individual o combinados para controlar los niveles de glucemia en sangre. Sin embargo, la mayoría de estos fármacos presentan efectos adversos como distensión abdominal, flatulencia, meteorismo y diarrea (López-Martínez et al. 2014), y pueden perder su efectividad en caso del consumo prolongado en pacientes con diabetes crónica (Kumar 2007). Como consecuencia, se ha vuelto un gran reto la búsqueda de tratamientos antidiabéticos que no presenten efectos adversos. Además, los altos costos inherentes al tratamiento a largo plazo motiva a investigar nuevas alternativas terapéuticas seguras, efectivas y asequibles (Jung 2006; Kumar 2007).

Diferentes compuestos fitoquímicos tales como ácidos fenólicos y flavonoides con altas propiedades antioxidantes han demostrado ser buenos inhibidores de enzimas digestivas como α -amilasa, α -glucosidasa y lipasa pancreática (Mendoza y Medina 2015). La inhibición de estas enzimas por flavonoides está relacionada en función de un patrón específico de los grupos -OH de su estructura, los cuales tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con aminoácidos del sitio activo de las enzimas afectando directamente su actividad (Oboh et al. 2015).

3.6. Compuestos fenólicos y cáncer

De acuerdo con la OMS, el cáncer es un nombre asignado para un conglomerado de alrededor de 100 patologías que afectan a distintas partes del cuerpo humano, y se define según el Instituto Nacional del Cáncer como el desarrollo rápido de células anormales que se multiplican sin control más allá de sus límites habituales e invaden tejidos cercanos, pero que también pueden diseminarse a otras partes del organismo por medio del sistema sanguíneo o linfático (metástasis). La transformación de una célula normal a una célula tumoral se puede desencadenar por diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Dentro de los intrínsecos se encuentran los factores genéticos, obesidad y envejecimiento, y en los extrínsecos se encuentran la energía ionizante, los rayos UV, agroquímicos, tabaco, infecciones causadas por algunos virus y bacterias, entre otros.

Los productos naturales hoy en día juegan un rol relevante en la terapia del cáncer con un número sustancial de agentes anticancerígenos usados clínicamente, los cuales son obtenidos de varias fuentes como plantas, animales y microorganismos. De acuerdo con recientes investigaciones, se han encontrado numerosos compuestos en frutas y vegetales con actividad anticancerígena y antioxidante. Además, en diferentes estudios epidemiológicos se ha relacionado el consumo de alimentos de origen vegetal ricos en polifenoles con una menor incidencia en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Nobili et al. 2009).

El efecto anticancerígeno de los flavonoides se ha relacionado con diferentes mecanismos de acción, uno de ellos es la modulación de la actividad de la fase 1 del complejo enzimático P-450, disminuyendo la carcinogénesis ocasionada por xenobióticos (Moon et al. 2006). También pueden interferir en la detoxificación de agentes mutagénicos en la en en la metabolización de agentes mutagénicos modulando las enzimas de la fase II. Ciertos flavonoides interfieren en absorción del promotor tumoral en el tracto digestivo y capturan a los agentes mutagénicos impidiendo que llegue a su diana, siendo la quercetina y la genisteína los flavonoides más estudiados en ensayos *in vivo*. Por otro lado, la flavanona naringenina, las flavonas (baicaleina, crisina y galangina), e isoflavonas (biocanina A y genisteina,) han demostrado capacidad de inhibición la aromatasas (CYP19), enzima involucrada en la biosíntesis de estrógenos, lo que representa un beneficio en la prevención y el tratamiento del cáncer de mama y próstata (Moon et al. 2006; Cancino et al. 2001). Además, la genisteína puede inhibidor a la proteína cinasa de tirosina, enzima involucrada en la transformación maligna de distintos tipos de células. En estudios realizados por Álvarez y Orallo (2003) se encontró que los flavonoides presentes en la soya, y particularmente la genisteína inhiben la inducción estimulada por el factor de necrosis tumoral de moléculas de adhesión celular del endotelio vascular.

Es importante mencionar que es posible que ocurra un efecto benéfico con el consumo de ciertos alimentos contra algún tipo de cáncer y por otro lado no presentar efecto alguno frente a otro. Como ejemplo, en algunos estudios epidemiológicos se ha correlacionado una disminución en el riesgo de padecer cáncer de mama, esófago y estómago con el

consumo de té verde; sin embargo, no se observó ningún efecto en cuanto a la disminución del riesgo de padecer cáncer pancreático (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios epidemiológicos en los que se analiza el posible efecto de diversos alimentos vegetales o polifenoles puros frente al riesgo de padecer distintos tipos de cáncer en humanos

Alimento/ Polifenol	Población de estudio	Tipo de cáncer	Efecto
Té verde	♀	Cáncer de mama	Disminuye el desarrollo de cáncer.
	♀ y ♂	Cáncer pancreático	No disminuye el riesgo de padecer cáncer
	♀ y ♂	Cáncer esófago y gástrico	Reduce el desarrollo del cáncer.
Catequinas	♀	Cáncer rectal	Reduce el desarrollo del cáncer.
Café	♀	Cáncer de endometrio	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♀ y ♂	Cáncer colorectal	No disminuye el riesgo de cáncer
	♀ y ♂	Hepatocarcinoma	Disminuye el desarrollo de cáncer.
Soja	♂	Cáncer de pulmón	Disminuye el desarrollo de cáncer.
	♀	Cáncer de mama	Disminuye el desarrollo de cáncer.
	♀	Cáncer colorectal	Disminuye el desarrollo de cáncer.
Manzana	♀ y ♂	Cáncer de colon	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♀	Cáncer colorectal	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♂	Cáncer de pulmón	No disminuye el riesgo de padecer cáncer.
	♀	Cáncer de pulmón	Reduce el desarrollo del cáncer.
Quercetina	♂	Cáncer de pulmón	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♀ y ♂	Cáncer gástrico	Reduce el desarrollo del cáncer.

Fuente: Ramos (2008)

De igual manera, el consumo de café se ha relacionado con una disminución en el desarrollo de cáncer de endometrio y de hígado, sin embargo, no se encontró el mismo efecto inhibitorio en el riesgo de padecer cáncer de colon (Tabla1).

En otros estudios epidemiológicos se ha evaluado el efecto anticancerígeno de los polifenoles puros que se encuentran presentes en algunos alimentos de origen vegetal. Como ejemplos, el consumo de galato de epigallocatequina (EGCG) y la quercetina, se ha relacionado con una menor incidencia de cáncer colorrectal y de estómago

respectivamente (Tabla 1). No obstante, en algunas ocasiones, el efecto anticancerígeno de los polifenoles puros no muestran una correlación directa al efecto que presenta consumir los alimentos que los contienen abundantemente. Por ejemplo, la ingesta de quercetina ha mostrado una acción preventiva al cáncer de pulmón en hombres (Tabla 1), no obstante, el consumo de manzana se ha relacionado con una menor incidencia de cáncer de pulmón en mujeres, sin embargo, no mostró ningún efecto en la población masculina (Tabla 1).

De igual manera, los modelos animales son ampliamente usados para evaluar el potencial anticancerígeno de los polifenoles (Tabla 2). Se ha evaluado el efecto de los polifenoles del té en diversos modelos animales contra diferentes tipos de cáncer (piel, mama, estómago, esófago, intestino, cavidad oral, colon, vesícula biliar, hígado y próstata). Por ejemplo, la EGCG mostró una disminución en el desarrollo de cáncer de intestino en ratones. El mecanismo observado fue un decremento de las concentraciones de proteínas responsables de la proliferación celular cMyc, p-AKT y p-ERKs y el efecto se comportó de manera dosis-dependiente (Tabla 2). También, la EGCG interviene en las etapas de iniciación y progresión de cáncer de pulmón inducido por 4-metilnitrosamina-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) en hamsters y ratones (Tabla 2). Sin embargo, en otra investigación en un modelo de ratas, la EGCG adicionada en el agua que bebían no fue capaz de detener la progresión de cáncer de mama (Tabla 2). También, la quercetina redujo frenó el desarrollo tumoral en ratas Wistar albinas hembras con carcinoma mamario inducido por DMBA, además fue capaz de inhibir la progresión de lesiones preneoplásicas en la carcinogénesis hepática inducida por DEN y disminuye la tumorigénesis en ratas con cáncer de colon (Tabla 2). Por otra parte, la genisteína, isoflavona presente en la soya, parece desempeñar un papel importante protegiendo contra el desarrollo de diferentes tipos de cáncer en modelos animales. También, la ingesta de genisteína o una dieta enriquecida con soya reduce el desarrollo de cáncer de mama, la próstata y ovario en ratas (Tabla 2). De igual forma, la genisteína suplementada en la alimentación de ratones, fue capaz de inhibir el cáncer de piel inducido por radiación ultravioleta, así como la metástasis pulmonar (Tabla 2). En contraparte, se ha reportado que la misma isoflavona acelera la fase de iniciación tumoral inducida por DMBA en ratones inyectados con células MCF-7 (adenocarcinoma mamario) (Bhat et al. 2021).

Tabla 2. Estudio sobre el efecto anticancerígeno de polifenoles puros o alimentos ricos en polifenoles sobre animales de experimentación

Polifenol	Animal	Tipo de cáncer	Efecto
EGCG	Ratones	Intestino	Reduce el desarrollo tumoral
	Ratones	Pulmón	Disminuye el desarrollo del cáncer
	Hamsters	Pulmón	Disminuye el desarrollo del cáncer
	Ratas	Mama	No reduce el desarrollo tumoral
Quercetina	Ratas	Mama	Reduce invasividad del cáncer
		Hígado	Previene el desarrollo tumoral
	Ratas	Colon	Disminuye el desarrollo de cáncer
Genisteína	Ratas	Mama	Reduce el desarrollo tumoral
		Próstata	Disminuye el desarrollo tumoral
		Ovario	Reduce el desarrollo tumoral
	Ratones	Mama	Promueve la iniciación tumoral
	Ratones	Pulmón	Inhibe metástasis
	Ratones	Piel	Inhibe metástasis
Resveratrol	Ratas y ratones	Próstata	Reduce el desarrollo tumoral
		Mama	Inhibe actividad de DMBA
		Neuroblastoma	Inhibe acción de células Neuro-2A
Aceite de Oliva	Ratas	Colon	Reduce el cáncer asociado a alimentos fritos con otro tipo de aceites
		Mama	No promueve el cáncer inducido por DMBA
Café	Ratas	Mama	Reduce el numero de tumores
	Ratones	Hígado	Inhibe invasión y metástasis
Ácido clorogénico	Hamsters	Hígado	Inhibe acción de MAM

Fuente: Ramos (2008)

Los estilbenos, otro tipo de polifenoles también se han relacionado con el efecto quimiopreventivo en diferentes tipos de cáncer. En específico, se evaluó el efecto del resveratrol en ratas y ratones demostrando capacidad de inhibir el desarrollo de cáncer de próstata e impedir la actividad carcinogénica de inductores de cáncer de mama y neuroblastoma por DMBA y células Neuro-2A respectivamente (Tabla 2). Además, se

encontró que una dieta enriquecida con aceite de oliva impidió el desarrollo de cáncer mamario inducido por DMBA en ratas (Tabla 2). Incluso, se ha descrito que este de aceite también impide el desarrollo de cáncer de colon en ratas, provocado por una dieta con exceso de grasas saturadas (Tabla 2).

Por otra parte, los ácidos fenólicos que contienen los granos de café también han demostrado actividad anticancerígena en distintos modelos animales. Nagasawa et al. (1996) observaron que en ratones con la inclusión de granos de café en su dieta, redujeron la formación de tumores de mama. De la misma manera, Miura et al. (2004) reportaron una disminución de la metástasis en ratas con cáncer de hígado suplementadas con extracto de café (Tabla 2). Además, se observó una reducción de tumores hepáticos inducidos por MAM en hamsters cuando agregaron ácido clorogénico en sus dietas (Tabla 2). Se ha observado que los polifenoles que se obtienen con ingesta de alimentos ricos en ellos pueden intervenir en las diferentes etapas de desarrollo de la carcinogénesis mediante diferentes mecanismos (Figura 5). Sin embargo, su actividad dependerá del tipo de tejido o célula, así como las dosis y tiempo de tratamiento. El mecanismo anticancerígeno de los compuestos fenólicos se ha evaluado tanto en ensayos *in vitro* como en modelos animales, sin embargo, aún existe un gran vacío en el conocimiento de ellos.

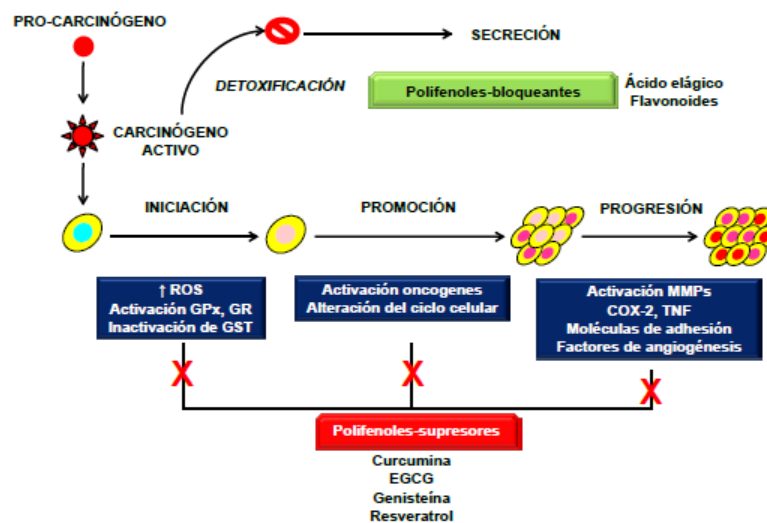


Figura 5. Fases de intervención de los polifenoles en el proceso de carcinogénesis. (Adaptado de Surh, Y.J. 2003)

Es bien sabido que una elevada presencia de EROS contribuye en la etapa de iniciación de la carcinogénesis. No obstante, en esta fase, la actividad antioxidante de los polifenoles influye en la prevención del daño al ADN provocado por radicales libres o xenobióticos cancerígenos inhibiendo así el proceso de iniciación de la carcinogénesis. Los mecanismos implicados en esta etapa son: la captación directa de los radicales libres, la quelación de cationes divalentes y la modulación de las enzimas de ambas fases del complejo P-450.

La quercetina ha demostrado tener efectos anticancerígenos debido a sus capacidad antioxidante. Este flavonol está implicado en la reducción en la aparición de tumores y en el aumento de los niveles de GSH y de la actividad de las enzimas antioxidantes (GPx, SOD y catalasa) en las primeras etapas del cáncer de hígado inducido por DEN al favorecer el sistema de defensa celular antioxidante. De la misma manera, la quercetina, la rutina y la EGCG, estimularon el sistema de defensa antioxidante celular al aumentar la cantidad de GSH y la expresión de enzimas antioxidantes como GPx en células HepG2. La genisteína y EGCG también son importantes eliminadores de radicales libres. La genisteína ha demostrado capacidad de protección a neuronas sometidas a estrés oxidativo inducido con hidroperóxido de terc-butilo (t-BOOH) y EGCG puede disminuir el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en células HepG2 mediante el incremento de GSH y otras enzimas antioxidantes. Sin embargo, otros polifenoles como hesperidina, luteolina, naringenina y apigenina no impidieron la apoptosis de células endoteliales (HUVEC) inducida por H₂O₂; sin embargo, cuando estas células se trataron con otros polifenoles (como EGCG o quercetina), si se observó inhibición de la apoptosis inducida por H₂O₂, además se restauró la viabilidad celular. Por otra parte, algunos compuestos fenólicos también se pueden comportar como agentes pro-oxidantes -según el tipo de célula, la dosis o el tiempo de exposición- aumentando la producción de EROS, induciendo apoptosis de las células carcinogénicas, impidiendo de esta manera el crecimiento tumoral. Como ejemplo, la quercetina y el EGC producen un aumento en los niveles celulares de EROS, induciendo la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468147 y cáncer de pulmón H661148, respectivamente. De igual manera, EGCG también induce la apoptosis en las células de mieloma al alterar el sistema redox (aumentando la producción de EROS).

3.7. Perfiles químicos y análisis metabolómicos

El metaboloma es el grupo de metabolitos sintetizados por un sistema biológico (Oliver et al. 1998) y los metabolitos son el producto final de la interacción entre genoma, transcriptoma y proteoma con el medio ambiente, por lo que están estrechamente relacionados con el fenotipo bioquímico de un sistema e incluyen importantes características nutricionales y toxicológicas. Una de las más importantes características de esta técnica consiste en realizar una caracterización cualitativa y cuantitativa de una gran cantidad de biomoléculas de sistemas dinámicos y complejos (Urrea-López 2014).

Lo frutos contienen entre sus metabolitos secundarios una gran diversidad de compuestos. Sin embargo, los compuestos fenólicos han sido los más estudiados ya que ha quedado demostrado la capacidad antioxidante que poseen y como consecuencia de esto, el beneficio en la salud humana (Coronado et al. 2015). Debido a la compleja heterogeneidad de estos compuestos, su caracterización se ha llevado a cabo mediante instrumentos analíticos de alta sensibilidad y selectividad. Entre ellos, el más ampliamente usado es la espectrometría de masas por ionización por electrospray (EM-IES), que opera a través de la formación de iones en fase gaseosa del material de estudio que se separan por la tasa de su masa a carga (m/z unidad adimensional obtenida de dividir el número de masa de cualquier ion por el número de su carga) (Murray et al. 2013). Por otro lado, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se ha establecido como una herramienta valiosa en la determinación de metabolitos, ya que permite separar y analizar con rapidez un gran número de muestras vegetales. Después de la separación de la mezcla de constituyentes por CLAR, el proceso IES transfiere moléculas pequeñas y medianas de la fase líquida a la fase gaseosa, para obtener moléculas protonadas (modo positivo) o desprotonadas (modo negativo) después de la transición; y en algunos casos (algunos compuestos altamente polimerizados, como los taninos, por ejemplo) iones con carga múltiple. Estos iones pueden aislarse y analizarse por espectrometría de masas para análisis estructural y propósitos de identificación (Allwood y Goodacre 2010).

La cromatografía líquida con detección de matriz de diodos (DAD) junto con la espectrometría de masas en tándem (EM/EM) se ha aplicado con éxito para proporcionar

estructuras provisionales de compuestos fenólicos en extractos de fuentes naturales. De hecho, el análisis del metaboloma basado en la técnica de huella dactilar CLAR-DAD-IES-EM/EM es una poderosa herramienta en fitoquímica (Allwood y Goodacre 2009), taxonomía de plantas y caracterización rápida de compuestos fenólicos en hierbas medicinales, plantas de cultivo y frutas comestibles (Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann 2010^{a,b}). Los compuestos fenólicos tales como flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos y taninos están muy extendidos en las plantas, a menudo se presentan en grandes cantidades, presentan varias actividades biológicas relevantes y pueden usarse como marcadores quimiotaxonómicos (Lima et al. 2009).

3.8. Frutos Silvestres

3.8.1. Ehretia tinifolia

Ehretia tinifolia L. (Boraginaceae) es un árbol siempre verde que alcanza más de 25 m de altura. El nombre común más usado en México es pinguica o pinguico. Se encuentra distribuido en América Central, el noreste de México, Cuba y Honduras. Esta planta es nativa del sur de México, pero está ampliamente distribuida en otros estados como Michoacán, Nayarit, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Nuevo León y Veracruz (Pío-León et al. 2012). *E. tinifolia* es parte de la selva tropical y del bosque y se encuentra desde 0 a 1400 m sobre el nivel del mar. Es plantado comúnmente en jardines y parques públicos debido a sus características ornamentales (Monroy-Ortíz y Monroy 2006). El tronco es usado como fuente de madera y con propósitos medicinales, mientras que las frutas son consumidas como alimento tanto de humanos como animales silvestres (Monroy-Ortíz y Monroy, 2006). Las infusiones de las hojas son utilizadas para tratar desórdenes nerviosos e inflamación de los riñones; la corteza es usada para tratar enfermedades respiratorias y para cicatrizar heridas (Benítez-Badillo et al. 2004; Monroy-Ortíz y Monroy 2006).

Los frutos de *Ehretia tinifolia* (Figura 6) son pequeñas drupas redondas de 8 mm de diámetro. Su color cambia de verde a amarillo en su madurez fisiológica, tornándose a roja-morada en su maduración. El género *Ehretia* se clasifica en *Ehretia* I, II y III basado en la morfología de la fruta; *E. tinifolia* pertenece al tipo II, con frutos con el endocarpo dividido en mitades (Gottschling y Hilger 2004). Los frutos son dulces y son consumidos en varias regiones de México, sin embargo sus características fisicoquímicas y nutricionales han sido escasamente estudiadas.



Figura 6. Frutos de *Ehretia tinifolia* (hswbiodiversity.org)

3.8.2. *Sideroxylon lanuginosum*

Sideroxylon lanuginosum es un árbol de mediano tamaño que alcanza de 2 a 9 m de altura y posee espinas. Forma parte de la familia Zapotaceae. Las hojas son pecioladas y fasciculadas en las ramas maduras. Las flores presentan ovario piloso y están agrupadas en cantidades de 3 a 15, y su corola mide de 3 a 4.5 mm de diámetro. El fruto conocido como

coma, es de color azul-violeta oscuro de forma elipsoidal a cilíndrico con una longitud de 7-13 mm (Figura 7); el fruto inmaduro contiene una gran cantidad de látex (Correl 1970 y Jhonston).



Figura 7. Frutos maduros de *Sideroxylon lanuginosum*

Los frutos son muy dulces, sin embargo, la presencia de látex puede llegar a lastimar el paladar cuando se consumen en gran cantidad. Se ha reportado su uso para la elaboración de dulces y mermeladas presentando características aptas para consumo humano (Rodríguez 1993). Hasta la fecha, no existen reportes sobre la composición nutricional o identificación de compuestos bioactivos en frutos de *Sideroxylon lanuginosum*.

3.8.3. *Arbutus arizonica*

Miembro de la familia Ericaceae, el árbol de esta especie puede alcanzar una altura de hasta 14 m. Sus flores poseen un cáliz verde pálido, ápice obtuso o redondeado; corola 5-5,6 mm; anteras 1.3-1.5 mm, espolones 1/2-2/3 veces la longitud de las tecas, (finamente tuberculados) y ovario con 2-5 óvulos por lóculo. Los frutos son bayas de color rojo negruzco (Figura 8) con un diámetro de 6,5-9 mm y contienen semillas de

aproximadamente 2 mm. La floración ocurre en los meses de mayo a agosto y los frutos de agosto a octubre. Esta especie se encuentra distribuida en el sudoeste de Estados Unidos y noroeste de México principalmente en los estados de Arizona, Nuevo México, Chihuahua, Durango, Jalisco, Sinaloa, Sonora y Zacatecas.

No existen reportes de la composición o actividad biológica de estas bayas, sin embargo en otra especie del mismo género (*Arbutus unedo*) se ha reportado actividad antioxidante y neuroprotectora (Mendes et al. 2011), atribuido a su alto contenido de flavonoides (32.37 mg/100 g), antocianinas, ácido elágico, vitamina C, vitamina E y carotenoides (Pallauf et al. 2008).



Figura 8. Flores y frutos de *Arbutus arizonica*

3.8.4. *Ziziphus obtusifolia*

Pertenece a la familia Rhamnaceae, es un arbusto que mide de 1 a 2 metros de altura con ramas densas y espinosas. Las flores son pequeñas de color verde y poseen 5 pétalos. Sus hojas miden de 1.8 a 3.8 cm y se disponen alternadamente de forma linear y oblongada en

las espinas. Los frutos son pequeñas drupas (1 - 1.2 cm de diámetro), redonda, negra y solitaria (Figura 9).

El fruto es comido por los zorros grises, mapaches y por varias especies de aves. Es comestible para los humanos, pero no es apetecible. Los indios Pimas los consumen en pequeñas cantidades (Sullivan 1993). *Z. obtusifolia* tiene uso en la medicina tradicional en México contra algunas enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades respiratorias, infecciones oculares, sífilis, gonorrea e infecciones estomacales (López e Hinojosa 1988).



Figura 9. Frutos de *Ziziphus obtusifolia*

No se han reportado estudios sobre la composición y actividad biológica de los frutos de *Ziziphus obtusifolia* como en otras especies de la familia Rhamnaceae. Estudios recientes en frutos de jujube (*Ziziphus jujube*) han demostrado sus efectos biológicos, tales como anticancerígenos, anti-inflamatorios, antiobesidad, inmunoestimulante, antioxidante, hepatoprotectivo y protector gastrointestinal. Estos efectos se relacionan a su contenido de vitamina C, fenoles, flavonoides, ácidos triterpénicos y polisacáridos (Plastina et al. 2012; Gao et al. 2013).

3.8.5. *Condalia hookeri*

Especie perteneciente a la familia Rhamaceae. Son arbustos o pequeños árboles de 2-3 metros de altura, muy espinoso y ramificado, que forma matorrales, con una copa delgada de ramas rígidas, ampliamente extendidas y hojas muy pequeñas. Las ramas nuevas son de color verde, y posteriormente se tornan gris con rayas marrones. Las hojas nuevas son de color verde lima, aparecen a principios de la primavera justo cuando las hojas del año anterior caen. Las hojas tienen forma de paleta, la parte más ancha más cerca del ápice con una punta pequeña, márgenes de lisos a ligeramente dentados hacia el ápice, el resto del limbo se estrecha hacia el pecíolo. Los frutos son esféricos, midiendo alrededor de 1 cm de diámetro, que van de color verde pasando por el rojo para terminar en negro dependiendo el estado de madurez. Las flores son pequeñas, verdes, y discretas. (Fernández-Nava, et al. 2013) (Figura 10). Esta especie se encuentra distribuida en el estado de Texas en Estados Unidos y Nuevo León y Tamaulipas en México.



Figura 10. Ramas con hojas y frutos de *Condalia hookeri*

3.8.6. *Pyracantha coccinea*

Pyracantha coccinea, comúnmente conocida como espino de fuego o piracanto pertenece a la familia Rosaceae. Es originaria del sureste de Europa hasta el Cáucaso, sin embargo, se ha naturalizado y también se cultiva como ornamental en muchas partes del mundo, incluyendo el norte de México. Es un arbusto de hoja perenne a semiperennifolio que normalmente crece hasta 2.5 a 3 m de alto y 3 m de ancho. Sus flores blancas aparecen en primavera en forma de racimos colgantes. Tiene hojas de color verde brillante y espinas en forma de aguja. Los frutos son pequeños pomos de color rojo anaranjado que permanecen durante el otoño e invierno. Los frutos son astringentes y son consumidos por diferentes especies de aves. El follaje es de hoja perenne en climas templados (Figura 11).

Los frutos son comestibles, pero al ser astringentes, se recomienda consumirlos cocinados; siendo utilizados estos para hacer jaleas, mermeladas, entre otras preparaciones culinarias.



Figura 11. Frutos maduros de *Pyracantha coccinea*

Los frutos de *P. coccinea* han sido utilizados en la medicina tradicional debido a sus propiedades diuréticas, cardiacas y tónicas. Estudios previos han demostrado que *P. coccinea* es rica en compuestos bioactivos como polifenoles, ácidos grasos y vitaminas, entre otros (Sarikurkcü y Tepe, 2015). Sin embargo, se ha investigado poco sobre la actividad biológica de los extractos polifenólicos de este fruto.

4. JUSTIFICACIÓN

En México, existen alrededor de 700 especies diferentes de frutos silvestres comestibles, las cuales representan el 5% del total de las especies de interés comercial del país. Además, las nuevas tendencias en la industria alimentaria apuntan hacia la preferencia por alimentos más sanos, ecológicos y de proximidad, por lo que es importante llevar a cabo estudios de estas especies para identificar alternativas agrícolas que representen ventajas desde el punto de vista nutricional, productivo y comercial. También a nivel global, se ha venido demostrando la preferencia de productos silvestres, lo cual apunta a una fácil incorporación de nuevos frutos nativos en el mercado actual, esto principalmente por sus características únicas como especies botánicas autóctonas. Así que el ampliar el conocimiento químico/biológico de frutos silvestres le dará un valor agregado a su posible uso en la elaboración de productos nutraceuticos o alimentos funcionales.

Para llevar a cabo esto, es necesario hacer una bioprospección para evaluar el potencial de los frutos silvestres como alimento funcional y nutraceutico, lo cual, generará conocimiento y una mayor comprensión de los recursos naturales regionales. Además del posible aprovechamiento agroindustrial de éstos, existe la posibilidad de contribuir en la búsqueda de productos bioactivos que puedan ser utilizadas en la prevención o tratamiento de diversas enfermedades.

5. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos retenidos en amberlita obtenidos a partir de los frutos silvestres *Ehretia tinifolia* (Pingüica), *Sideroxylum lanuginosum* (Coma), *Ziziphus obtusifolia* (Clepe), *Arbutus arizonica* (Madroño), *Condalia Hookeri* (Brasil) y *Pyracantha coccinea* (Piracanto) presentan actividad antioxidante, antidiabética y antineoplásica *in vitro*, y este efecto puede ser atribuido a la presencia de diferentes compuestos de naturaleza fenólica

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante, antidiabética y antineoplásica *in vitro* de los extractos metanólicos retenidos en amberlita obtenidos a partir de los frutos de *Ehretia tinifolia* (Pingüica), *Sideroxylum lanuginosum* (Coma), *Arbutus arizonica* (Madroño), *Ziziphus obtusifolia* (Clepe), *Condalia hookeri* (Brasil) y *Pyracantha coccinea* (Piracanto) así como determinar los perfiles fenólicos mediante el uso de cromatografía líquida acoplada a detectores de arreglo de diodos y espectrometría de masas (CLAR-DAD-EM/EM).

6.2 Objetivos particulares

1. Colectar el material vegetal y obtener los compuestos fenólicos mediante extracción en fase sólida con amberlita de los diferentes frutos silvestres de la región norte de México.
2. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos, determinando el contenido de flavonoides y fenoles totales, así como la actividad antioxidante mediante las técnicas de secuestro de radicales libres DPPH y ABTS.
3. Determinar la capacidad protectora de los extractos, de hemólisis de eritrocitos inducida por el radical AAPH.
4. Determinar efecto inhibitorio de los extractos sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y lipasa pancreática.
5. Determinar el efecto citotóxico y antiproliferativo de los extractos utilizando las líneas celulares MCF-7 (carcinoma mamario), HeLa (carcinoma cervicouterino), HT-29 (carcinoma de colon).
6. Realizar perfiles de compuestos fenólicos mediante el uso de cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos y espectrómetro de masas en tándem para interpretar y asignar una elucidación tentativa de los compuestos fenólicos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención del material vegetal

Los frutos se colectaron en el Norte México (Coahuila, Chihuahua y Nuevo León), en el estado de maduración óptima para cada especie. Los frutos se transportaron en bolsas de plástico cerradas inmediatamente después de la colecta al Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, manteniendo en todo momento la cadena de frío para evitar su deterioro. Una muestra de cada especie se depositó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas y fueron identificadas por el experto en botánica Dr. Marco Antonio Guzmán Lucio.

7.2 Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos se eliminaron de los frutos las partes no comestibles tales como hojas, tallos y semillas y se molieron en una licuadora (Osterizer) con agua destilada en una relación 1:10 p/v. El jugo obtenido se filtró y se pasó por una columna empacada con amberlita XAD7 HP y posteriormente se eluyó con 200 mL de metanol para recuperar los compuestos fenólicos. Por último, el solvente se eliminó usando un rotavapor a presión reducida. Los extractos se pesaron para calcular su rendimiento usando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{PES}}{\text{PM}} \times 100$$

Donde:

PES = peso del extracto

PM=peso de la muestra

Por último, se colocaron en viales de vidrio color ámbar para protegerlos de la luz y se almacenaron en refrigeración a 4° C para su posterior análisis.

7.3 Determinación de la capacidad antioxidante

Para medir la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de frutos se emplearon diferentes tipos de ensayo: Secuestro del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y DPPH^{\bullet} , que se describen a continuación:

7.3.1 Actividad antirradical por el reactivo DPPH^{\bullet}

La capacidad de los extractos para capturar el radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH^{\bullet}) se evaluó siguiendo la metodología propuesta por Braca et al. (2002) con algunas modificaciones. Los extractos de las frutas (1 mg/mL de MeOH) se mezclaron con una solución 150 μM de DPPH^{\bullet} en metanol en una relación de dilución 1:1 (v/v). Se determinó la absorbancia a 517 nm después de 30 min en la oscuridad usando un espectrofotómetro de microplacas (Agilent BioTek Epoch). El porcentaje actividad antirradical (AA) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{AA}\% = 100 - [(\text{As} - \text{Ac}) \times 100/\text{Ac}]$$

donde Ac y As son las absorbancias del control y las muestras, respectivamente. Se utilizó MeOH como control negativo y Trolox como control positivo. Las medias de los valores se obtuvieron a partir de experimentos por triplicado. Las actividades de captación de radicales se expresaron como la concentración efectiva media (CE_{50}) (mg/ml). La CE_{50} se calculó a partir de la curva de inhibición de dosis logarítmica obtenida mediante un algoritmo de regresión no lineal.

7.3.2 Actividad antirradical por el reactivo $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Este ensayo se llevó a cabo mediante la reacción que se basa en la capacidad de captura del radical 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiozolin-6-sulfonato) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). El $\text{ABTS}^{\bullet+}$ al ser oxidado por persulfato de potasio presenta una coloración verde intenso. El protocolo para la preparación de la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se describe en la Figura 12 (Re et al. 1999). En una microplaca de 96 pozos, se añadieron 20 μL del extracto de cada fruto y 200 μL de la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, después de mezclarlos bien, se incubaron durante 20 minutos en

oscuridad a 30° C. Posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de microplacas (Agilent BioTek Epoch). Los resultados fueron comparados con una recta de calibrado preparada con concentraciones de trolox de 0-1000 mM los resultados se expresaron como milimoles equivalentes de trolox (ET) por 100 gramos de fruto fresco (Gupta et al. 2009).

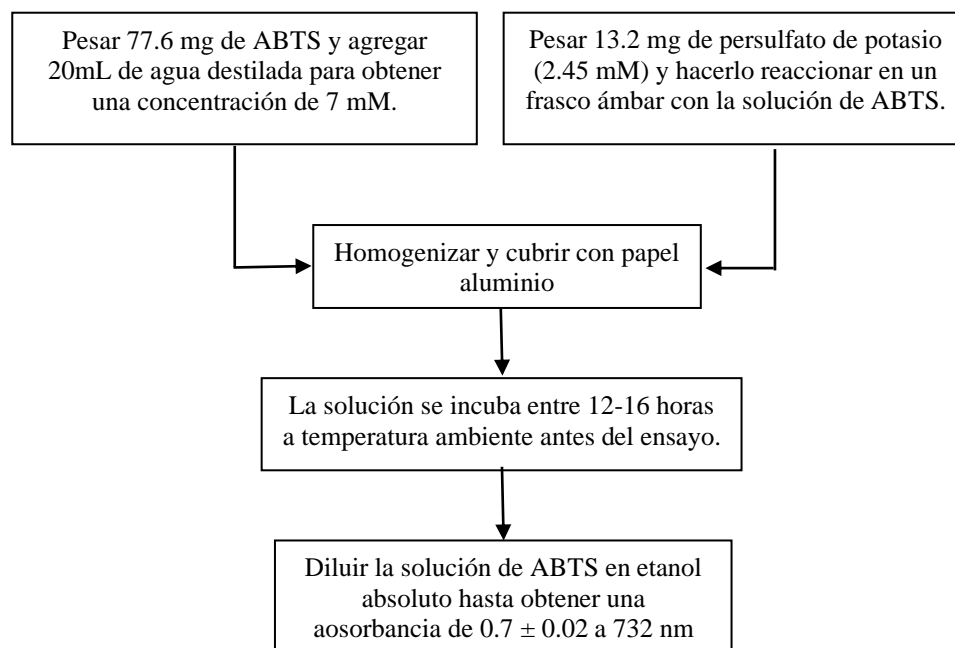


Figura 12. Protocolo para la preparación de la solución de ABTS•+ (Re et al. 1999)

7.3.3. Protección de hemólisis de eritrocitos inducida por el radical AAPH

Los eritrocitos son células modelo muy utilizadas para estudiar el mecanismo de daño oxidativo y toxicidad en membranas biológicas; además de ser muy fácil obtenerlas y prepararlas, representan un modelo muy simple al carecer de núcleo y organelos (Singh y Rajini 2008).

La hemólisis fue inducida por radicales peroxilo generados por AAPH (2-2'-Azobis diclorhidrato 2-amidinopropano) según la metodología de Silva-Beltrán et al (2019). Para este ensayo se recolectaron 10 mL de sangre de voluntarios humanos sanos por venopunción en tubos con EDTA como anticoagulante. Los eritrocitos se separaron del

plasma por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron con 5 volúmenes de PBS (37 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, Na₂HPO₄ 8 mM y KH₂PO₄ 2 mM p/v, pH 7.4). El lavado se repitió 3 veces mezclando y centrifugando por 2 minutos con el fin de eliminar otras células y residuos del medio. El precipitado se suspendió en 4 volúmenes de PBS para obtener una densidad de 8×10^9 células/mL.

Para el ensayo, la suspensión de eritrocitos (250 μ L) se mezcló con 250 μ L de los extractos disueltos en PBS a concentraciones de 500, 750, 1000, 2000 μ g/mL y 250 μ L de AAPH 300 mM en PBS. La mezcla de reacción se agitó suavemente mientras se incubaba a 37 °C durante 3 h. Después de la incubación, la mezcla de reacción se diluyó con ocho volúmenes de PBS y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. La absorbancia del sobrenadante se midió en un lector de microplacas (Agilent BioTek Epoch) a 540 nm. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [AAAPH - A_s] / [AAAPH \times 100]$$

donde AAAPH es la absorbancia de AAPH a 540 nm y A_s es la absorbancia de los extractos a 540 nm. La concentración del extracto que proporciona una inhibición del 50 % (IC_{50}) se calculó a partir de la curva dosis-respuesta obtenida al representar gráficamente el porcentaje de inhibición de la hemólisis frente a la concentración del extracto. Se utilizó ácido ascórbico como control positivo y PBS como control negativo. Para estos cálculos se realizaron tres experimentos independientes.

7.4 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

Para la cuantificación de fenoles se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cuál debido a su carácter reductor produce una reacción de óxido/reducción. Los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico se reducen al interactuar con los compuestos fenólicos originando óxidos azules que pueden ser detectados a 765 nm. Para la determinación de los compuestos fenólicos se siguió la metodología Singleton y Rossi (1965) adaptado a microplaca de 96 pozos. Los extractos se disolvieron en agua destilada a una concentración de 0,1 mg/mL. Posteriormente, se colocaron 30 μ L de cada extracto, 150 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v en agua destilada) y 120 μ L de una

solución acuosa de Na_2CO_3 (7.5% p/v) en una placa de 96 pozos y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 765 nm en un lector de microplacas (Agilent BioTek Epoch). Se utilizaron soluciones de ácido gálico como estándares (rango de concentraciones de 10–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua destilada) ($y = 0,0681x + 0,0732$; $R^2 = 0,9848$), y los resultados fueron expresado en miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de peso fresco (PF). Los datos se reportaron como la media \pm DE de tres repeticiones.

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio (Wong-Paz et al. 2014; Herald et al. 2012). Los extractos se diluyeron con MeOH (1 mg/mL). Posteriormente, se mezclaron 250 μL de extracto o solución estándar de (+) Catequina (rango de concentración de 50–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MeOH) con 1000 μL de agua destilada y 75 μL de solución de NaNO_2 (7% p/v en agua destilada). Después de 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 75 μL de solución acuosa de AlCl_3 (10% p/v). Un minuto después, se añadieron 500 μL de NaOH 1 M y 600 μL de agua destilada y se mezclaron vigorosamente. Se midió la absorbancia en la mezcla de reacción a 496 nm. Los valores de la curva de calibración $y = 0,0124x + 0,0173$; $R^2 = 0,9995$ se utilizaron para calcular los resultados, los cuales se expresaron como mg (+) de catequina eq./100 g de peso fresco (PF). Los datos se reportaron como la media \pm DE de tres repeticiones.

7.5 Actividad inhibitoria de enzimas digestivas

7.5.1 Inhibición de α -glucosidasa

La actividad inhibidora de la α -glucosidasa se evaluó según el método cromogénico descrito por Kaskoos (2013), con algunas modificaciones. Después de pre-incubar la enzima (0.8 U/mL en PBS 0.25 M, pH 6.8, DMSO 1%, v/v) a 37°C por 15 min, se agregaron a una microplaca de 96 pozos, 50 μL de la enzima y 50 μL de la muestra disuelta en PBS, y se incubó durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 50 μL de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (PNPG) 625 μM , volviéndose a incubar por 15 min. Por último, se detuvo la reacción agregando 100 μL de Na_2CO_3 0.2 M y se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplacas UV-visible (Agilent BioTek Epoch). El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad} = [Ac - As/Ac] \times 100$$

donde Ac y As son la absorbancia del control y la muestra, respectivamente. Se utilizó acarbosa como control positivo y solución de PBS como control negativo. La concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) se calculó utilizando un análisis logit.

7.5.2 Inhibición de α -amilasa

La actividad inhibitoria de la α -amilasa se evaluó según Sudha et al (2011) con algunas modificaciones. Se mezcló la enzima α -amilasa (1 U/mL) disuelta en PBS (pH 6.8) con diluciones seriadas de los extractos (5 mg/mL) disueltos en solución de PBS (pH 6.8, DMSO 1%, v/v) en una dilución 1:1 (v/v) y se incubó en una placa de 96 pozos a 37 °C durante 15 min. Luego, se añadieron a cada pocillo 50 μ L de solución de almidón al 0,5 % en PBS y la reacción se incubó durante 20 min a 37 °C. La reacción se detuvo con 20 μ L de HCl 1 M, seguido de la adición de 50 μ L de reactivo de yodo (3 mM I₂ y 30 mM KI). Por último se midió la absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplacas UV-visible (Agilent BioTek Epoch). El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad} = [Ac - As/Ac] \times 100$$

donde Ac y As son la absorbancia del control y la muestra, respectivamente. Se utilizó acarbosa como control positivo y solución de PBS como control negativo. Los valores de IC₅₀ se calcularon utilizando un análisis logit.

7.5.3 Inhibición de lipasa pancreática

La actividad inhibitoria de la lipasa pancreática se determinó según Maqsood *et al* (2017) con ligeras modificaciones, usando palmitato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPP) como sustrato. En condiciones de reacción, la enzima lipasa hidroliza *p*-NPP para liberar *p*-nitrofenol, una sustancia de color amarillo que se puede medir a 410 nm. La lipasa pancreática (2.5 mg/mL) se disolvió en solución de fosfatos PBS (60 mM, pH 8). En una microplaca de 96 pozos, se mezclaron 100 μ L de diluciones seriadas de los extractos (5 mg/mL) u Orlistat con 30 μ L de solución de lipasa. Se incubó durante 15 min a 37 °C. Luego, se agregaron

10 μ L de sustrato *p*-NPP (10 mM en DMSO). Después de incubar la mezcla durante 30 min a 37 °C, se midió su absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Agilent BioTek Epoch). El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad} = [Ac - As/Ac] \times 100$$

donde Ac y As son las absorbancias del control y la muestra, respectivamente. Se utilizó Orlistat como control positivo. Los valores de IC₅₀ se calcularon mediante análisis de regresión logarítmica.

7.7 Actividad antineoplásica

Los modelos de células cultivadas *in vitro* son una útil herramienta en la evaluación de la actividad de fármacos y metabolitos de distinto origen. Para esta investigación se utilizaron las líneas celulares cancerosas: MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano; ATCC® HTB-22), HeLa (adenocarcinoma cérvico humano; ATCC® CCL-2) y HT-29 (adenocarcinoma de colon humano; ATCC® HTB-38).

Las distintas líneas celulares almacenadas en nitrógeno líquido se descongelaron y posteriormente se propagaron en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) mezclado con nutrientes de Ham (Ham's F-12) y suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB), ajustando el pH a 7.2. Se agregó una mezcla de antibióticos compuesta por penicilina y estreptomicina (10,000 UI/mL:10,000 μ g/mL; 1mL de mezcla/1L de medio). Las células se propagaron en cajas de cultivo estériles de 25 cm² y se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% aire, a 37°C.

Para la comprobación de viabilidad, las células se trataron con una solución de tripsina (0.0025%-EDTA 0.03%) durante 5 min a 37°C. Se tomó una alícuota de la suspensión obtenida y se llevó a cabo una tinción con azul de tripano al 4% y un conteo en cámara de Neubauer.

Se utilizó el ensayo de azul de alamar (resazurina) para determinar la viabilidad celular. Las células vivas son metabólicamente activas y tienen la capacidad de reducir la resazurina (azul no fluorescente) a resorufina (rojo altamente fluorescente), mediante

oxido-reductasas mitocondriales. De esta manera, la función mitocondrial puede ser relacionada con la medida de la fluorescencia obtenida de la resazurina (Zhang et al. 2004).

Para el ensayo se utilizaron microplacas de 96 pozos donde se colocaron 5000 células por pozo y se incubaron durante 24 h. Posteriormente se agregaron 100 μL de los diferentes extractos a concentraciones de 2000, 750, 500 y 125 $\mu\text{g/mL}$ de PBS y se incubaron otras 24 h. Por último, se agregaron 20 μL de resazurina cada pozo y se incubó por 4 h en agitación. Transcurrido el tiempo las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación 535 nm y 595 nm de emisión en un lector de placas (FLx800 Bio-Tek Instruments, INC) (Viveros-Valdéz et al. 2010).

Se realizaron tres ensayos independientes con cinco repeticiones cada uno. Los resultados se evaluaron con probit, donde se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo de muerte celular se utilizó Taxol y como control negativo DMSO al 1%, concentración que se utilizó para para disolver los extractos.

7.8 Perfiles químicos de compuestos fenólicos mediante CLAR-DAD-EM/EM

Los perfiles de compuestos fenólicos de los extractos se obtuvieron utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta presión (CLAR) (Hewlett-Packard 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una columna de fase reversa Spherisorb S3 ODS-2 (80 \AA , 3 mm, 4.6 mm \times 150 mm) C-18 (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) a 35 $^{\circ}\text{C}$. Las fases móviles empleadas fueron ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua (disolvente A) y acetonitrilo grado CLAR al 100% (disolvente B). La elución se realizó a una velocidad de 0.5 mL/min y el gradiente se estableció de la siguiente manera: de 0% a 10% B durante 3 min, de 10% a 14.5% B durante 34 min, de 14.5% a 20% B por 3 min, de 20% a 35% B por 15 min y de 35% a 60% B por 5 min (Tabla 3). Los espectros de absorción se registraron entre 220 y 600 nm, y la detección se realizó a 250, 280, 330 y 370 nm mediante un detector de arreglo de diodos (DAD). El sistema de HPLC se acopló a un espectrómetro de masas API 3200 (AB Sciex LLC, Framingham, MA, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electropulverización y un analizador de masas con trampa de iones lineal de triple

cuadrapolo, controlado por el software Analyst 5.1. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo negativo (Cittadini et al. 2018). Para el análisis de flavanoles y ácidos fenólicos se establecieron las siguientes condiciones: potencial de desagrupamiento en 40 V, el potencial de entrada y el voltaje de pulverización de iones se establecieron en 40 V, 7 V y 5000 V, respectivamente, mientras que GS1 GS2 y el gas de cortina se establecieron en 40 psi, 50 psi y 20 psi, respectivamente, con gas de colisión "alto". Se realizó un análisis de masa completa (energía de colisión 10 V) y un análisis EM/EM (energía de colisión 25 V). Para la caracterización de los extractos se utilizó 1 mg de extracto seco de cada fruto resuspendido en agua deionizada. El tiempo de retención, los espectros UV-vis, el ion original y los datos del patrón de fragmentación se usaron para la identificación del compuesto. Los fragmentos obtenidos en el análisis EM/EM de cada compuesto se compararon con los patrones de fragmentación reportados en la literatura para diferenciar entre isómeros.

Tabla 3. Método de gradiente de concentración de solventes para la separación de los compuestos fenólicos por CLAR

Solvente B		
desde (%)	hasta (%)	tiempo (min)
0	10	3
10	14.5	34
14.5	20	3
20	35	15
35	60	5

Nota: El % diferencial corresponde al solvente A

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza de una vía utilizando el programa de análisis estadístico SPSS (versión 18). Se consideró significancia estadística a $p < 0,05$. Los valores se expresaron como media \pm DE (n = 3). Las diferencias observadas entre las medias se realizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la comparación de medias por pares de Tukey.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Rendimientos de los extractos

Los rendimientos de los extractos de los diferentes frutos se muestran en la Tabla 4, en los cuales se puede observar rendimientos entre 0.49 y 1.05%. Siendo el fruto de *Syderoxylon lanuginosum* el de mayor rendimiento y el menor el extracto de *Condalia Hookeri*.

Tabla 4. Porcentaje de rendimientos obtenidos de los extractos de frutos silvestres

Extracto	Rendimiento (%)
<i>Ehretia tinifolia</i> (Pingüica)	0.86
<i>Sideroxylum lanuginosum</i> (Coma)	1.05
<i>Ziziphus obtusifolia</i> (Clepe)	0.54
<i>Arbutus arizonica</i> (Madroño)	0.65
<i>Condalia Hookeri</i> (Brasil)	0.49
<i>Pyracantha coccinea</i> (Piracanto)	0.36

9.2 Contenido de fenoles totales (CFeT), contenido de flavonoides totales (TFIC), actividad antirradical y antioxidante

La cantidad de compuestos fenólicos presentes en los frutos está determinada por el proceso de extracción, el genotipo, y las condiciones ambientales. Es conocido que los polifenoles desempeñan un papel importante como antioxidantes en la nutrición humana y las diferencias en el contenido de polifenoles puede ser de relevancia desde un punto de vista nutricional. El contenido de fenoles totales (CFeT) de los diferentes extractos de frutos varió en el rango de 10.5 ± 0.9 mg GAE/100 g PF hasta 64.7 ± 2.6 mg GAE/100 g P.F., siendo *E. tinifolia* el que presentó mayor contenido de CFeT y *P. coccinea* el más bajo (Tabla 5). Todos los extractos de este estudio mostraron mayor CFeT que los extractos etanólicos de frutos silvestres *Prunus spinosa*, *Rosa canina* y *Rubus sanctus* (0.29 ± 0.02 , 0.23 ± 0.02 y 0.42 ± 0.02 mg GAE/g PF, respectivamente) (Turker 2012). Por otra parte, Pio-León et al. (2012) evaluaron el contenido de fenoles de frutos de *E.*

tinifolia, y encontraron mayores concentraciones en el extracto metanólico (125.45 ± 2.9 mg/100g F.W.) que en el extracto etanólico (50.25 ± 6.85 mg/100g P.F.). Schmeda-Hirschmann *et al.* (2005) determinaron el CFeT en extractos de *Sideroxylon obtusifolium*, y fue menor (4.71 ± 0.06 g EAG/kg P.F.) comparado con el contenido de *S. lanuginosum* en este estudio. El CFeT de *E. tinifolia* es comparable con los frutos silvestres *Eulychnia acida Phil.* (80.6 ± 2.2 mg EAG/100 g P.F.) (Jiménez-Aspee *et al.*, 2014), *Garcinia atrovirdis* (68.45 ± 0.9 mg EAG/100g P.F.) y *Durio zibenthinus* (64.57 ± 3.43 mg EAG/100g P.F.) (Ikram *et al.* 2009).

Tabla 5. Contenido de fenoles totales, contenido de flavonoides totales, y capacidad antioxidante/antirradical de extractos de frutos silvestres del norte de México.

Fruto	CFeT mg EAG/100 g PF	CFIT mg CA/100 g PF	TEAC μ M/g	*DPPH	*Inhibición de hemólisis
<i>E. tinifolia</i>	64.7±2.6	6.4±0.4	2454±3.8	0.32	58.55
<i>S. lanuginosum</i>	21.4±1.5	9.85±0.9	4134±9.7	0.48	61.76
<i>Z. obtusifolia</i>	18.84±4.1	2.61±0.7	ND	>1	1153.13
<i>A. arizonica</i>	15.92±3.2	2.53±0.3	1078±4.9	0.89	358.07
<i>C. hookeri</i>	19.45±2.8	2.35±0.5	ND	>1	899.06
<i>P. coccinea</i>	10.51±0.9	1.2±0.2	ND	>1	451.34
**Control	—	—	—	13±2	289±20

** Para en ensayo de DPPH e inducción de hemólisis por AAPH se utilizó Trolox y ácido ascórbico respectivamente.

Para la determinación cuantitativa del contenido total de flavonoides (CFIT) se realizó una curva de calibración ($y = 0.0124x + 0.0173$; $R^2 = 0.9995$) y los resultados se expresaron en equivalentes de catequina por 100 g/PF (Tabla 4). El contenido de flavonoides en los extractos de los diferentes frutos osciló entre 6.42 y 1.2 mg CA/100g PF. *S. lanuginosum* y *E. tinifolia* tuvieron el mayor contenido de flavonoides (6.42 ± 0.9 y 5.1 ± 0.4 y 36.95 ± 0.44 mg QE/g respectivamente), mientras que las cantidades más pequeñas de flavonoides se encontraron en el resto de los frutos, siendo *P. coccinea* el que presentó el contenido más bajo (Tabla 5).

Los flavonoides son metabolitos secundarios con actividad antioxidante, cuya potencia depende del número y posición de los grupos OH libres (Panche *et al.* 2016). Los extractos de *S. lanuginosum* y *E. tinifolia* mostraron un contenido de flavonoides más alto que los

reportados por Recuenco *et al* (2016) para extractos de los frutos de *Litchi chinensis* (6 ± 1 mg CA/100 g PF), *Citrus reticulata* (4 ± 1 mg CA/100 g PF) y *Persea americana* (2 ± 1 mg CA/100 g PF). En otro estudio se evaluó, el contenido de flavonoides en extractos de frutos de *Ceratonia siliqua* con diferentes solventes, encontrándose fluctuaciones entre 0 y 98.7 ± 2.4 mg CA/100 g PF (Goulas et al. 2019). Estos resultados sugieren que el contenido total de flavonoides se vio fuertemente determinado por el solvente utilizado para la extracción. Por lo tanto, los bajos contenidos en flavonoides obtenidos en este estudio pudieran deberse al método de extracción utilizado.

La capacidad antioxidante y antirradical se midieron utilizando tres ensayos diferentes incluidos los ensayos *in vitro* usando los radicales DPPH• y ABTS^{•+} y la inhibición *ex vivo* de la hemólisis en eritrocitos inducida por AAPH, la cual se resume en la Tabla 5. Como se puede observar, en todas las determinaciones, el extracto con mayor actividad antioxidante fue *E. tinifolia*, seguido por *S. lanuginosum*. Los extractos de *Z. obtusifolia*, *A. arizonica*, *C. hookeri* y *P. coccinea* mostraron una baja actividad antioxidante, correlacionándose con la cantidad de compuestos fenólicos totales determinados. Las actividades antirradicales DPPH• de *E. tinifolia* ($CE_{50} = 0.32 \pm 0.03$ mg/mL) y *S. lanuginosum* ($EC_{50} = 0.48 \pm 0.05$ mg/mL) fueron más altas que las reportadas para otras frutas silvestres. Los extractos de pulpa y cáscara de la fruta de *Cydonia oblonga* mostraron actividades de captación de radicales libres DPPH• (CE_{50} de 0.6 y 0.8 mg/mL, respectivamente) (Magalhães et al. 2009). y el extracto XAD7 de *Prumnopitys andina* reportó una CE_{50} de 0.93 ± 0.03 mg/mL (Jiménez-Aspee et al. 2019).

Por otra parte, en el ensayo de ABTS^{•+}, *A. arizonica* mostró un valor de capacidad antioxidante equivalentes en Trolox (CAET) más bajo (1078 ± 4.9 μ M/g), seguido de *E. tinifolia* (2454 ± 3.8 μ M/g), siendo *S. lanuginosum* (4134 ± 97 μ M/g) el que presentó menor actividad contra este radical. Si embargo, estos frutos presentaron mayor actividad antirradical con respecto a otros frutos silvestres como *Prunus espinosa* (5080 μ M/g), *Rubus ulmifolius* (4810 μ M/g) y *Arbutus unedo* (4480 μ M/g) (Ruíz-Rodríguez 2014).

La medición de la hemólisis oxidativa en las membranas de los eritrocitos representa un buen modelo para estudiar los compuestos antioxidantes y prooxidantes. Para este ensayo

se usó AAPH como generador de radicales peroxilo para inducir hemólisis en eritrocitos humanos. La mayor capacidad protectora sobre glóbulos rojos humanos la mostraron los extractos de *E. tinifolia* y *S. lanuginosum* con valores de IC₅₀ de 58.55 µg/mL y 61.76 µg/mL, respectivamente (Tabla 5). Los demás extractos mostraron ligera inhibición de hemólisis mostrando valores de IC₅₀ en el rango de 358 a 1153.13 µg/mL, siendo *Z. obtusifolia* el extracto que mostró menos protección. Nuestros resultados son comparables con los obtenidos con la epicatequina (valor de IC₅₀ de 42.3 µg/mL) (Mitjans et al. 2004), un conocido flavonoide antioxidante que ha reportado efectos beneficiosos para la salud (Prakash et al, 2018; Shay et al, 2015). En comparación con otros extractos de frutas, como *Cydonia oblonga* (IC₅₀ = 652 µg/mL) (Magalhães 2004) y *Mangifera indica* (520 µg/mL mostró un 35 % de inhibición de la hemólisis) (Vega 2011), los extractos de *E. tinifolia* y *S. Lanuginosum* presentaron mayor capacidad antioxidante en un modelo *ex vivo*.

9.3 Análisis de perfiles fenólicos por CLAR-DAD-EM/EM

Después de la determinación del contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante se seleccionaron los frutos de *E. tinifolia* y *S. lanuginosum* para la determinación de los perfiles fenólicos por CLAR-DAD-EM/EM, ya que fueron los que presentaron mayor contenido de fenoles y por consecuencia mayor actividad biológica. Los frutos de *E. tinifolia* (Figura 12) contienen principalmente derivados tanto de los ácidos hidroxibenzoicos, como ácido gálico y siríngico, como de los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico. Sin embargo, en el análisis de masa se observó que los compuestos más abundantes en el extracto de *E. tinifolia* produjeron iones pseudomoleculares m/z 359 y 537, los cuales pueden atribuirse al ácido rosmarínico (AR) y a diferentes derivados del ácido litospérmico (Figura 13). Así, el compuesto 30, que mostró un tiempo de retención de 51.02 min (Figura 14), se identificó como AR, con base en su ion original (m/z 359) y su patrón de fragmentación, que fue el siguiente: fragmento en m/z 359 correspondió al ion radical RA [MH-C₁₈H₁₆O₈]-; fragmento a m/z 197, al ión radical del ácido 3,4-dihidroxifeniláctico [M-H-C₉H₁₀O₅]-; y fragmento a m/z 179, al ion radical del ácido cafeico [M-H-C₉H₈O₄]-. Otros fragmentos de iones obtenidos para este compuesto fueron el fragmento en m/z 161 [M-H-C₉H₇O₃]-, que se puede atribuir al ion

acilonio y el fragmento en m/z 135, correspondiente a $[M-H-C_8H_6O_2]^-$. Estos mismos fragmentos se encontraron en los compuestos 27, 28 y 29, sólo que mostraron otras señales que correspondían a fragmentos de azúcares no determinados.

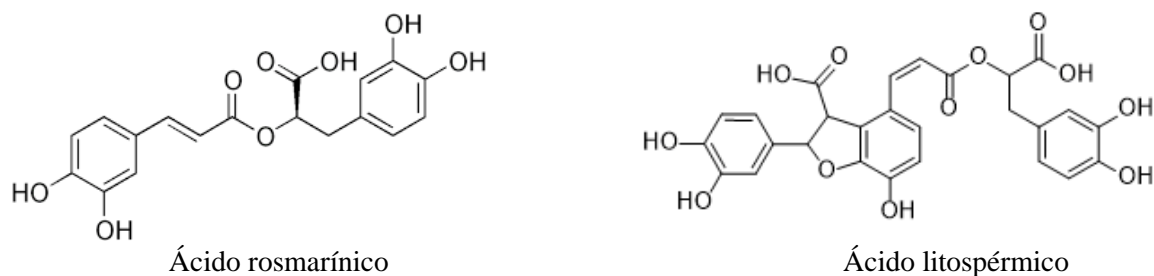


Figura 13. Estructuras químicas del ácido rosmarínico y ácido litospérmico

Los compuestos 20 a 25 se identificaron como derivados del ácido litospérmico, los cuales se consideran isómeros ya que mostraron el mismo ion pseudomolecular a m/z 625, con el ion del fragmento principal detectado en m/z 537 ($C_{27}H_{22}O_{12}$), que puede identificarse como ácido litospérmico (Tabla 6). Además, el ion fragmentado a m/z 493 $[MH]^-$ puede formarse por la pérdida de CO_2 (44 Da) del ion a m/z 537, mientras que los iones fragmentados a m/z 295 $[MH-CO_2-C_9H_{10}O_5]^-$ y m/z 312 $[MH-C_9H_8O_4]^-$ se derivaron del ion en m/z 493 debido a la pérdida de iones de fragmentos $C_9H_{10}O_5$ y $C_9H_8O_4$. Estos fragmentos son los informados por Huang et al.(2020) para el ácido litospérmico. Tanto el AR como los derivados del ácido litospérmico podrían ser los compuestos fenólicos responsables de la actividad biológica de estos extractos, ya que se ha reportado que el AR es un compuesto con una importante actividad antioxidante y antineoplásica (Viveros-Valdéz et al. 2010), y se sabe que el ácido litospérmico y sus ésteres mono y dimetílicos inhiben la adenilato ciclasa, enzima que modula el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo celular (Lu y Foo 2002).

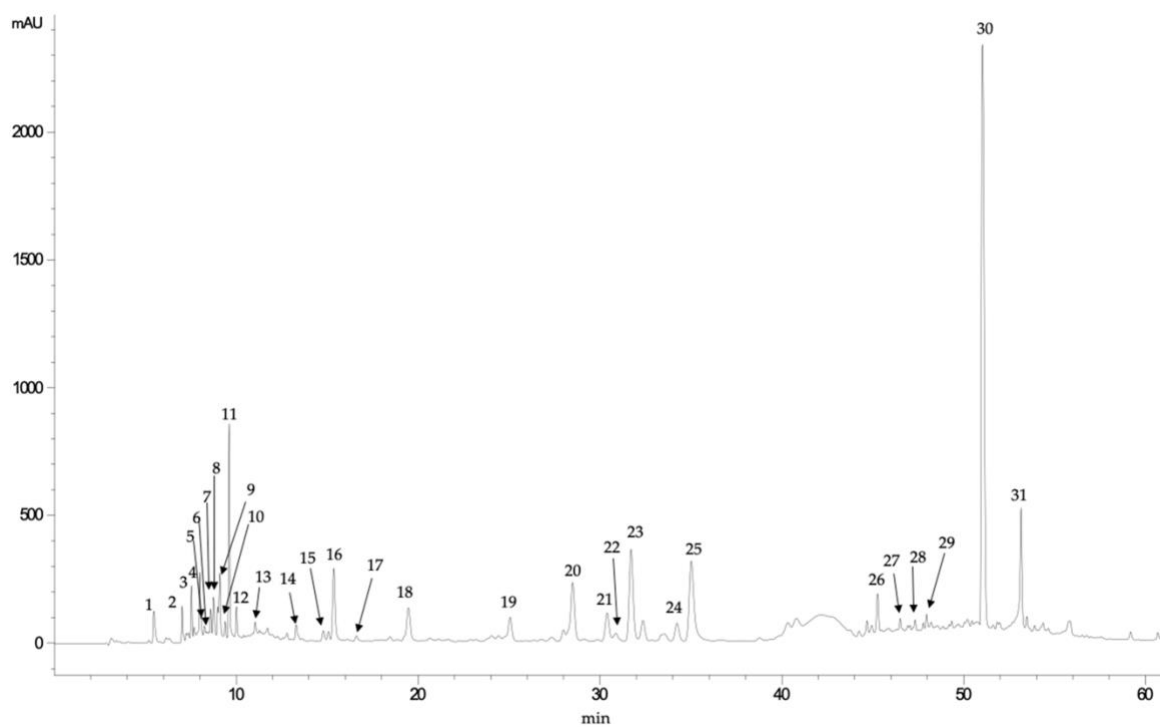


Figura 14. Cromatograma del análisis de compuestos fenólicos de *E. tinifolia* (registrado a 280 nm)

Tabla 6. Identificación tentativa de compuestos fenólicos del extracto de *E. tinifolia* determinada por HPLC-DAD-MS/MS

Pico	TR (min)	UV max	[M+H] ⁺	MS/MS fragmentos	Identificación tentativa
1	5.46	261	297.4	135	desconocido
2	7.01	281	191.2	173, 129, 111	Ácido quínico
3	7.53	262	373.0	311, 285, 267, 249, 241, 227, 196	desconocido
4	7.98	252, 275 (h)	282.5	150, 133	desconocido
5	8.07	301	331.3	169, 125	Galoil-glucosa
6	8.58	282	507.2	489, 459, 293, 233, 195, 131, 125, 113	derivado del ácido cafeico
7	8.74	280, 314 (h)	165.0	137	desconocido
8	8.96	279	507.2	233, 165, 150, 125	desconocido
9	9.08	276	719.0	515, 359, 197, 179, 135	derivado del ácido rosmarínico
10	9.38	272	515.0	269, 251, 225, 213, 179, 159, 135, 109	desconocido
11	9.60	278	359.0	197, 179, 135	Ácido siríngico hexósido
12	10.00	281	521.0	197, 179, 135	Ácido siríngico dihexósido
13	11.03	272	165.0	150, 121	desconocido
14	13.28	278, 320 (h)	401.0	359, 341, 297, 197, 179, 135	desconocido
15	14.78	278, 314	365.4	323, 262, 250	desconocido
16	15.06	311, 292 (h)	373.0	211, 179, 123	Metil rosmarinato
17	15.35	281, 330 (h)	567.0	179, 135	Derivado del ácido cafeico
18	19.45	291, 322	179.0	135	Ácido cafeico
19	25.04	276	863.0	701, 521, 359, 315, 297, 197, 135	Ácido siríngil-rosmarínico dihexósido
20	28.48	276	695.5	579, 554, 537, 493, 312, 295, 277, 203, 135	Derivado del ácido litospérmico
21	30.38	276	695.5	579, 554, 537, 493, 312, 295, 277, 203, 135	Derivado del ácido litospérmico
22	31.69	276	695.5	579, 554, 537, 493, 312, 295, 277, 203, 135	Derivado del ácido litospérmico
23	32.35	276	695.5	579, 554, 537, 493, 312, 295, 277, 203, 135	Derivado del ácido litospérmico
24	34.22	276	695.5	579, 554, 537, 493, 312, 295, 277, 203, 135	Derivado del ácido litospérmico
25	35.01	276	695.5	579, 554, 537, 493, 312, 295, 277, 203, 135	Derivado del ácido litospérmico
26	45.25	275, 330 (h)	597.4	579, 509, 491, 355, 337, 329, 311, 293, 267, 239, 197, 179, 135, 109	desconocido
27	46.49	284, 320	861.5	843, 817, 655, 521, 501, 475, 457, 383, 359, 339, 323, 197, 179, 135	Derivado del ácido rosmarínico
28	47.31	285, 318	521.0	359, 197, 179, 161, 135	Ácido rosmarínico hexósido
29	47.94	283, 327	521.0	359, 197, 179, 161, 135	Ácido rosmarínico hexósido
30	51.02	330, 290 (h)	359.0	197, 179, 161, 135	ácido rosmarínico
31	53.13	278	537.0	493, 359, 295, 277, 203, 185, 159, 135	Ácido litospérmico A

h= hombro

En el caso de los frutos de *S. lanuginosum*, aunque se identificaron diferentes ácidos hidroxibenzoicos como los ácidos gálico y protocatéquico e hidroxicinámicos como los ácidos cumárico y ferúlico, la principal familia de compuestos fenólicos identificada fue la de los flavonoles (Figura 15). Así, en estos frutos se identificaron principalmente glucósidos de quercetina y miricetina y sus correspondientes formas no glucosiladas (Tabla 7). La estructura de los flavonoides a menudo da como resultado sustituyentes como grupos hidroxilo, metilo y metoxilo.

Por lo tanto, en el análisis MS/MS, los iones de fragmentos generalmente se derivan de la pérdida de moléculas de CO (28 Da), H₂O (18 Da) o CO₂ (44 Da), así como los iones de fragmentos de los sustituyentes (Zhang *et al*, 2019). Además, la fragmentación retro-Diels-Alder (RDA) es un patrón de fragmentación común en los flavonoides (Figura 16).

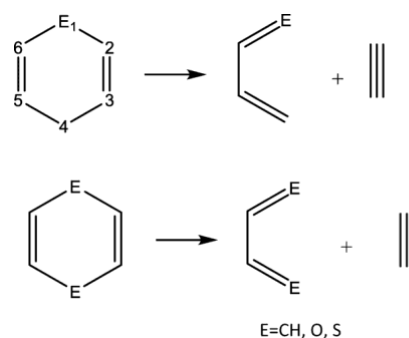


Figura 15. Fragmentación retro-Diels-Alder (RDA)

El compuesto 34, que mostró un ion pseudomolecular [M-H]⁻ a m/z 301, se identificó como quercetina (C₁₅H₁₀O₇). El ion del fragmento en m/z 273 [M-H-CO]⁻ se derivó de la pérdida de un CO (28 Da) y en m/z 179 ([M-H-C₇H₆O₂]⁻) puede explicarse por la fragmentación RDA.

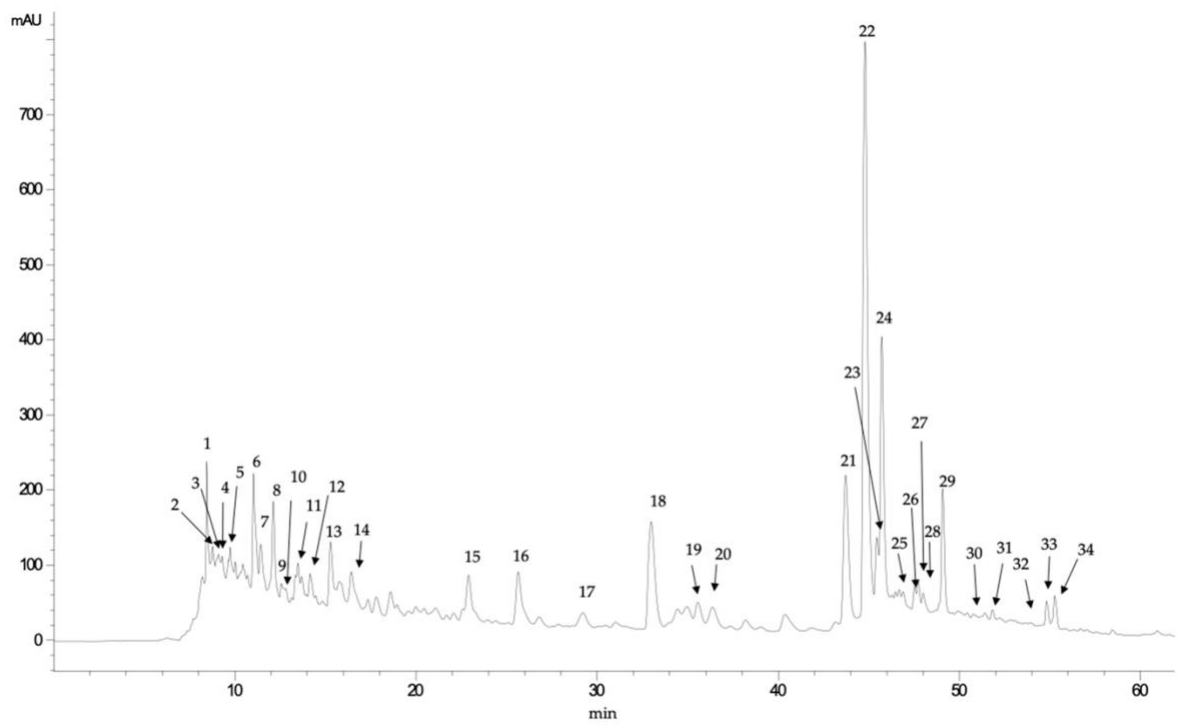


Figura 16. Cromatograma del análisis de compuestos fenólicos de *S. lanuginosum* (registrado a 280 nm)

Posteriormente, los iones del fragmento en m/z 151 $[M-H-C_7H_6O_2-CO]^-$ se originaron a partir del ion en m/z 179 por la pérdida de un CO (28 Da). El compuesto 22 fue el compuesto mayoritario, y se identificó como glucósido de quercetina (Figura 16), mostrando un ion pseudomolecular en m/z 463, cuya fragmentación produjo el ion en m/z 301 $[M-H C_{15}H_{10}O_7]^-$ después de la pérdida de una molécula de glucósido (162 Da). De manera similar, los compuestos 23 y 24 también mostraron fragmentos de iones en m/z 301 en su análisis de MS/MS, formados después de perder un ácido glucurónico (176 Da). Por el contrario, los compuestos 25 y 26 se identificaron como pentósido de quercetina debido a la detección del mismo fragmento iónico (m/z 301) después de la pérdida de 132 Da que puede atribuirse a un resto de pentosa. Los derivados de quercetina y, principalmente, el glucósido de quercetina, pueden ser relevantes para la actividad biológica de los frutos de *S. lanuginosum*, ya que se ha demostrado que este compuesto protege el ADN y los eritrocitos del daño oxidativo y exhibe actividad anticancerígena (Girish et al. 2016).

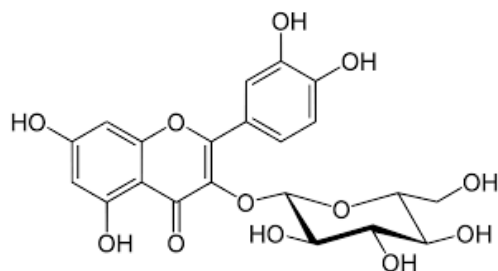


Figura 17. Estructura química de quercetina-glucósido

Tabla 7. Identificación tentativa de compuestos fenólicos de los extractos de *S. lanuginosum* determinada por HPLC-DAD-MS/MS

Pico	TR (min)	UV max	[M+H] ⁺	MS/MS fragmentos	Identificación tentativa
1	8.44	272	169.1	125, 113	Ácido gálico
2	8.76	245	137.0		Ácido <i>p</i> -hydroxybenzoico
3	8.89	278	329.3	167, 151, 109	desconocido
4	9.30	282	331.2	169, 125	desconocido
5	9.74	283	315.2	152, 108	desconocido
6	11.02	259-293	153.1	123, 109	Ácido protocatéquico
7	11.43	286, 315 (h)	461.0	351, 323, 248, 233, 193	Derivado del ácido ferúlico
8	12.11	285, 324 (h)	463.3	283, 272, 255, 175, 163	desconocido
9	13.48	295, 311	487.4	187, 163, 145, 119	Ácido cumárico dihexósido
10	14.15	256, 311 (h)	435.2	241, 193, 153	Derivado del ácido ferúlico
11	15.26	255, 335	311.3	249, 231, 205, 187, 161, 147, 135, 121	desconocido
12	15.82	303	421.2	241	desconocido
13	16.41	280	417.1	399, 227, 167, 153	desconocido
14	17.77	281, 310 (h)	387.0	163	Derivado del ácido cumárico
15	22.88	267, 327 (h)	241.2	197, 168, 141, 130	Derivado de ácido fenólico
16	25.63	262, 331 (h)	295.0	251, 189, 137, 121	Derivado de ácido fenólico
17	29.23	307, 290 (h)	163.0	119	Ácido cumárico
18	32.95	255, 351, 301 (h)	755.5	609, 489, 355, 343, 325, 301, 271, 179	Quercetin glucósido diramnósido
19	34.82	354, 300 (h)	479.0	317, 287, 271, 179, 151	Miricetin glucósido
20	35.54	254, 352, 302 (h)	771.0	301	Quercetin diglucósido ramnósido
21	43.66	256, 353, 305 (h)	609.4	343, 301, 271, 255, 179, 151	Quercetin neohesperidósido
22	44.73	256, 355, 301 (h)	463.4	306, 301, 271, 255, 248, 179, 151, 121	Quercetin glucósido
23	45.40	257, 342, 302 (h)	477.0	301, 151	Quercetin glucurónido
24	45.68	256, 354, 300 (h)	477.0	301, 179, 151	Quercetin glucurónido
25	46.68	267, 359 (h)	433.8	301, 271, 179, 151	Quercetin pentósido
26	47.52	255, 351	433.9	301, 271, 256, 180, 152	Quercetin pentósido
27	47.71	264, 349	447.9	285, 256, 227, 151	Kaempferol glucósido
28	47.99	284, 340 (h)	436.0	346, 316, 274, 167, 123	desconocido
29	49.06	257, 347	447.0	301, 273, 257, 179, 151	Kaempferol glucósido
30	50.85	371	317.0	179, 151, 138	Miricetina
31	51.18	327, 287 (h)	359.0	197, 179, 161, 135	Ácido rosmarínico
32	54.79	264, 316, 356 (h)	609.8	463, 301, 151	Quercetin rutinósido
33	55.25	251, 330, 300 (h)	639.8	477, 463, 316, 300	β -hidroverbascósido
34	57.00	370, 300 (h)	301.2	273, 229, 179, 161, 151, 121	Quercetina

h= hombro

9.4 Inhibición de enzimas digestivas

9.4.1. Inhibición de α -glucosidasa

Actualmente, solo unos pocos fármacos inhibidores de la α -glucosidasa, como la acarbosa y la voglibosa, han sido aprobados para tratar la diabetes. Las estructuras químicas de estos medicamentos (Figura 16) están compuestas principalmente de restos de azúcar. Además se han observado efectos secundarios indeseables con la administración de estos medicamentos tales como distensión abdominal, flatulencias y diarrea (Yin et al. 2014). Por lo tanto, muchos estudios se han centrado en la búsqueda de inhibidores de la α -glucosidasa alternativos con estructura de núcleo sin azúcar, en particular los polifenoles, debido a su abundante disponibilidad en la naturaleza y sus prometedoras actividades biológicas (Inthongkaew et al. 2017). En el ensayo de α -glucosidasa, los extractos que presentaron una alta actividad inhibitoria fueron *E. tinifolia* y *S. lanuginosum* con valores de IC_{50} de 0.17 y 0.21 mg/mL, respectivamente y *A. arizonica* mostró una actividad mas baja ((Tabla 8). En las mismas condiciones experimentales, el control positivo (acarbosa) presentó un valor de IC_{50} de 0,13 mg/mL. López-Martínez et al. (2014) evaluaron la inhibición de la actividad de la α -glucosidasa en extractos de cebolla, y encontraron que la variedad blanca inhibía más del 50% a una concentración de 0.7 mg/mL.

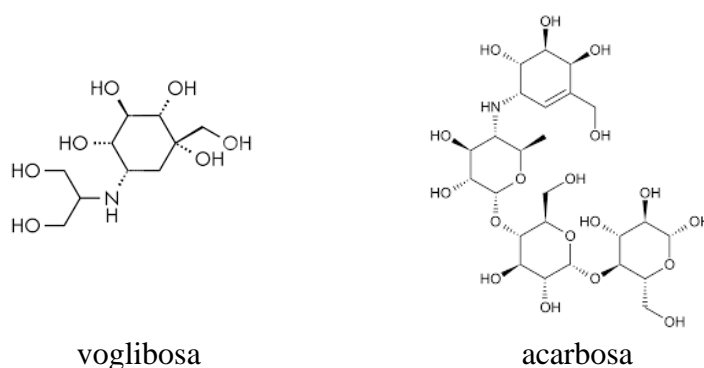


Figura 18. Estructura química de la acarbosa y voglibosa

Por otra parte, Hogan et al. (2010) reportaron que el extracto de uva roja (1,5 mg/mL) inhibió el 47 % de la actividad de la enzima α -glucosidasa, y fue significativamente mayor que la del extracto de uva blanca a la misma concentración. Esta investigación muestra que un extracto con más fenoles y antocianinas es un mejor inhibidor de la α -glucosidasa. Además, se ha demostrado que la quercetina y el kaempferol, polifenoles presentes en *S. lanuginosum* y el ácido rosmarínico presente en *E. tinifolia* son inhibidores efectivos de esta enzima (Pereira et al. 2011; Lin et al. 2011). Considerando estos compuestos como los principales polifenoles de la actividad de los extractos, el mecanismo de inhibición de la α -glucosidasa por parte de los extractos de frutos silvestres podría deberse a las interacciones no competitivas o de tipo mixto que polifenoles como la quercetina, el kaempferol (Meng et al. 2016; Şöhretoğlu et al. 2018; Liu et al. 2020), y el ácido rosmarínico (Xngo et al. 2018) mantienen con la enzima. Sin embargo, se deben realizar más estudios para determinar el mecanismo de acción de inhibición enzimática de los extractos de *S. lanuginosum* y *E. tinifolia*. No obstante, estas evidencias enfatizan la posible aplicación de frutos silvestres o sus derivados en el diseño de tratamientos para la diabetes.

Tabla 8. Inhibición de enzimas digestivas y actividad antiproliferativa de extractos de frutos silvestres del norte de México

Fruto	Concentración inhibitoria media CI ₅₀ [mg/mL]						
	α -Glu	α -Ami	Lipasa	MCF-7	HeLa	HT-29	CR
<i>S.lanuginosum</i>	0.21±0.03	>5	>5	1.99±0.3	3.22±0.8	1.97±0.2	>4
<i>E. tinifolia</i>	0.17±0.01	>5	>5	0.99±0.01	1.36±0.2	0.82±0.09	>4
<i>A. arizonica</i>	3.1±0.17	>5	>5	2.070±0.24	3.319±0.37	1.786±0.12	>4
**Control	0.13 ± 0.02	0.97 ± 0.08	0.17 ± 0.02	0.013±0.001	0.011±0.002	0.015±0.001	ND

CR = células rojas=eritrocitos. **Acarbosa fue usada en los ensayos de α -glucosidasa y α -amilasa, orlistat en lipasa y taxol en líneas celulares cancerosas. n =3, literales (a-c) en cada columna demuestra diferencias significativas entre tratamientos, de acuerdo ta la prueba de Tukey ($p < 0.05$). ND: no determinado.

9.4.2. Inhibición de α -amilasa

La enzima α -amilasa es una de las enzimas clave en el sistema digestivo humano, que degrada el almidón a monosacáridos y provoca el aumento de la glucosa en sangre (Kotowaroo 2006). Los inhibidores de amilasa naturales ofrecen un enfoque terapéutico atractivo para el tratamiento de la hiperglucemia posprandial al disminuir la glucosa liberada del almidón. Todos los extractos evaluados mostraron baja actividad de α -amilasa con valores de $IC_{50} > 5$ mg/mL. Sin embargo, los extractos de *E. tinofolia* y *S. lanuginosum* fueron capaces de inhibir 30.95% y 26.06% respectivamente a la enzima a una concentración de 5 mg/mL (Tabla 8). En otros estudios, los extractos ricos en polifenoles de diferentes tipos de bayas inhibieron la α -amilasa *in vitro*, y los más efectivos fueron los de frambuesa y serba (IC_{50} de 21 y 4.5 μ g/mL, respectivamente), además, los extractos de fresa y frambuesa fueron más efectivos que los de arándano y grosella negra. Otros autores observaron que el grado de inhibición de la α -amilasa estaba relacionado con cantidades apreciables de taninos solubles (Grussu et al. 2011). Los extractos de frutas evaluados en esta investigación son pobres en contenido de taninos, lo que puede explicar la baja actividad enzimática inhibitoria.

9.4.3. Inhibición de lipasa pancreática

La inhibición de la lipasa pancreática es una de las estrategias actuales en la lucha contra la obesidad, ya que al ser inhibida, los triglicéridos no van a ser catalizados y el epitelio intestinal no podrá absorber las grasas para su posterior almacenamiento en el organismo. En la actualidad, Orlistat es el único fármaco inhibidor de lipasa aprobado por la FDA. No obstante, presenta severos efectos secundarios los cuales incluyen: incontinencia fecal, flatulencia, heces grasas, trastornos en la absorción de vitaminas liposolubles, entre otros (Rojas-Clavijo et al. 2019). Debido a esto, es necesario buscar otras alternativas de origen natural, las cuales tengan potencial inhibitorio de lipasa, pero sin efectos secundarios a nivel gastrointestinal.

En este estudio, los extractos evaluados no mostraron actividad inhibitoria contra lipasa pancreática, mientras que el control positivo Orlistat mostró un valor de IC_{50} de 0.04 μ g/mL (Tabla 8). Estos resultados concuerdan con un estudio de extractos de *P. andina*,

el cual tampoco inhibió la actividad de la lipasa (Jiménez-Aspee et al. 2019). La inhibición de la lipasa se ha asociado con mayor contenido de taninos que de compuestos fenólicos (Jiménez-Aspee et al. 2019). Este resultado podría explicar la ausencia de inhibición hacia la enzima lipasa, ya que los extractos evaluados son pobres en taninos.

Actividad antineoplásica

Muchos estudios han reportado la efectividad *in vivo* e *in vitro* de compuestos fenólicos de frutas como anticancerígenos. Su significativa actividad anticancerígena es atribuida a varios mecanismos de acción complementarios, incluida la inducción de enzimas metabolizadoras y la modulación de la expresión génica y su impacto en la proliferación celular, la apoptosis y la vía de señalización subcelular (Subramaniam et al. 2019; Karasawa y Mohan 2018).

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los extractos de *E. tinifolia*, *S. lanuginosum* y *A. arizonica* utilizando tres líneas celulares de cáncer humano, HeLa (adenocarcinoma cervicouterino), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y HT-29 (adenocarcinoma de colon). Los resultados mostraron que la línea celular MCF-7 fue la más sensible al extracto de *E. tinifolia*, y el extracto de *S. lanuginosum* fue contra la línea celular HT-29. El efecto de los extractos en las líneas celulares de cáncer fue dependiente de la dosis y varió con el tipo de célula y la concentración del extracto. La concentración de 2 mg/mL de los extractos fue la más efectiva. Sin embargo, *E. tinifolia* tuvo el efecto más fuerte en los tres tipos de células, en la cual se observó una marcada disminución en la viabilidad de las líneas celulares de cáncer después del tratamiento. La inhibición del crecimiento del 50 % (IC₅₀) de las células expuestas a *E. tinifolia* fue de 0,99, 1,36 y 0,82 mg/mL, para *S. lanuginosum* fue de 1,99, 3,22 y 1,97 mg/mL y para *A. arizonica* 2,07, 3,31 y 1,786 mg/mL para las células MCF-7, HeLa y HT-29, respectivamente (Tabla 8). Con estos resultados se puede sugerir que una amplia gama de compuestos fenólicos en los extractos contribuyó a su actividad citotóxica. Al-Attabi et al. (2021) evaluaron la actividad antiproliferativa para las células MCF-7 del extracto de fruta de *Sideroxylon mascatense* y mostró mayor actividad que los extractos de *E. tinifolia*, *S. lanuginosum* y *A. arizonica* (IC₅₀= 64 µg/mL). Aunque los extractos de *Pyracantha coccinea* (IC₅₀ 1.2 mg/mL) y

Zosima absinthifolia (IC₅₀ 1.5 mg/mL) tuvieron menos actividad antiproliferativa que *E. tinifolia* para las células HeLa (Vahabi et al. 2015; Razavi et al. 2009). El principal compuesto fenólico encontrado en el extracto de *E. tinifolia* fue el ácido rosmarínico, y podría ser el responsable de la actividad antiproliferativa, tal como lo describen Nie et al (2019), donde compararon la actividad antiproliferativa de *Rosmarinus officinalis* con la del ácido rosmarínico y concluyeron que el ácido rosmarínico era más activo que el extracto de la planta contra la línea celular HeLa.

El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en las mujeres en México (INSP 2017). Una estrategia alternativa para reducir el riesgo de cáncer es a través de la modificación de la dieta. Los extractos de *E. tinifolia*, *S. lanuginosum* y *A. arizonica* mostraron una mejor actividad antiproliferativa contra las células MCF-7 que un extracto de manzana (IC₅₀ = 70.7 mg/mL) (Yang et al. 2009). Además, el glucósido de quercetina (QG) exhibió una actividad antiproliferativa significativa contra las células MCF-7. El valor EC₅₀ de QG en la inhibición del crecimiento de células MCF-7 fue de 46.4 µM (Yang et al 2009). Este flavonoide es el compuesto fenólico más abundante en el extracto de *S. lanuginosum* y podría ser el responsable de inhibir las células MCF-7.

Los compuestos fenólicos de *E. tinifolia*, *S. lanuginosum* y *A. arizonica* inhibieron la proliferación de células de cáncer de colon HT-29. Se han demostrado efectos similares de extractos de Borago con valores de CI₅₀ dentro del rango de 250–300 µg/mL después de 72 h de exposición celular. Al igual que en *E. tinifolia*, el ácido rosmarínico fue el principal compuesto fenólico detectado en todos los taxones de Borago (Lyashenko et al. 2021). En otro estudio, los compuestos fenólicos del arándano Rabbiteye inhibieron la proliferación de células cancerosas HT-29 e inducir la apoptosis. La fracción de ácidos fenólicos mostró la mayor actividad antiproliferativa con una IC₅₀ de ~1000 µg/mL (Yi et al. 2005).

10. CONCLUSIONES

De todos los extractos de frutos evaluados, *S. lanuginosum* presentó el mayor contenido de flavonoides totales (21.4 ± 1.5 mg GAE/100g FW); el flavonoide más abundante detectado fue la quercetina-glucósido. En comparación, *E. tinifolia* tuvo un mayor contenido de fenoles totales ($64.7 \pm 2,6$ mg GAE/100g FW), y el compuesto fenólico más abundante detectado fue el ácido rosmarínico. Estos compuestos mayoritarios podrían estar relacionados con la mayor actividad biológica que presentaron estos dos extractos. *E. tinifolia* mostró el mejor efecto en la actividad antioxidante/antirradical tanto *in vitro* ($EC_{50} = 0.32 \pm 0.03$ mg/mL; 4134 ± 9.7 μ M TE/g extracto seco), como *ex vivo* ($IC_{50} = 58.55 \pm 2.4$ μ g/mL), así como en la inhibición de α -glucosidasa ($IC_{50} = 0.17 \pm 0.1$ mg/mL). Adicionalmente, el extracto de *E. tinifolia* mostró un mejor efecto en la inhibición del crecimiento de células cancerosas, particularmente frente a las de colon ($IC_{50} = 0.82 \pm 0.09$ mg/mL) y cáncer de mama ($IC_{50} = 0.99 \pm 0.01$ mg/mL). Estos resultados contribuyen a la escasa información disponible sobre estos frutos silvestres y contribuyen a revalorizar su uso como fuente natural de antioxidantes con potencial aplicación terapéutica en enfermedades causadas por radicales libres. Sin embargo se necesitan más investigaciones para confirmar los efectos beneficiosos de los extractos estudiados como tratamientos complementarios para las enfermedades oxidativas.

12.PERSPECTIVAS

Este estudio abre las perspectivas para continuar con estudios de biodisponibilidad de los compuestos fenólicos tanto *in vitro* como *in vivo*, además, de ensayos en modelos animales para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos fenólicos identificados en los diferentes frutos silvestres evaluados en esta investigación

13.BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Attabi ZH, Al Hasani S, Waly M, Rahman MS, Tamimi Y. 2021. Antioxidant and Antitumor Properties of Wild Blueberry (*Sideroxylon mscatense*): Effects of Drying Methods. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* 11, 71.
2. Alvarez-Castro E y Orallo-Cambeiro F. 2003. Actividad biológica de los flavonoides (I). *Acción frente al cáncer* Offarm: farmacia y sociedad. 22(10):130-140.
3. Allwood JW y Goodacre R. 2010. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical Analysis* 21: 33-47.
4. American Diabetes Association (ADA). 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37(suppl 1): S81-90.
5. Arroyo, P. 2008. La alimentación en la evolución del hombre: Su relación con el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. Fondo Nestlé para la Nutrición; Fundación Mexicana para la Salud, México, D. F., México. 65: 431-440.
6. Benítez-Badillo G, Pulido-Salas MTP, Equihua-Samora M. 2008. Árboles Multiusos Nativos de Veracruz para Reforestación, Restauración y Plantaciones; Instituto de Ecología, A.C., Sigolfo, Conafor: Xalapa, México, 108p.
7. Bhat SS, Prasad SK, Shivamallu C, Prasad KS, Syed A, Reddy P, Cull CA, Amachawadi RG. 2021. Genistein: A Potent Anti-Breast Cancer Agent. *Current Issues in Molecular Biology*. 43, 1502–1517.
8. Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. 79, 379–381.
9. Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56: 317-333.
10. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. 78:2872 – 2888.
11. Cámara M, Pérez ML, López R, Martí N, Saura D, Micol V. 2011. Nutrición y salud. En: *El libro del zumo*. Urrecho, A. (Ed.). ASOZUMOS, Asociación Española de Fabricantes de Zumo. 117-140.
12. Cancino BL, Leiva GA, Garrido G, Cossío AM, Prieto GM. 2001. VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 20(1): 48 – 53.
13. Cittadini MC, García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo, JC, Valentich MA, Repossi G, Soria EA. 2018. Modulating activity of phenolic compounds from American plant infusions on fatty acid-related interleukin-6 release in glial cells. *Nutrition and Cancer* . 70, 267–277.

14. Coronado HM, Vega S, Gutiérrez León T, Vázquez FM, Radilla VC. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*. 42: 206-212.
15. Correll DS and JM Johnston. 1970. *Manual of the vascular plants of Texas*. Research Foundation Rennee, Texas. USA. 1881.
16. Cross EC, Halliwell B, Bosish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. 1987. *Annal of Internal Medicine*. Davis Conference.
17. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97: 654–660.
18. Esra Birben, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum and Omer Kalayci. Oxidative. 2012. Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*. 5:9–19
19. Girish T, Kumar KA, Rao UP. 2016. C- Glycosylated flavonoids from black gram husk: Protection against DNA and erythrocytes from oxidative damage and their cytotoxic effect on HeLa cells. *Toxicology Reports*. 3, 652–663.
20. Fernández-Nava R, Arreguín-Sánchez ML, Quiroz-García DL. 2013. Revisión del género condalia (Rhamnaceae) en México. *Polibotánica*. 36: 15-40
21. FAO, 1996. Plan de Acción Mundial para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura y la Declaración de Leipzig. 64 pp.
22. Gao QH, Wu CS, Wang M. 2013. The jujube (*Ziziphus jujuba Mill.*) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *J Agric Food Chem*. 61(14):3351-63.
23. Gottschling M. and Hilger HH. 2004. Characterisation of a novel fruit type found in *Ehretia* (Ehretiaceae, Boraginales). *Blumea* 49:145–153
24. Grussu D, Stewart D, McDougall GJ. 2011. Berry Polyphenols Inhibit α -Amylase *In Vitro*: Identifying Active Components in Rowanberry and Raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 2324–2331.
25. Guimarães R, Barros L, Calhella, R.C, Carvalho A.M. João R.P., Queiroz I., Ferreira. F. R. . 2014. Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal: A Comparative Study. *Plant Foods for Human Nutrition* 69: 37-42
26. Goulas V and Georgiou E. Utilization of Carob fruits as sources of phenolic compounds with antioxidant potencial: extraction optimization and application in foods models. *Foods*. 9:20.
27. Gupta R, Sharma M, Lakshmy R, Prabhakaran D and Reddy KS. 2009. Improved method of total antioxidant assay. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 46; 126 – 129.
28. Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews* 52 :253-265.
29. Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Journal of Free Radical Research*. 31 (4): 261-272.

30. Herald TJ, Gadgil P and Tille M. 2012. High-through put microplate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2326 – 2331
31. Hernandez-Brenes C y Serna-Saldivar S. 2003. Tecnología de los Alimentos. Los Alimentos nutraceuticos...el futuro de nuestra alimentación. *Revista Digital de Posgrado, Investigación y Extensión del Campus*. Año 16. Numero 61. Monterrey, Mexico.
32. Hogan S, Zhang L, Li J, Sun S, Canning C, Zhou K. 2010. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & Metabolism*,7, 71
33. Huang G, Liang J, Chen X, Lin J, Wei J, Huang D, Zhou Y, Sun Z, Zhao L. 2020. Isolation and Identification of Chemical Constituents from Zhideke Granules by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 1–16.
34. Ikram EHK, Eng KH, Jalil AMM, Ismail A, Idris S, Azlan A, Nazri HSM, Diton NAM, Mokhtar RAM. 2009. Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* . 22, 388–393
35. Inthongkaew P, Chatsumpun N, Supasuteekul C, Kitisripanya T, Putalun W, Likhitwitayawuid K, Sritularak B. 2017. α -Glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities and glucose uptake stimulatory effect of phenolic compounds from *Dendrobium formosum*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* . 27, 480–487.
36. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016. <https://www.insp.mx/avisos/4576-resultados-ensanut-mc-2016.html>.
37. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). 2017. Aportaciones a la salud de los mexicanos. Cuernavaca, México https://www.insp.mx/images/stories/2017/Avisos/docs/170215_Libro_30aniv.pdf
38. Jaitak V, Sharma K, Kalia K, Kumar N, H.P.Singh VK, Bikram Singh K. 2010. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya, *Journal of Food Composition and Analysis*. 23(2):142-147.
39. Jiménez-Aspee F, Quispe C, Soriano MDPC, Gonzalez JF, Hüneke E, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G. 2014. Antioxidant activity and characterization of constituents in copao fruits (*Eulychnia acida* Phil., Cactaceae) by HPLC–DAD–MS/MSⁿ. *Food Research International*. 62, 286–298.
40. Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Pormetter L, Mettke J, Ávila F, Schmeda-Hirschmann, G. 2019. Andean *Prumnopitys Andina* (Podocarpaceae) Fruit Extracts: Characterization of Secondary Metabolites and Potential Cytoprotective Effect. *Molecules*. 24, 4028
41. Jones P and J Varady KA. 2008. Are functional foods redefining nutritional requirements?. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 33(1):118-23.

42. Jung CH, Zhou S, Ding GX, Kim JH, Hong MH, Shin YC, Kim GJ & Ko SG. 2006. Antihyperglycemic Activity of Herb Extracts on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70:10, 2556-2559.
43. Karasawa MMG and Mohan C. 2018. Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. *Natural Products and Bioprospecting*. 335–346.
44. Kaskoos RA. 2013. In-vitro α -glucosidase inhibition and antioxidant activity of methanolic extract of *Centaurea calcitropa* from Iraq. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 1 (1): 122-125.
45. Kewalanand, Prajapati, B. (2018). Cultivation and Bioprospecting of Medicinal Plants. In: Singh, B., Peter, K. (eds) *New Age Herbals*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8291-7_11
46. Kotowaroo MI, Mahomoodally MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. 2006. Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of mauritius for possible α -amylase inhibitory effects *in vitro*. *Phytotherapy Research*. 20, 228–231.
47. Kumar A, Kaundal RK, Iyer S, Sharma SS. 2007. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sciences*. 80(13):1236-1244.
48. Lima B, Tapia A, Luna L, Fabani MP, Schmeda-Hirschmann G, Podio NS, Wunderlin DA, Feresin GE. 2009. Main flavonoids, DPPH activity and metal content allow determining the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (7): 2691-2698.
49. Lin L, Dong Y, Zhao H, Wen L, Yang B, Zhao M. 2011. Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedalitin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA as inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase. *Food Chemistry*. 129, 884–889.
50. Liu Y, Zhan L, Xu C, Jiang H, Zhu C, Sun L, Sun C, Li X. 2020. α -Glucosidase inhibitors from Chinese bayberry (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) fruit: Molecular docking and interaction mechanism of flavonols with different B-ring hydroxylations. *RSC Advances*. 10, 29347–29361.
51. López-Estudillo R e Hinojosa-García A.1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Universidad de Sonora.
52. López-Martínez LX, Aguilar Cisneros LM, Dublán-García O. 2014. Actividad antioxidante e inhibidora de α - glucosidasa y α -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) *Revista Electrónica Nova Scientia*. 6 (2).
53. Lu Y y Foo LY. 2002. Polyphenolics of *Salvia*—A review. *Phytochemistry*. 59, 117–140.
54. Lyashenko S, Fabrikov D, González-Fernández MJ, Gómez-Mercado F, Ruiz RL, Fedorov A, de Bélair G, Urrestarazu M, Rodríguez-García I, Álvarez-Corral M, et

- al. 2021. Phenolic composition and in vitro antiproliferative activity of *Borago* spp. seed extracts on HT-29 cancer cells. *Food Bioscience*. 42, 101043.
55. Magalhães AS, Silva BM, Pereira JA, Andrade P, Valentão P, Carvalho M. 2009. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chemistry and Toxicology*. 47, 1372–1377.
 56. Maqsood M, Ahmed D, Atique I, Malik W. 2017. Lipase inhibitory activity of *Lagenaria siceraria* fruit as a strategy to treat obesity. *About us - Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 10, 305–310.
 57. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. 2012. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 12(1): 5–18.
 58. Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M. 2011. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*. 49(9): 2285-2291.
 59. Mendoza DL y Medina R. 2015. Inhibición *in vitro* de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón. *Avances en Química*, 10(1): 33-40.
 60. Meng Y, Su A, Yuan S, Zhao H, Tan S, Hu CY, Deng H, Guo Y. 2016. Evaluation of Total Flavonoids, Myricetin, and Quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. As Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase. *Plant Foods for Human Nutrition*. 71, 444–449.
 61. Mitjans M, Martínez V, del Campo J, Abajo C, Lozano C, Torres J, Vinardell MP. 2004. Novel epicatechin derivatives with antioxidant activity modulate interleukin-1 β release in lipopolysaccharide-stimulated human blood. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* . 14, 5031–5034.
 62. Miura Y, Ono K, Okauchi R. & Yagasaki, K. 2004. Inhibitory effect of coffee on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 50: 38-44.
 63. Mohamed S. 2014. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science & Technology*. 35:114–128.
 64. Monroy-Ortiz C, Monroy R. 2006. *Las Plantas Compañeras de Siempre. La Experiencia en Morelos; Universidad Autónoma del Estado de Morelos: Cuernavaca, Mexico.*
 65. Moon YJ, Wang X, Morris ME. 2006. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro* 20(2): 187 – 210.
 66. Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley G, John LL and Naito Y. 2013. "Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)" *Pure and Applied Chemistry*. 85(7):1515-1609.

67. Nagasawa H, Yasuda M, Sakamoto S & Inatomi, H. 1996. Suppression by coffee cherry of the growth of spontaneous mammary tumours in SHN mice. *Anticancer Res.* 16, 151-153.
68. Nie J, Li R, Wang Y, Tan J, Tang S, Jiang ZT. 2019. Antioxidant activity evaluation of rosemary ethanol extract and their cellular antioxidant activity toward HeLa cells. *Journal of Food Biochemistry.* 43,:e12851.
69. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research.* 59 (6): 365-378.
70. Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. 2015. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 1. 26(2): 165-170.
71. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology.* 16:373–378.
72. Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, del Castillo MD, Cano MP, S. de Pascual T. 2008. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis.* 21(4) 273-281.
73. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: An overview. *Nutritional Sciences.* 5:e47. doi: 10.1017/jns.2016.41.
74. Pereira DF, Cazarolli LH, Lavado C, Mengatto V, Figueiredo MSRB, Guedes A, Pizzolatti MG, Silva FRMB. 2011. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition.* 27, 1161–1167.
75. Pío-León JF, Díaz-Camacho SP, López MG, Montes-Avila J, López-Angulo G, Delgado-Vargas F. 2012. Physicochemical, nutritional, and antioxidant characteristics of the fruit of *Ehretia tinifolia*. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 83:273–280. doi: 10.22201/ib.20078706e.2012.1.1148.
76. Plastina P, Bonofiglio D, Vizza D, Fazio A, Rovito D, Giordano C, Barone I, Catalano S, Gabriele B. 2012. Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology.* 140(2): 325–332.
77. Prakash M, Basavaraj BV, Murthy KC. 2018. Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. *Journal of Functional Foods.* 52, 14–24.
78. Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt K, Krewer G, Mainland CM. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46, (7), 2686-2693.
79. Quintanar E y Calderón SJV. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista Educación Bioquímica.* 28 (3): 89-101.

80. Quiñones M, Miguel M, & Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1): 76-89.
81. Ramos Ibarra ML, Batista González CM Gómez Meda BC, Zamora Pérez, AL. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*. VIII(1):7-15.
82. Ramos S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52: 507-526.
83. Razavi SM, Ghasemiyani A, Salehi S, Zahri F. 2009. Screening of biological activity of *Zosima absinthifolia* fruits extracts. *Eurasian Journal of Biosciences*. 25–28.
84. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M., Rice-Evans C. 1990. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231–1237.
85. Recuenco M, Lacsamana M, Hurtada W, Sabularse V. 2016. Total Phenolic and Total Flavonoid Contents of Selected Fruits in the Philippines. *Philippine Journal of Science* 145: 275–281.
86. Rodríguez MJJ. 1993. Recopilación de información de seis especies frutícolas silvestres en el municipio de Marín N.L. Opción 111C, Facultad de Agronomía UANL. México.
87. Rojas-Clavijo, BK, Castillo Celis MA, Moscoso Gamaa JM. 2019. Inhibidores de la lipasa pancreática como alternativa de tratamiento frente a la obesidad. *Revista de Medicina e Investigación*. 7(2):23-30.
88. Ruíz-Rodríguez B.M. 2014. Frutos Silvestres de uso Tradicional en la Alimentación: Evaluación de su Valor Nutricional, Compuestos Bioactivos y Capacidad Antioxidante *Ph.D. Thesis*. Universidad Complutense de Madrid; Madrid, Spain.
89. Şardaş S, Yilmaz M, Öztok U, Çakir N, Karakaya EA. 2001. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 490(2):123-129.
90. Sarikurkcu C & Tepe B. 2015. Biological activity and phytochemistry of firethorn (*Pyracantha coccinea* MJ Roemer). *Journal of Functional Foods*. 19:669-75.
91. Augustin Scalbert & Edwin Haslam. 1987. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur*. *Phytochemistry*. 26 (12): 3191-3195.
92. Schmeda-Hirschmann G, Feresin G, Tapia A, Hilgert N, Theoduloz C. 2005. Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:1357–1364.
93. Secretaría de la Salud. 2016. Emite la Secretaría de Salud emergencia epidemiológica por diabetes mellitus y obesidad. Ciudad de México: Secretaría de Salud.

94. Sharif Ali, S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food Research. American Journal of Plant Sciences. 41(1):1-15
95. Shay J, Elbaz H, Lee I, Zielske SP, Malek, MH, Hüttemann M. 2015. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (–)Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 1–13.
96. Shori BA. 2015. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. Journal of Integrative Medicine. 13 (5): 297-305.
97. Siddhuraju P & Becker K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. Food Chemistry. 101:10-19.
98. Silva-Beltrán NP, Balderrama- Carmona AP, López- Cuevas O, Portela-Márquez MA, Umsza Guez MA and López-Mata MA. 2019. Antioxidant and antimicrobial activity of Barchata (*Zizhipus Obtusifolia*). Revista Bio Ciencias 6, e523.
99. Simirgiotis MJ y Schmeda-Hirschmann G. 2010 (a). Direct identification of phenolic constituents in *Boldo Folium* (Peumusboldus Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-MSn). Journal of Chromatography A 1217: 443-449.
100. Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G. 2010 (b). Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp) using HPLC-DAD-electrospray tandem mass spectrometry and free radical quenching techniques. Journal of Food Composition and Analysis 23: 545–553.
101. Singh N, Rajini PS. 2008. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. Chemico-Biological Interactions. 173(2):97-104.
102. Singleton V and Rossi J. 1965. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16, 144–158.
103. Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JLFC, Reis S, Borges F. 2006. Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxyphenolic acids- A structure-activity relationship study” Free Radical Research. 40: 433-42
104. Şöhretoğlu D, Sari S, Barut B, Özel A. 2018. Discovery of potent α -glucosidase inhibitor flavonols: Insights into mechanism of action through inhibition kinetics and docking simulations. Bioorganic Chemistry. 79, 257–264.
105. Strain JJ y Benzie IFF. 1999. Diet and antioxidant defence. In: Sadler M, Strain JJ, Cabellero B, editors. The encyclopedia of human nutrition. Primera edición. London: Academic Press; . p. 95-105.
106. Subramaniam S, Selvaduray KR, Radhakrishnan AK. 2019. Bioactive Compounds: Natural Defense against Cancer?. Biomolecules. 9, 758.

107. Sudha P, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR. 2011. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11:5.
108. Sullivan, J. 1993. *Ziziphus obtusifolia*. In: Fire Effects Information System, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer).
109. Tafurt Y, Marin MA. 2014. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud*. 13(2): 95-110.
110. Tardío J, Pardo-de-Santayana M, Morales R. 2006. Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 152: 27-71.
111. Turner N.J., Łuczaj, Ł.J., Migliorini, P., Pieroni, A., Dreon, A.L., Sacchetti, L.E., Paoletti, M.G. 2011. Edible and tended wild plants, traditional ecological knowledge and agroecology. *Critical Reviews in Plant Science*. 30: 198-225.
112. Turker G. 2012. Free radical scavenging activity and phenolic content of edible wild fruits from Kazdagi (Ida Mountains), Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*.
113. Urrea LR. 2014. Análisis metabólico diferencial en fruto de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) durante maduración y en respuesta a condiciones edáficas subóptimas. Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.
114. Vahabi L, Monajemi R, Hosseini SA. 2015. The Cytotoxic Effect of Methanolic Extract of *Pyracantha coccinea* M. Roemer Fruit on Hela Cell Line, Antioxidant Capacities and Total Phenol Contents of Methanolic and Aquatic Extract of this Fruit. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 8, 99–103.
115. Vega-Vega V. 2011. Enriquecimiento de la Capacidad Antioxidante y Protección Antimicrobiana del Mango Fresco Cortado Aplicando Compuestos Fenólicos de sus Subproductos. Tesis de maestría. CIAD, Hermosillo, México.
116. Viveros-Valdez E, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Castro-Garza J, Carranza-Rosales P. 2010. Antiproliferative Effect from the Mexican Poleo (*Hedeoma drummondii*). *Journal of Medicinal Food* . 13, 740–742.
117. Wong-Paz JE, Muñoz-Márquez DB, Aguilar-Zárate P, Rodríguez-Herrera R and Aguilar Cristobal N. 2014. Microplate quantification of total phenolic content from plant extracts obtained by conventional and ultrasound methods. *Phytochemical Analysis*. 25: 439 – 444.
118. Xngo YL, Chua YLNALS, Ngo YL. 2018. Anti-diabetic Activity of Rosmarinic Acid Rich Fractions from *Orthosiphon stamineus*. *Current Enzyme Inhibition* .14, 97–103.
119. Yang J and Liu RH. 2009. Synergistic Effect of Apple Extracts and Quercetin 3- β -D-Glucoside Combination on Antiproliferative Activity in MCF-7 Human Breast Cancer Cells *In Vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.57, 8581–8586.

120. Yi W, Fischer J, Krewer G, Akoh CC. 2005. Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7320–7329.
121. Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. 2014. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*. 3, 136–174
122. Zhang H, Du G, Zhang J. 2004. Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica* 25: 385-389.
123. Zhang WX, Feng M, Miao YL, Li YY, Tong LG, He P, Ni Y. 2019. Analysis of chemical components of Huanbei Zhike Prescription based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology. 44, 3022–3034.

14. RESUMEN BIOGRÁFICO

Imelda Noehmi Monroy García

Candidata para el grado de Doctora en Ciencias con Acentuación en Química de
Productos Naturales

Tesis: BIOPROSPECCIÓN DE FRUTOS SILVESTRES DEL NORTE DE MÉXICO

Campo de estudio: Ciencias de la Vida

Datos personales: Nacida en Los Mochis, Sinaloa el 4 de noviembre de 1978 hija de Joel Monroy Sánchez e Imelda García Gutiérrez.

Educación: Egresada del Instituto Tecnológico de los Mochis de la carrera de Ingeniería Bioquímica en 2001. En 2004 obtuvo el grado de Maestría en Ciencias en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. en la ciudad de Hermosillo, Sonora.

Experiencia profesional: Gerente de Aseguramiento de Calidad en la industria alimentaria de 2004 a 2014. Profesora universitaria del Instituto Tecnológico de Los Mochis desde 2007 a la fecha.