



**Aspectos químicos y bioactivos de dos matrices naturales originarias de El Salvador:
“chipilín” y “tenquique”.**

Blanca Cecilia Castaneda Najarro

*Projeto apresentado ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Pablo Anselmo García García

Isabel C.F.R. Ferreira

Ana Maria Carvalho

Bragança

2017

Agradecimientos

A Dios Todopoderoso por darme la dicha de culminar un sueño y una meta más; gracias por escuchar todas mis oraciones, por siempre ser fiel a tus promesas y no desampararme. Mamita Auxiliadora, gracias por tu amor de madre y protegerme con tu manto sagrado.

A mis papás, nunca terminaría de agradecerles todo el esfuerzo y sacrificio que han hecho. Cecilia de Castaneda, mami gracias porque desde pequeña creíste en mí, por enseñarme a ser una mujer integral, gracias por siempre darme las herramientas para seguir mis sueños. Wilfredo Castaneda, papi gracias por enseñarme a ser valiente, a no tenerle miedo a los retos y dar siempre lo mejor. Gracias porque nunca han dudado de mí, sé que estos dos años fueron difíciles pero como siempre me han dicho, todo esfuerzo tiene su recompensa, y yo no podría estar más agradecida con ustedes los amo muchísimo y este trabajo es suyo.

A mis abuelos; Ángel y Luz, Blanca y Guillermo; por haberme dado la mejor infancia que un niño puede tener; gracias por amarme y consentirme, un beso y un abrazo hasta el cielo.

Ángel Ulises; porque más que un primo eres mi hermano, te agradezco por estar siempre conmigo y darme fuerzas para seguir adelante.

A toda mi familia; mis tíos, primos, sobrinos, suegros y cuñados gracias por sus oraciones, cariño y recuerdos compartidos.

Profesor Pablo García, de manera especial le expreso mi gratitud porque desde el primer momento me brindó su apoyo y ayuda en todo, gracias por compartir sus conocimientos y por ser mi mentor en este viaje.

Profesora Isabel Ferreira muchas gracias por abrirme las puertas al mundo de la investigación, por darme la oportunidad de crecer y madurar profesionalmente en el laboratorio.

Profesora Lillian Barros muchas gracias por acompañarme en este camino de la tesis, por estar siempre al pendiente y ser tan cuidadosa. A ambas les agradezco desde el fondo de mi corazón su dedicación, pasión y apoyo en la realización de este proyecto.

Dra. Ângela Fernandes gracias por enseñarme a desenvolverme en el laboratorio, por la paciencia y el apoyo; y de manera muy especial, gracias al equipo de BioChemCore por ayudarme siempre en lo que necesité y hacer esta experiencia mucho más divertida.

Profesora Ana María Carvalho, Profesor Ricardo Calhelha y Dra. Sandrina Heleno; les agradezco infinitamente todo lo que hicieron, por su disposición y apoyo para que este trabajo fuera un éxito.

Gracias al Instituto Politécnico de Bragança y a la Universidad de Salamanca por abrirme las puertas y permitirme ser parte de estas instituciones y de este máster universitario.

Por último, pero no menos importante; a mi esposo Gerardo; gracias mi amor por todo tu apoyo, por ser nuevamente mi compañero de estudio y de trabajo en el laboratorio. Gracias por ser mi roca firme, por darme esa palabra que necesitaba en los momentos más difíciles, porque nunca nos faltó el amor y la alegría en nuestro hogar, gracias por creer en mí y en esta aventura.

El autor agradece al programa Interreg España-Portugal por el apoyo financiero a través del proyecto 0377_Iberphenol_6_E.



Lista de símbolos, siglas y abreviaturas

·OH	Radical hidroxilo
¹O₂	Oxígeno singlete
¹H-RMN	Espectrómetro de resonancia magnética nuclear de protón
A	Absorvancia
ANOVA	Análisis de varianza de una vía
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
BHT	Butil-hidroxitolueno
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
COSY	Espectroscopia correlacionada (<i>Correlated Spectroscopy</i>)
COX	Ciclooxigenasa
DAD	Detector de arreglo de diodos
DCM	Diclorometano
DEPT	Mejora sin distorsión por transferencia de polarización (<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DW	Peso seco (<i>Dry weight</i>)
E. DCM	Extracto de diclorometano
E. DCM/MeOH	Extracto de diclorometano/metanol
E. H₂O	Extracto acuoso
E. Hexano	Extracto de hexano
E. MeOH	Extracto de metanol
EC₅₀	Concentración de extracto correspondiente al 50% de actividad antioxidante o a 0,5 de absorbancia en el ensayo del poder reductor
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos (<i>Fatty acid methyl ester</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FID	Detector de ionización de llama

FW	Peso fresco (<i>Fresh weight</i>)
GC	Cromatógrafo de gases
GI₅₀	Concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento celular
HO₂[·]	Radical hidropéroxilo
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HBSS	Solución salina de Hank's
HeLa	Línea celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Línea celular humana de carcinoma hepatocelular
HMW	Moléculas de alto peso molecular
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>)
INCAP	Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
IPM	Índice de pobreza multidimensional
LMW	Moléculas de bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacárido
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
MCF-7	Línea celular humana de adenocarcinoma de mama
MDA-TBA	Ácido tiobarbitúrico-malondialdehído
MeOH	Metanol
MINEC-DIGESTYC	Ministerio de Economía a través de la Dirección General de Estadística y Censos (El Salvador)
MS	Espectrómetro de masas
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados (<i>Monounsaturated fatty acids</i>)
NCI-H460	Línea celular humana de cáncer de pulmón
NIST	Instituto Nacional de Tecnología y Patrones (<i>National Institute of Standards and Technology</i>)
NO	Oxido nítrico
O₂^{-·}	Anión superóxido

ONOO⁻	Peroxinitrito
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PDA	Detector de arreglo de fotodiodo
PGE2	Prostaglandinas E2
PI	Patrón interno
PLP2	Línea celular de hígado de cerdo
PUFA	Ácidos grasos poli-insaturados (<i>Polyunsaturated fatty acids</i>)
RAW264.7	Células de macrófago de rata
RI	Detector de índice de refracción
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSA	Actividad captadora de radicales libres
RSS	Especies reactivas de azufre
Rt	Tiempo de retención
SD	Desviación estándar
SFA	Ácidos grasos saturados (<i>Saturated fatty acids</i>)
SFB	Suero fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
STPP	Secretaría Técnica y de Planificación de la Presidencia (El Salvador)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric reactive substances</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFCL	Cromatografía líquida ultra rápida
UV	Ultravioleta

Índice de Contenido

Resumen	xiv
Abstract.....	xv
1 Introducción	1
1.1 <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. & Arn	3
1.1.1 Nombres vernáculos	4
1.1.2 Descripción botánica	4
1.1.3 Aplicaciones	5
1.2 <i>Pseudofistulina radicata</i> (Schwein) Burds.	7
1.2.1 Nombres vernáculos.....	8
1.2.2 Descripción morfológica	8
1.2.3 Aplicaciones	9
1.3 Aspectos químicos	9
1.3.1 Compuestos hidrofílicos.....	10
1.3.2 Compuestos hidrofóbicos	14
1.3.3 Caracterización química de <i>Crotalaria longirostrata</i>	17
1.3.4 Caracterización química de <i>Pseudofistulina radicata</i>	18
1.4 Actividad antioxidante.....	18
1.4.1 Radicales libres y estrés oxidativo	18
1.4.2 Antioxidantes	19
1.4.3 Actividad antioxidante de <i>Crotalaria longirostrata</i>	20
1.4.4 Actividad antioxidante de <i>Pseudofistulina radicata</i>	20
1.5 Actividad antitumoral	21
1.5.1 Cáncer.....	21
1.6 Actividad antiinflamatoria	22

1.6.1	Inflamación.....	22
2	Objetivos	24
3	Material y métodos.....	25
3.1	Material de estudio.....	25
3.2	Caracterización química, análisis nutricional de <i>Crotalaria longirostrata</i> y <i>Pseudofistulina radicata</i>	26
3.2.1	Patrones y reactivos	26
3.2.2	Preparación de extractos hidrometanólicos y decocciones.....	27
3.2.3	Valor nutricional.....	27
3.2.4	Análisis de fitoquímicos	28
3.3	Extracción secuencial e identificación de compuestos de <i>Crotalaria longirostrata</i> y <i>Pseudofistulina radicata</i>	32
3.3.1	Patrones, reactivos, material y equipamiento	32
3.3.2	Obtención de extractos de <i>Crotalaria longirostrata</i> y <i>Pseudofistulina radicata</i> 32	
3.4	Bioensayos de <i>Crotalaria longirostrata</i> y <i>Pseudofistulina radicata</i>	33
3.4.1	Actividad antioxidante.....	33
3.4.2	Actividad antitumoral	35
3.4.3	Hepatotoxicidad.....	36
3.4.4	Actividad antiinflamatoria.....	37
3.5	Análisis estadístico	38
4	Resultados y discusión.	39
4.1	Valor nutricional y bioactividades de <i>Crotalaria longirostrata</i>	39
4.1.1	Caracterización química, nutricional, glúcidos y ácidos orgánicos de <i>Crotalaria longirostrata</i>	39
4.1.2	Caracterización de compuestos fenólicos.....	41

4.1.3	Caracterización de ácidos grasos y tocoferoles	44
4.1.4	Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de <i>Crotalaria longirostrata</i>	46
4.2	Caracterización química y bioactividades de los extractos secuenciales de <i>Crotalaria longirostrata</i>	48
4.2.1	Extractos secuenciales obtenidos de <i>Crotalaria longirostrata</i> y sus rendimientos	48
4.2.2	Identificación de compuestos en extractos secuenciales de <i>Crotalaria longirostrata</i>	49
4.2.3	Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de los extractos secuenciales de <i>Crotalaria longirostrata</i>	51
4.3	Valor nutricional y bioactividades de <i>Pseudofistulina radicata</i>	53
4.3.1	Caracterización química, nutricional, glúcidos y ácidos orgánicos de <i>Pseudofistulina radicata</i>	53
4.3.2	Caracterización de ácidos grasos y tocoferoles.	54
4.3.3	Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de <i>Pseudofistulina radicata</i>	57
4.4	Caracterización química y bioactividades de los extractos secuenciales de <i>Pseudofistulina radicata</i>	59
4.4.1	Extractos secuenciales obtenidos de <i>Pseudofistulina radicata</i> y sus rendimientos.	59
4.4.2	Identificación de compuestos en extractos secuenciales de <i>P. radicata</i>	59
4.4.3	Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de los extractos secuenciales de <i>Pseudofistulina radicata</i>	62
5	Conclusiones y perspectivas futuras	64
	Referencias	68

Índice de figuras

Figura 1. Fotografía de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. & Arn (Fuente: Ángel Najarro). ..	3
Figura 2. Hojas, fruto e inflorescencia de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. & Arn (Fuente: Ángel Najarro).....	4
Figura 3. Platillos preparados a base de “chipilín”. A: Tamales. B: Sopa. C: Pupusas (Fuente: Google imágenes).....	5
Figura 4. Fotografía de <i>Pseudofistulina radicata</i> (Schwein) Burds (Fuente: Blanca Castaneda).	7
Figura 5. Fotografía de <i>Pseudofistulina radicata</i> (Schwein) Burds (Fuente: Blanca Castaneda).	7
Figura 6. Fotografía de <i>Pseudofistulina radicata</i> (Schwein) Burds (Fuente: Blanca Castaneda).	8
Figura 7. Platillos preparados a base de “tenquiques” (Aguilar & Jaco, 2013).	9
Figura 8. Estructura general de los ácidos hidroxibenzoico (A) y hidroxicinámico (B).....	11
Figura 9. Estructura general de los flavonoides.	11
Figura 10. Estructura general de los estilbenos.	12
Figura 11. Estructura general de las cumarinas.	12
Figura 12. Alcohol coniferílico (A), cumarílico (B) y sinapílico (C).	12
Figura 13. Ácido gálico.	13
Figura 14. Ácidos cítrico, málico y quínico.	14
Figura 15. Isopreno.....	15
Figura 16. Estructura base de tocoferoles (A) y tocotrienoles (B). (Fuente: Pinela, Oliveira, & Ferreira, 2016)	15
Figura 17. Ácido Omega-3 (A) y ácido Omega-6 (B).....	16
Figura 18. Vendedores ambulantes, Concepción de Ataco (Ahuachapán, El Salvador). (Fuente: Blanca Castaneda).....	25

Índice de tablas

Tabla 1: Contexto taxonómico de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. & Arn. (Missouri Botanical Garden., 2016).....	3
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Pseudofistulina radicata</i> (Schwein) Burds (“Index Fungorum”, 2016).	7
Tabla 3: Macro y micronutrientes de <i>Crotalaria longirostrata</i> (Tabla adaptada de INCAP).	17
Tabla 4: Constituyentes fitoquímicos de <i>Crotalaria longirostrata</i> (Jiménez-Aguilar & Grusak, 2015).	18
Tabla 5: Composición nutricional, valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos de planta seca <i>Crotalaria longirostrata</i> (media ± SD).	39
Tabla 6: Tiempos de retención (Rt), longitudes de onda de máxima absorción en la región visible (λ_{max}), datos del espectro de masas, identificación y cuantificación tentativa (mg/g extracto) de compuestos fenólicos en <i>Crotalaria longirostrata</i>	43
Tabla 7: Caracterización de ácidos grasos, en porcentaje relativo, y tocoferoles (mg/100 g) presentes en las muestras de planta seca de <i>Crotalaria longirostrata</i> (media ± SD).....	45
Tabla 8: Actividad antioxidante, actividad antitumoral, hepatotoxicidad y actividad antiinflamatoria, del extracto hidrometanólico y decocciones de <i>Crotalaria longirostrata</i> (media ± SD).	47
Tabla 9: Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración de <i>Crotalaria longirostrata</i>	48
Tabla 10: Listado de compuestos identificados en los extractos secuenciales de <i>Crotalaria longirostrata</i>	49
Tabla 11: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos secuenciales de <i>Crotalaria longirostrata</i>	52
Tabla 12: Composición nutricional, valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos del hongo seco <i>Pseudofistulina radicata</i> (media ± SD).....	53
Tabla 13: Caracterización de los ácidos grasos, en porcentaje relativo, presentes en las muestras de hongo seco de <i>Pseudofistulina radicata</i> (media ± SD).	56
Tabla 14: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos hidrometanólicos y decocciones de <i>Pseudofistulina radicata</i> (media ± SD).	57

Tabla 15: Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración de <i>Pseudofistulina radicata</i>	59
Tabla 16: Listado de compuestos identificados en los extractos secuenciales de <i>Pseudofistulina radicata</i>	60
Tabla 17: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos secuenciales de <i>Pseudofistulina radicata</i>	63

Resumen

El Salvador es un país cuya población está ligada al uso de los recursos naturales por razones de tradición y cultura, y también debido a situaciones sociales o económicas. Entre las plantas que regularmente consumen como alimento los salvadoreños están las hojas de “chipilín”, que en general corresponde a la especie *Crotalaria longirostrata* y el hongo “tenquique”, *Pseudofistulina radicata*. Ambas especies no han sido estudiadas suficientemente desde un punto de vista científico ni determinadas sus posibles propiedades como alimentos funcionales, bioactividades o identificación de principios activos. Por ello, se plantea en este trabajo la determinación; para cada especie, de su valor nutricional/valor energético y composición química (tocoferoles, azúcares libres, ácidos orgánicos, perfil de ácidos grasos y compuestos fenólicos); así como la evaluación de sus propiedades antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias; en sus formas de consumo local (decocciones), en extractos hidrometanólicos y en extractos de polaridad creciente.

C. longirostrata puede ser catalogado como un alimento funcional; ya que se ha demostrado que no solo es nutritivo; al tener un gran aporte de proteínas y fibra dietética y un bajo aporte calórico y de grasas; sino que también presenta moléculas bioactivas que generan beneficios a la salud, como el ácido α -linolénico, vitamina E, ácido cutárico y ácido quínico y, habiéndose determinado la actividad antioxidante y ausencia de citotoxicidad en la forma de consumo local (decocción). De igual manera *P. radicata* presenta similar valor nutricional que *A.bisporus*, uno de los hongos más consumidos y cultivados a nivel mundial. Su decocción presenta buena actividad antioxidante y antiinflamatoria.

A partir de los extractos obtenidos con disolventes de polaridad creciente de ambas especies, se han identificado aquellos con potencial actividad antitumoral y antiinflamatoria y se ha iniciado su caracterización química.

Los resultados obtenidos dan soporte científico para el uso de ambas especies, por su gran aporte nutricional, las bioactividades y los compuestos de interés (nutricional y farmacológico) detectados en ambas, que pueden ampliar su uso a nivel medicinal (tradicional y moderno) y en la alimentación como ingredientes funcionales con beneficios para la salud en la prevención de enfermedades.

Abstract

El Salvador is a country whose population is linked to the use of natural resources for reasons of tradition and culture, and also due to social or economic situations. Among the plants regularly consumed by salvadorians as food, there are the "chipilín" leaves, which generally correspond to the species *Crotalaria longirostrata*, and the mushroom "tenquique", *Pseudofistulina radicata*. Both species have not been studied sufficiently from a scientific point of view or determined their possible properties as functional foods, bioactivities or identification of active compounds. Therefore, in this work their nutritional value/energy contribution and chemical composition (tocopherols, free sugars, organic acids, fatty acids and phenolic compounds) were determined; as well as the evaluation of their antioxidant, antitumor and anti-inflammatory properties; in the forms of local consumption (decoctions), in hydromethanolic extracts and in extracts of increasing polarity.

C. longirostrata can be classified as a functional food; since it has been shown that it is not only nutritious, with a great contribution of proteins and dietary fiber and a low caloric and fat content; but also having bioactive molecules that generate health benefits, such as α -linolenic acid, vitamin E, cutaric acid and quinic acid, and antioxidant activity and lack of cytotoxicity in the form of local consumption (decoction). Otherwise, *P. radicata* presents a similar nutritional value to *A.bisporus*, one of the most consumed and cultivated mushrooms worldwide. Its decoction presents good antioxidant and anti-inflammatory activity.

From the extracts obtained with solvents of increasing polarity of the two species, those with potential antitumor and anti-inflammatory activity were identified and their chemical characterization was carried out.

The results obtained give scientific support for the use of both species, because of their great nutritional contribution, the bioactivities and the compounds of interest (nutritional and pharmacological) detected in both, that can extend their use in medicinal (traditional and modern) and in food as functional ingredients with health benefits in disease prevention.

1 Introducción

La biodiversidad es un recurso fundamental del que dependen los pueblos indígenas, las comunidades, y las naciones. Además de la diversidad de los recursos naturales, también los conocimientos tradicionales transmitidos a lo largo de generaciones, contribuyen a la gestión de los recursos biológicos, a la seguridad alimentaria, al desarrollo de la agricultura sostenible, a la innovación y al bienestar de las gentes. Transformar los conocimientos en iniciativas concretas y asegurar el acceso a alimentos y productos de buena calidad es uno de los desafíos a los que se enfrentan los investigadores (FAO, 2017).

Esta tesis en el ámbito de la química de productos naturales se centra en el estudio de alimentos tradicionales consumidos en El Salvador con vista a identificar compuestos bioactivos y determinar sus posibles propiedades como alimentos funcionales.

Con una extensión de 20742 km², El Salvador es el más pequeño de los países de Centroamérica y a la vez, el que presenta una de las condiciones ambientales más deterioradas, es decir, el dos por ciento del territorio cubierto por bosque natural secundario y más del 75 por ciento de los suelos con algún grado de erosión (Valle, Barbosa, & Soto, 2000).

En la región de América Latina y el Caribe, El Salvador es uno de los países con niveles de desnutrición más alta y posee un índice de pobreza multidimensional (IPM) de 43,2%, del cual un 37% de los hogares salvadoreños en el año 2014 sufrió de inseguridad alimentaria (Esquivel, Zamora, & Narvaez, 2009; STPP & MINEC-DIGESTYC, 2015).

El Salvador es un país cuya población está ligada al uso de los recursos naturales por razones de tradición y cultura, y también debido a situaciones sociales o económicas. En todo el país, las pequeñas áreas con cobertura boscosa están sometidas a una fuerte presión de extracción de los recursos naturales (Valle et al., 2000).

El “chipilín”, que en general corresponde a la especie *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn, está entre las plantas que regularmente consumen como alimento los salvadoreños (Villalta & Benítez, 2014) y de las que se reportan los mayores volúmenes de exportación (Flores & Guardado, 2010).

El consumo de hongos en El Salvador no es tan amplio en comparación con el de las plantas, porque el consumo de hongos está ligado a una tradición o patrimonio familiar o a determinadas zonas del país, como antiguos asentamientos indígenas. Es el caso del “tenquique” (*Pseudofistulina radicata* (Schwein) Burds), que en su mayoría es consumido también como alimento en los pueblos montañosos del departamento de Ahuachapán.

El departamento de Ahuachapán es el más occidental de los 14 departamentos que conforman a El Salvador; el clima varía entre caluroso hacia el norte y occidente; donde hay muchas llanuras. Hacia el sur atraviesa la Cordillera Costera, paralelamente a la costa, donde el clima es fresco y templado (*Atlas geográfico universal y de El Salvador*, 1995; John Bailey, Esq., 1850).

Los nombres comunes de muchas especies en El Salvador provienen del náhuatl; lengua hablada por los indígenas en el territorio salvadoreño (Ayala, 2002). No se encuentran documentos científicos en los que se refiera el significado de las palabras “chipilín” o “tenquique”.

La utilización como alimentos de estas especies, es el resultado del patrimonio cultural que legaron los mayas y los nahuas a pasadas y presentes generaciones (Ayala, 2002). Por eso es importante estudiar aquellas especies que forman parte de la alimentación salvadoreña, no solo para rescatar los valores culturales nacionales; sino también para identificar las propiedades nutricionales y bioactivas que promuevan su uso frecuente en la alimentación.

1.1 *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn

Se considera que el “chipilín” corresponde a la especie *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn (**Figura 1**), un arbusto originario de México y Centro América. Pertenece a la Familia Fabaceae (Leguminosae) (**Tabla 1**) (Standley & Steyermark, 1946). Fue introducida en Oahu, Hawaii antes de 1917 (Morton, 1994). Es también considerada una planta forrajera utilizada en la alimentación animal (Monjarás-Barrera, Morales-Reyes, & Smith, 2015). No se han registrado sinonimias para esta especie (The Plant List, 2013; Missouri Botanical Garden, 2016).

La palabra “chipilín” es una derivación del náhuatl (Standley & Steyermark, 1946); su hábitat son los bosques mixtos de los géneros *Pinus* y *Quercus*, en elevaciones de 1000–2200 m. En El Salvador y Honduras se encuentra ampliamente distribuida en todo su territorio (Chízar Fernández, 2009).

Tabla 1: Contexto taxonómico de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (Missouri Botanical Garden., 2016).



Clasificación Taxonómica	
Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Crotalaria</i>
Especie	<i>longirostrata</i> Hook. & Arn

Figura 1. Fotografía de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn (Fuente: Ángel Najarro).

1.1.1 Nombres vernáculos

En El Salvador, Honduras y Guatemala se le conoce como “Chipilín”, “Chiplino”, “Chipil”, “Parrajachel” (Morton, 1994). En El Salvador también se le da el nombre de “Chipile”. En Costa Rica como “Quiebraplato” (Chízmar Fernández, 2009). Algunos departamentos de Guatemala, tienen su propia denominación: en Jacaltenango de “Tcap-in” y en Huehuetenango se le conoce como “Chop” (Standley & Steyermark, 1946), “Tronador” o “garbancillo”. En México además de “Chipilín” se le llama como “cascabel de víbora” y “Chapilin” (Morton, 1994). En Hawaii se le conoce como “Longbeak Rattlebox” que significa sonajero de pico largo (“Encyclopedia of Life”, 2016).

1.1.2 Descripción botánica

Arbusto de hasta 1,5 m de altura, con tallos glabrescentes. Hojas compuestas, alternas, pecioladas, folíolos de 1–3,8 x 0,5–2,5 cm, elípticos, el ápice obtuso, la base aguda, márgenes enteros, glabras. Inflorescencias en espigas terminales, con muchas flores, amarillas y con manchas rojas, pediceladas, lóbulos de los sépalos de 3–5 x 1,5–2 mm, estandarte de 11–16 x 8–10 mm, alas de 11–14 x 4–5 mm, quilla de 12–16 x 8–11mm. Frutos legumbres, de 1,8–1,9 cm de largo, pubescentes, color café cuando maduran, con varias semillas (**Figura 2**).

En El Salvador florece de septiembre a enero y fructifica de septiembre a diciembre. En Honduras florece de agosto a noviembre y fructifica de octubre a febrero (Chízmar Fernández, 2009).



Figura 2. Hojas, fruto e inflorescencia de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn (Fuente: Ángel Najarro).

1.1.3 Aplicaciones

1.1.3.1 Uso alimentario

Esta es una de las plantas más apreciadas en México y América Central (Standley & Steyermark, 1946). En El Salvador es la segunda planta alimentaria más consumida y se encuentra fácilmente en los mercados y supermercados (Sorto & López, 2014).

Las hojas, los tallos y las yemas tiernas se usan en tamales y sopas (**Figura 3A y 3B**) o cocidos como verduras con sal y limón. La flor guisada con cilantro y ajo se toma como té. Con las hojas y las flores también se preparan *pupusas* (**Figura 3C**) (Chízar Fernández, 2009). Existen platillos con arroz y cerdo o frijoles. Los tiernos retoños son congelados en El Salvador y comercializados localmente o se exportan a un distribuidor; “Lupita Products” en Los Ángeles, California. El mismo distribuidor también comercializa *Erythrina berteroana* Urb. (pito), *Fernaldia pandurata* (A. DC.) Woodson (loroco) y otros alimentos latinoamericanos (Morton, 1994).

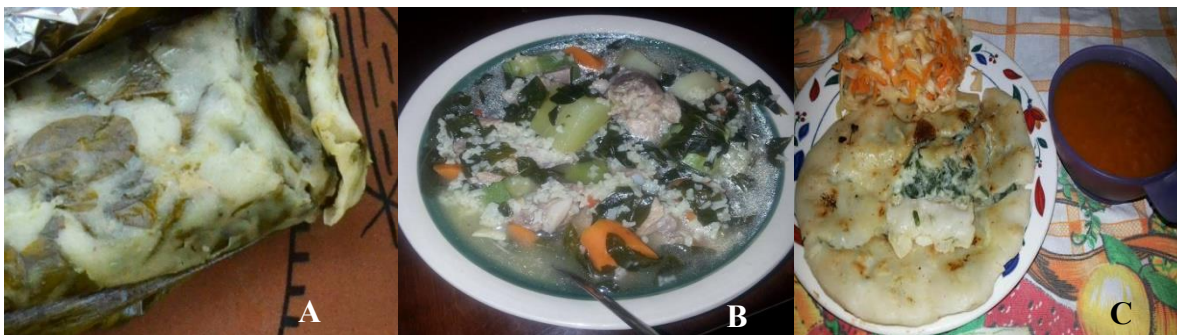


Figura 3. Platillos preparados a base de “chipilín”. A: Tamales. B: Sopa. C: Pupusas (Fuente: Google imágenes).

1.1.3.2 Uso medicinal

A comienzo del siglo XVI, en plena Conquista, en América Central se generó un proceso gradual de transculturización; una mezcla de lenguajes, razas, hábitos alimenticios, prácticas agrícolas y ganaderas, tradiciones, prácticas médicas, religiones, etc. Los antiguos médicos brujos, ahora conocidos como “curanderos” para sanar a sus pacientes empleaban cierta información empírica, aunque combinada mayormente con elementos de magia, superstición y religión (Ayala, 2002). Todos estos “remedios” han sido pasados de generación en generación sin comprobar su base científica.

A continuación se mencionan algunos de los usos tradicionales del chipilín en la medicina popular:

- Alcoholismo: Afición obsesiva hacia las bebidas alcohólicas ocasionada por “enviciamiento” o por un “daño” (acto de brujería). En esta categoría podemos encontrar dolencias como la resaca, el asco y los vómitos amargos post-borrachera. Remedio: “Horchata” de 20 hojas frescas de “chipilín” (1/2 taza) más un trago de licor en ayunas (Ayala, 2002).
- Envenenamiento: Ciertas sustancias o partes vegetales de determinadas plantas ocasionan leves o severas intoxicaciones y en algunos casos hasta la muerte. Remedio: raíz seca y triturada de “chipilín”, mezclada con las bebidas o comidas; “mata poco a poco” (Ayala, 2002).
- Quemaduras: Descomposición de un tejido orgánico producida por el contacto con el fuego (calcinación), agua hirviente (escaldadura) o sustancias cáusticas o corrosivas. Las quemaduras o “quemadas” pueden variar desde el simple enrojecimiento cutáneo superficial y la vesicación (“ampollamiento”) hasta la destrucción profunda de los tejidos. Remedio: macerar 3 “cogollos frescos” y hacer cataplasma varias veces al día (Ayala, 2002).
- Esta planta también es utilizada como un antidiarreico infantil (Chízmar Fernández, 2009) como somnífero para dormir bien y como vomitivo y purgante (Morton, 1994).

1.2 *Pseudofistulina radicata* (Schwein) Burds.

Pseudofistulina radicata (Schwein) Burds (**Figura 4 y 5**), es un hongo de la familia Fistulinaceae (“Index Fungorum”, 2016) que se encuentra en El Salvador y Guatemala. Esta especie crece sobre las raíces de *Quercus* sp. pl. y *Castanea* sp. pl. pero en El Salvador crece sobre el tronco de *Diphysa robinoides* Benth (Fabaceae) conocido como “guachipilín”, parasitando sus raíces (Nagasawa et al., 2013; Sommerkamp, 1990).



Figura 4. Fotografía de *Pseudofistulina radicata* (Schwein) Burds (Fuente: Blanca Castaneda).

Otros sinónimos para esta especie son *Boletus radicatus* Schwein., *Fistulina radicata* (Schwein.) Schwein., *Melanopus radicatus* (Schwein.) Pomerl., *Polyporellus radicatus* (Schwein.) P. Karst. y *Scutiger radicatus* (Schwein.) Murrill (“Index Fungorum”, 2016).

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *Pseudofistulina radicata* (Schwein) Burds (“Index Fungorum”, 2016).



Clasificación Taxonómica	
Reino	Fungi
División	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Fistulinaceae
Género	<i>Pseudofistulina</i>
Especie	<i>Pseudofistulina radicata</i> (Schwein) Burds.

Figura 5. Fotografía de *Pseudofistulina radicata* (Schwein) Burds (Fuente: Blanca Castaneda).

1.2.1 Nombres vernáculos

En El Salvador se le conoce como “tenquique” (Nagasawa et al., 2013), y en Guatemala como “hongo de guachipilín” y “oreja de guachipilín” (Sommerkamp, 1990).

1.2.2 Descripción morfológica

Basidiocarpos anuales, lateralmente estipitados, solitarios. Píleo de 4-20 cm de diámetro, en forma de abanico acostado, en ángulo recto respecto al estípite, margen liso, regular o algo lobulado, superficie velutina o finamente granulosa, lisa a irregularmente surcada o arrugada radialmente; beige pálido cuando es fresco, blanquecino a color café cuero o café achocolatado claro (**Figura 6**). Poros blancos a café-amarillentos pálidos, manchándose tenue e irregularmente de café canela al maltratarse. Tubos libres entre sí, subadheridos a subdecurrentes, del mismo color de los poros. Estípite de 5-15 cm de largo, lateral, cilíndrico regular o irregularmente a muy atenuado en la base, forma una protuberancia en el lugar de inserción con el píleo, superficie lisa a velutina, del mismo color que el píleo, oscureciéndose hacia la base (Nagasawa et al., 2013; Sommerkamp, 1990).



Figura 6. Fotografía de *Pseudofistulina radicata* (Schwein) Burds (Fuente: Blanca Castaneda).

Contexto duro-carnoso blanco en condiciones frescas, duro en condiciones secas. Olor aromático. Poros de la superficie de blancos a crema al principio y se tornan rosados con la edad, tubos de 5-7 poros por mm. Sistema hifal monomítico. Hifas generativas de pared delgadas, hialinas, sin conexiones en grapa, hasta 8 μm de diámetro. Acantofisis sobre la superficie del píleo hialinas, fuertemente amiloide. Acantofisis en el himenio, hialinas no-dextrinoides. Basideos anchamente claviformes, con 4 esterigmas, 10-13 x 3-5 μm .

Basidiosporas ovoides, hialinas, no-dextrinoides, 3-4,5 x 2-3 μm (Nagasawa et al., 2013; Sommerkamp, 1990).

1.2.3 Aplicaciones

1.2.3.1 Uso alimentario

Puede consumirse de diferentes formas: con pollo, en cremas, al ajo, con pupusas, etc. (Figura 7); en todas ellas se hace una cocción del “tenquique” (Aguilar & Jaco, 2013).



El “tenquique” es muy apreciado en El Salvador debido a su sabor (Nagasawa et al., 2013), es conocido en la zona occidental del país, algunas personas reportan esta especie como un vegetal, mas se trata de un hongo comestible (Sorto & López, n.d.).

Figura 7. Platos preparados a base de “tenquiques” (Aguilar & Jaco, 2013).

1.3 Aspectos químicos

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias. Tanto las plantas como los hongos además del metabolismo primario (glúcidos, lípidos, y proteínas) poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, reciben el nombre de productos naturales y se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y compuestos secundarios nitrogenados (Ávalos & Elena, 2009).

Diversos compuestos bioactivos que poseen efectos farmacológicos terapéuticos provienen de los metabolitos secundarios de las plantas, sean estas comestibles o no. Los alimentos funcionales se definen como los productos alimenticios de origen natural, consumidos en la dieta diaria, que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos. Estos compuestos ejercen efectos farmacológicos que modulan funciones terapéuticas en el cuerpo que resultan benéficas para la salud (Drago, López, & Saínez, 2006; Prosky & Hoebregs, 1999).

1.3.1 Compuestos hidrofílicos

1.3.1.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son caracterizados por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos, y reciben el nombre de compuestos fenólicos o polifenoles (Ávalos & Elena, 2009). Han sido reportadas más de 8000 estructuras fenólicas distribuidas a través del reino vegetal (Crozier, Clifford, & Ashihara, 2006) y también presentes en los hongos (Ferreira, Barros, & Abreu, 2009).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico (o vía del acetato). La vía del acetato es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias (Ávalos & Elena, 2009).

Los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante que depende de la participación del hidrógeno fenólico en las reacciones de oxidación, de la estabilidad del radical antioxidante formado durante la reacción y de las sustituciones químicas de la estructura (Ferreira et al., 2009).

Los compuestos fenólicos incluyen diferentes clases:

Ácidos fenólicos: Son compuestos aromáticos hidroxilados; comúnmente encontrados en vegetales, hongos y frutas, Estos se dividen mayoritariamente en dos grupos. Ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, que derivan de moléculas no fenólicas, del ácido benzoico y el ácido cinámico (**Figura 8**), respectivamente (Ferreira et al., 2009).

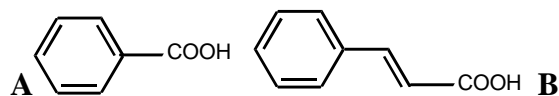


Figura 8. Estructura general de los ácidos benzoico (A) y icinámico (B).

Uno de los compuestos mayormente estudiados y prometedores del grupo del ácido hidroxibenzoico es el ácido gálico; que es el precursor de muchos taninos. Tienen actividad antioxidante como quelantes y *scavengers* con especial impacto sobre radicales hidroxilo y peroxilo, aniones superóxido y peroxinitritos (Carocho & Ferreira, 2013a).

Flavonoides: son un grupo de antioxidantes compuestos por flavonoles, flavanoles, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas y flavonas. Todos estos subgrupos de compuestos comparten el mismo esqueleto difenilpropano ($C_6.C_3.C_6$) (**Figura 9**). Las propiedades antioxidantes se confieren a los flavonoides por los hidroxilos fenólicos de los anillos A o B, permitiendo que puedan actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, *scavengers* de radicales superóxido e incluso como quelantes de metales. También activan las enzimas antioxidantes, reducen los radicales α -tocoferol (tocoferoxilos), inhiben oxidasas, mitigan el estrés nitrosativo e incrementan los niveles de ácido úrico y moléculas de bajo peso molecular (Carocho & Ferreira, 2013a).

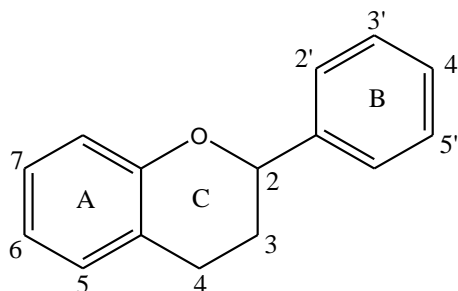


Figura 9. Estructura general de los flavonoides.

En general es asumido que solamente las plantas poseen la habilidad biosintética para producir flavonoides y no los animales ni los hongos. Sin embargo algunos flavonoides han sido descritos excepcionalmente en los hongos *Aspergillus candidus* y *Phallus impudicus* y más recientemente en hongos alimenticios se ha reportado quercetina y kaempferol (Ferreira et al., 2009).

Estilbenos: En la ruta de biosíntesis de flavonoides, la misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación de estilbenos (**Figura 10**), implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (Ávalos & Elena, 2009).

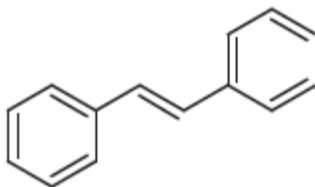


Figura 10. Estructura general de los estilbenos.

Cumarinas: (**Figura 11**) son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Algunas muestran fitotoxicidad frente a insectos (Ávalos & Elena, 2009).

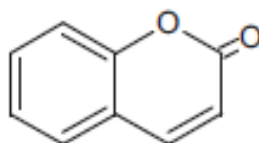


Figura 11. Estructura general de las cumarinas.

Lignina: es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Desempeña un papel estructural fundamentalmente, principalmente se deposita en la pared secundaria, fortalece los tallos y tejidos vasculares permitiendo el crecimiento vertical y la conducción de agua y minerales a través del xilema. Se forma a partir de tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico (**Figura 12**) (Ávalos & Elena, 2009).

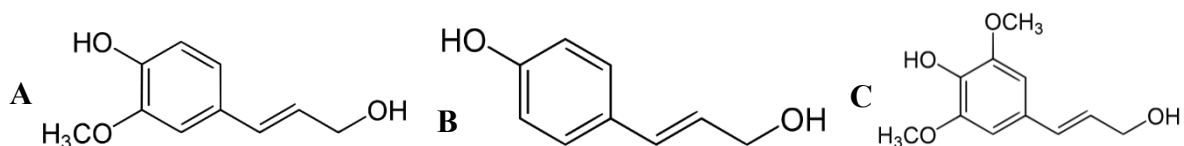


Figura 12. Alcohol coniferílico (A), cumarílico (B) y sinapílico (C).

Taninos: son compuestos fenólicos poliméricos. Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados, pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo el ácido gálico (**Figura 13**) y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente. Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas, desnaturalizándolas, también actúan como repelentes alimenticios de muchos animales (Ávalos & Elena, 2009).

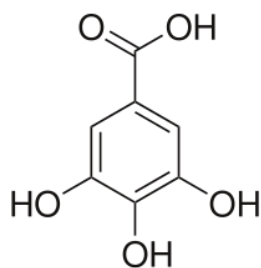


Figura 13. Ácido gálico.

1.3.1.2 Glúcidos

Los azúcares son de los compuestos que se encuentran en mayor proporción en la naturaleza, formándose en los vegetales a partir de glucosa ($C_6H_{12}O_6$), el glúcido más simple obtenido por fotosíntesis. A su vez, la glucosa por condensación origina en las plantas, entre otros compuestos la celulosa (material de soporte) y el almidón (una de las principales reservas energéticas). Las aldosas y las cetosas, genéricamente designadas como “osas” o monosacáridos, azúcares simples (Cunha, 2005), estando los azúcares más complejos formados por la unión de monosacáridos.

Los azúcares que se encuentran en mayor cantidad en hongos son ramnosa, fructosa, manitol, trehalosa y sacarosa (Toledo et al., 2016). Los azúcares encontrados en hongos muestran acciones antitumorales por acción inmunoestimulante; los monosacáridos además de poseer propiedades edulcorantes, también son usados en el tratamiento complementario contra el estreñimiento. Los polisacáridos pueden ser usados como fibra dietética; las gomas y mucílagos en tratamientos del aparato digestivos o en la piel como emolientes (Bruneton, 2001).

1.3.1.3 Ácidos orgánicos

Estos están envueltos en varias vías fundamentales en el metabolismo y catabolismo de plantas como productos finales o intermediarios. Ácido cítrico (**Figura 14A**), málico (**Figura 14B**), succínico, fumárico y oxálico juegan un papel clave en el Ciclo de Krebs que es el ciclo central de rendimiento energético de la célula, que está envuelto en las vías metabólicas más importantes de glúcidos, lípidos y proteínas. Los ácidos cítrico y oxálico han sido propuestos por estar envueltos en el transporte de cationes y en el proceso operacional de la rizosfera; incluyendo adquisición de nutrientes, desintoxicación de metales, alivio del estrés anaerobio en raíces, etc. Los ácidos orgánicos son conocidos por su influencia en propiedades organolépticas de alimentos vegetales y la autenticidad y calidad de estas matrices (Pereira et al., 2013). En hongos se ha publicado la presencia de los ácidos mencionados anteriormente; algunas especies como *Fistulina antarctica* y *Lepista nuda* presentan ácido quínico (**Figura 14C**) (Toledo et al., 2016).

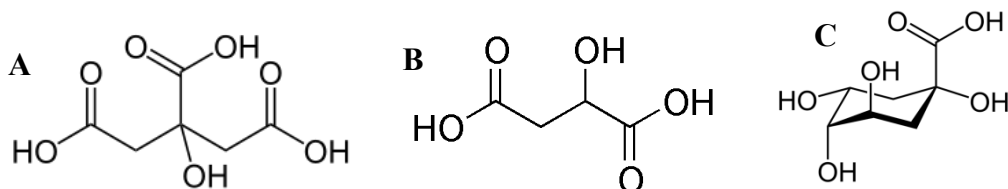


Figura 14. Ácidos cítrico, málico y quínico.

1.3.2 Compuestos hidrofóbicos

1.3.2.1 Terpenos y esteroides

Los terpenos o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40000 moléculas diferentes), cada grupo de terpenos es el resultado de la condensación “cabeza-cola” de un número variable de unidades isoprénicas (**Figura 15**). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C_5) que contienen: los terpenos de 10 átomos de carbono contienen dos unidades C_5 y se llaman monoterpenos; los de 15C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20C tienen cuatro unidades C_5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30C, los tetraterpenos tienen 40C y se habla de politerpenos cuando contienen más de ocho unidades de isopreno. Se sintetizan a partir de la ruta del mevalonato y dan lugar a una variedad compuestos que incluyen hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los

esteroles (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. El ergosterol, el principal esteroles de los hongos, también existe en los vegetales, es conocido como pro-vitamina D₂ por que se puede transformar en vitamina D₂ (ergocalciferol) después de la radiación solar (Ávalos & Elena, 2009; Bruneton, 2001; Cunha, 2005).

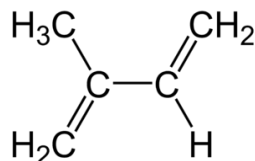
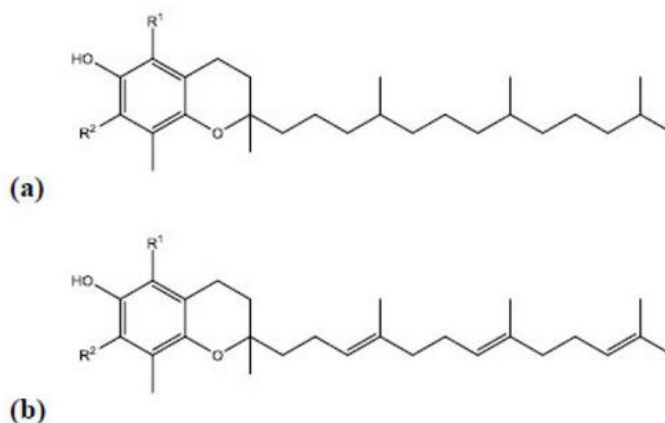


Figura 15. Isopreno.

1.3.2.2 Tocoferoles

Son derivados prenilados del benzodihidropirano, según que la cadena lateral se encuentre o no saturada, se distinguirán los tocoferoles de los tocotrienoles; en cada una de estas dos series la posición y la naturaleza de los sustituyentes determinan la existencia de cuatro compuestos diferentes (α , β , γ δ) (**Figura 16 A y B**).



Chemical structures of (a) tocopherols ($R^1 = R^2 = \text{Me}$: α -tocopherol; $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{H}$: β -tocopherol; $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$: γ -tocopherol; $R^1 = R^2 = \text{H}$: δ -tocopherol) and (b) tocotrienols ($R^1 = R^2 = \text{Me}$: α -tocotrienol; $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{H}$: β -tocotrienol; $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$: γ -tocotrienol; $R^1 = R^2 = \text{H}$: δ -tocotrienol).

Figura 16. Estructura base de tocoferoles (A) y tocotrienoles (B). (Fuente: Pinela, Oliveira, & Ferreira, 2016)

El α - tocoferol es la más potente y mayoritaria isoforma en la naturaleza de lo que habitualmente se denomina Vitamina E, antioxidante liposoluble natural que se opone a fenómenos oxidativos, sobre todo a la peroxidación lipídica. El grupo cromano confiere la actividad antioxidante al tocoferol; actúa donando su hidrógeno fenólico al radical peroxilo formando el radical tocoferoxilo, que no es reactivo e incapaz de continuar la reacción en cadena de oxidaciones. La Vitamina E es el único antioxidante soluble en lípidos encontrado en el plasma, glóbulos rojos y que protege la integridad de las estructuras lipídicas, principalmente de las membranas. Tanto la Vitamina E como la Vitamina C muestran un comportamiento sinérgico; con la regeneración de la Vitamina E a través de la Vitamina C, reestableciendo así su potencial antioxidante (Bruneton, 2001; Carochó & Ferreira, 2013a).

1.3.2.3 Ácidos grasos

Son ácidos carboxílicos de cadena lineal, ramificada o no, siendo raros los que poseen número impar de átomos de carbono. Se reparten por series, ácidos grasos saturados, mono-insaturados (serie oleica), di-insaturados (serie diénica) y poli-insaturados (series triénica o poliénica). Cerca del 95% de los que constituyen los lípidos son ácidos con 16 o 18 átomos de carbono. Los lípidos son constituyentes de estructuras celulares como los fosfo- y glicolípidos de membranas, elementos de revestimiento como ceras o cutinas; también constituyen sustancias de reserva y son fuente de energía celular. Los ácidos grasos esenciales son necesarios para la salud y, deben incorporarse en la alimentación, ya que no pueden sintetizarse en el cuerpo humano. Se dividen en dos familias: Omega-3 (ω -3) y Omega-6 (ω -6) (**Figura 17**). Los ácidos grasos ω -3, además de sus efectos antiinflamatorios, pueden tener efectos beneficiosos sobre el corazón y otras patologías como el cáncer, diabetes y enfermedades neurológicas. Los ácidos grasos ω -6, como el ácido γ -linoleico, también poseen propiedades antiinflamatorias, siendo su fuente principal los aceites de semillas (Bruneton, 2001; Cunha, 2005).



Figura 17. Ácido Omega-3 (A) y ácido Omega-6 (B).

1.3.3 Caracterización química de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn

El análisis de macro y micronutrientes de *C. longirostrata* que se recoge en la **Tabla 3** ha sido tomado del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)/Organización Panamericana de la Salud (OPS). Los valores de los nutrientes se presentan por 100 gramos de porción comestible o gramos netos; (Menchú & Méndez, 2007).

Tabla 3: Macro y micronutrientes de *Crotalaria longirostrata* (Tabla adaptada de INCAP).

Chipilín, hojas y punta	
Agua	81,60 %
Energía/kcal	56
Proteína	7,00 g
Grasa Total	0,80 g
Carbohidratos	9,10 g
Fibra dietética total	3,24 g
Ceniza	1,5 g
Calcio	287 mg
Fosforo	72 mg
Hierro	4,70 mg
Tiamina	0,33 mg
Riboflavina	0,49 mg
Niacina	2,00 mg
Vitamina C	100 mg
Vitamina A equiv. a Retinol	667 mg
Fracción comestible	0,46 %

En la **Tabla 4** se presentan los constituyentes fitoquímicos de *C. longirostrata* reportados por los autores Jiménez-Aguilar & Grusak (2015).

Tabla 4: Constituyentes fitoquímicos de *Crotalaria longirostrata* (Jiménez-Aguilar & Grusak, 2015).

<i>C. longirostrata</i>	
Fenoles	1,91 mg GAE/g FW
Flavonoides	153 µg CE/g FW

FW- masa fresca

1.3.4 Caracterización química de *Pseudofistulina radicata*

No se han encontrado estudios que evalúen los macronutrientes y constituyentes fitoquímicos de la muestra de *P. radicata*.

1.4 Actividad antioxidante

1.4.1 Radicales libres y estrés oxidativo

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con un par desapareado de electrones en su orbital más externo, altamente inestable y activo hacia reacciones químicas con otras moléculas.

La mayoría de radicales libres que se producen en los organismos vivos derivan de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, creando las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de azufre (RSS). ROS incluye radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo ($\cdot OH$), óxido nítrico (NO) y otras especies como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno single (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y peroxinitrito ($ONOO^-$). RNS derivan de NO por reacción con $O_2^{\cdot -}$, y formando $ONOO^-$. RSS son fácilmente formadas por reacción de ROS con tioles (Carocho & Ferreira, 2013a).

Internamente, los radicales libres son producidos como una parte normal del metabolismo dentro de la mitocondria, a través de la xantina oxidasa, peroxisomas, procesos de inflamación, fagocitosis, vías del araquidonato, isquemia y ejercicio físico. Factores externos que ayudan a promover la producción de radicales libres son fumar, contaminantes ambientales, radiación, drogas, pesticidas, solventes industriales y ozono (Carocho & Ferreira, 2013a).

Al desequilibrio entra la producción de especies reactivas y sus agentes neutralizantes se le conoce como estrés oxidativo.

Los radicales libres tienen diferentes tipos de mecanismo de reacción; ellos pueden reaccionar con moléculas cercanas por: donación de electrón, reducción de radicales y aceptación de electrones, oxidación de radicales, extracción de hidrógeno, reacciones de adición, reacciones de auto-aniquilación y por desproporción. Estas reacciones llevan a la producción de ROS, RNS y RSS que han sido asociadas a enfermedades severas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurológicos, enfermedades pulmonares, diabetes, artritis y procesos de envejecimiento (Carocho & Ferreira, 2013a; Ferreira et al., 2009).

1.4.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son definidos por Khlebnikov *et al.* (2007) como “cualquier sustancia que directamente neutraliza los ROS, actúa indirectamente para regular la defensa antioxidante o inhibe la producción de ROS”. Otra propiedad que el compuesto debe tener para ser considerado un antioxidante es la habilidad, después de neutralizar el radical, de formar un nuevo radical que sea estable y menos peligroso que los radicales que han neutralizado, y a su vez pueden ser neutralizados por otros antioxidantes o por otros mecanismos para terminar su estado de radical (Halliwell, 1990; Lü et al., 2010). La actividad antioxidante puede ser efectiva a través de varias vías: como inhibidores de radicales libres en reacciones de oxidación (antioxidantes preventivos), por inhibición de formación de radicales lipídicos libres, por interrupción de propagación de la reacción en cadena de auto-oxidación (antioxidantes rompedores de cadenas), como *quenchers* de oxígeno *singlete*; a través de sinergismo con otros antioxidantes; como reductores de agentes que convierten hidroperóxidos en compuestos estables; como quelantes de metales que convierten metales pro-oxidantes (derivados de hierro y cobre) en compuestos estables; y finalmente como inhibidores de enzimas pro-oxidantes (lipoxigenasas) (Carocho & Ferreira, 2013a; Choe & Min, 2005; Darmany et al., 1998; Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002; Kancheva, 2009; Khlebnikov et al., 2007; Pokorný, 2007).

El sistema humano antioxidante está dividido en dos grupos mayoritarios, antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos; los antioxidantes enzimáticos están formados

por dos grupos, el primero compuesto por tres enzimas importantes que previenen la formación o neutralización de radicales libres: la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa; la defensa enzimática secundaria incluye la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los antioxidantes endógenos no enzimáticos son la vitamina A, cofactores de enzimas (Q10), compuestos nitrogenados (ácido úrico) y péptidos (glutatión) (Carocho & Ferreira, 2013a).

El sistema endógeno antioxidante no es suficiente, y los humanos dependen de varios tipos de antioxidantes que están presentes en la dieta para mantener la concentraciones de radicales libres en niveles bajos (Pietta, 2000), como la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E (tocoferol), la vitamina K (grupo de compuestos solubles en grasas), flavonoides, ácidos fenólicos y minerales, como el selenio y zinc (Carocho & Ferreira, 2013a).

Una gran cantidad de antioxidantes naturales han sido aislados de diferentes tipos de materiales provenientes de las plantas, como el aceite de semillas, cultivos de cereales, vegetales, frutas, hojas, raíces, especies y hierbas (Ramarathnam, Osawa, Ochi, & Kawakishi, 1995). Los hongos se han vuelto atractivos como alimentos funcionales y como una fuente de medicamentos fisiológicamente beneficiosos (Chang & Buswell, 1996). Los antioxidantes encontrados en hongos son principalmente compuestos fenólicos (ácidos fenólicos), seguidos de tocoferoles, ácido ascórbico y carotenoides (Ferreira et al., 2009).

1.4.3 Actividad antioxidante de *Crotalaria longirostrata*

Jiménez-Aguilar & Grusak (2015) utilizando el método de capacidad de absorbancia del radical oxígeno, acoplado al lector de fluorescencia de microplaca de 96 pocillos; descrito por Huang (2002) obtienen 52-60 $\mu\text{mol/g}$ FW (masa fresca)

1.4.4 Actividad antioxidante de *Pseudofistulina radicata*

No se han encontrado estudios que evalúen la actividad antioxidante de los extractos de *P. radicata*

1.5 Actividad antitumoral

1.5.1 Cáncer

El cáncer es una carga mundial que causa millones de muertes cada año; de hecho, es la causa líder de muertes en países desarrollados, sacrificando 7,6 millones de vidas en 2008 (Jemal, Bray, & Ferlay, 2011). Se estima que en el año 2050, 27 millones de nuevos casos de cáncer y 17,5 millones de muertes (Moradali, Mostafavi, Ghods, & Hedjaroude, 2007). Tradicionalmente se ha entendido que la carcinogénesis tiene tres etapas: iniciación, promoción y progresión. Aunque más recientemente la carcinogénesis no se ha descrito en esos términos, sino más bien como una transformación maligna en su conjunto (Borchers, Keen, & Gershwin, 2004).

El cáncer puede tener varias causas endógenas (por ejemplo: mutaciones heredadas, hormonas y condiciones inmunitarias) las cuales son inevitables, pero también hay exógenas como el consumo de tabaco, relacionados con la dieta, radiación, organismos infecciosos y un vínculo cercano entre cáncer y estrés oxidativo (Carocho & Ferreira, 2013a).

El mundo necesita más tratamientos específicos, eficientes y rápidos para los diferentes tipos de cáncer y uno de los principales inconvenientes es la resistencia a los fármacos (Flores & Guardado, 2010). La prevención del cáncer es la mejor intervención en el proceso antes de que se desarrolle la forma invasiva, una de las estrategias es el uso de fármacos, productos biológicos y nutrientes para prevenir el desarrollo, inhibición, retraso o revés de la carcinogénesis. (Kelloff & Sigman, 2005).

Hoy en día más del 60% de fármacos anti-cáncer provienen de compuestos naturales o derivados de estos (Gordaliza, 2007; Tostes, 2001). Los grupos moleculares de los compuestos fenólicos que han presentado alguna actividad antitumoral son los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, ligninas, lignanos, chalconas, estilbenos y flavonoides (Carocho & Ferreira, 2013b).

Los hongos representan una fuente ilimitada de compuestos con potencial antitumoral y propiedades inmunoestimulantes; incluyendo moléculas de bajo peso molecular (LMW) como quinonas, cerebrósidos, isoflavonas, catecoles, aminas, triacilgliceroles,

sesquiterpenos, esteroides, germanio orgánico y selenio; y compuestos de alto peso molecular (HMW) como homo y hetero-polisacáridos, glicoproteínas, glicopéptidos, proteínas, proteínas-ARN complejas (Ferreira, et al., 2010).

Con respecto a las especies aquí mencionadas, no se han encontrado estudios que evalúen la actividad antitumoral de los extractos de *C. longirostrata* y de *P. radicata*, por eso son dos fuentes naturales que pueden ser explotadas.

1.6 Actividad antiinflamatoria

1.6.1 Inflamación

La inflamación es causada por una variedad de estímulos que incluyen daño físico, irradiación ultra-violeta, invasión microbiana y reacciones inmunes. Las clásicas características del proceso de inflamación son enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor. La cascada de inflamación puede llevar al desarrollo de enfermedades como el asma crónico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de intestino inflamado y psoriasis. Muchas de estas enfermedades son debilitantes y se están volviendo cada vez más comunes en nuestra sociedad envejecida. Artritis reumatoide y osteoartritis son las mayores enfermedades inflamatorias que afectan a la población mundial (Smith, 2005; Woolf & Pfleger, 2003).

Se ha estimado que infecciones subyacentes y reacciones inflamatorias están relacionadas en un 15-20 % con todas las muertes por cáncer (Mantovani & Pierotti, 2008). La asociación entre cáncer e inflamación incluye la presencia de varios mediadores como las citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, mensajeros lipídicos, enzimas degradantes de la matriz y leucocitos, infiltrando el microambiente del tumor (Lawrence, 2007).

Controlar o modular la inflamación es, por tanto, importante para prevenir o mejorar ciertas enfermedades, como trasplantes de órganos, enfermedades alérgicas o enfermedades autoinmunes (Yang et al., 2015).

Las actividades antiinflamatorias de varias especies de hongos han sido publicadas así, como sus metabolitos bioactivos; estos han sido relacionados con la reducción en la

producción de óxido nítrico (NO) y otros mediadores inflamatorios como las interleucinas (IL 1 β , IL-6, IL-8), factor de necrosis tumoral (TNF- α) y prostaglandinas E2(PGE2), causando reducción de la inflamación (Taofiq et al., 2016).

Varias revisiones han publicado recientemente compuestos naturales antiinflamatorios, como los alcaloides que inhiben la actividad de la COX-2 (Danz, Stoyanova et al., 2002; Danz, Baumann & Hamburger, 2002; Danz, Stoyanova et al., 2001). Los ácidos grasos ácido α -linolenico, ácido docosahexaenóico y ácido eicosapentaenóico han sido reportados por exhibir efectos potencialmente inhibitorios en COX-2 y COX-1 (Ringbom et al., 2001). Algunos terpenoides inhiben la activación de NF-kB y la producción de óxido nítrico (Giang et al., 2003; Seong et al., 2007). Polifenoles como los flavonoides, en especial luteolina y quercetina, inhiben la LPS que estimula TNF- α e IL-6 (Calixto, Campos, Otuki, & Santos, 2004). Algunos lignanos suprimen TNF- α y la producción de óxido nítrico, así como la proliferación de linfocitos (Cho, et al., 2000; Cho, et al., 2000). Resveratrol inhibe la COX-1 y COX-2 (Selvam et al., 2004).

Hasta nuestro conocimiento, no han sido encontrados estudios que evalúen la actividad antiinflamatoria de los extractos de *C. longirostrata* y *P. radicata*.

2 Objetivos

Como se ha visto en la Introducción de este trabajo, tanto *Crotalaria longirostrata* como *Pseudofistulina radicata* son alimentos de origen natural consumidos en El Salvador, que no han sido estudiados suficientemente desde un punto de vista científico ni determinadas sus posibles propiedades como alimentos funcionales, bioactividades o identificación de principios activos. Por ello, se plantea en este trabajo la evaluación de sus propiedades antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias; en sus formas de consumo local (decocciones), en extractos hidrometanólicos y en extractos de polaridad creciente.

El objetivo general de este trabajo es estudiar desde un punto de vista químico, nutricional y de evaluación de actividades biológicas de interés, las hojas de la planta *Crotalaria longirostrata* y el hongo *Pseudofistulina radicata*, altamente consumidos entre la población de El Salvador. Este objetivo general se puede concretar en los siguientes objetivos específicos:

- a) Determinar el valor nutricional/valor energético y composición química (tocoferoles, azúcares libres, ácidos orgánicos, perfil de ácidos grasos y compuestos fenólicos) de las hojas de *Crotalaria longirostrata* y del hongo *Pseudofistulina radicata*.
- b) Evaluar la actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de las decocciones y extractos metanólicos de las hojas de *Crotalaria longirostrata* y del hongo *Pseudofistulina radicata*.
- c) Preparar de extractos de polaridad creciente de las hojas de *Crotalaria longirostrata* y del hongo *Pseudofistulina radicata*, utilizando disolventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, diclorometano/metanol (1:1), metanol y agua.
- d) Proceder a la caracterización química de los extractos de polaridad creciente de las hojas de *Crotalaria longirostrata* y del hongo *Pseudofistulina radicata*.
- e) Evaluar la actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de los extractos de polaridad creciente de las hojas de *Crotalaria longirostrata* y del hongo *Pseudofistulina radicata*.

3 Material y métodos

3.1 Material de estudio

Las muestras de *C. longirostrata* se adquirieron en el mercado municipal de Santa Tecla (La Libertad, El Salvador). Se retiraron tallos, hojas y flores con vista a confirmar la identificación botánica del material adquirido, que ha sido enviado al Instituto de InvestigaçãO Científica Tropical, en Lisboa, para confirmar la determinación botánica.

Las muestras se secaron en una estufa artesanal formada por una caja de cartón con agujeros para que hubiera circulación y renovación del aire, una hornilla eléctrica a una temperatura aproximada de 70 °C, *C. longirostrata* se colocó sobre una red metálica para que el calor no pasara directamente y tuviera circulación de aire; el tiempo de secado fue hasta que se observó que el “chipilín” estuviera completamente seco, posteriormente se redujeron a polvo utilizando un molino.

P. radicata se compró a vendedores ambulantes del municipio de Concepción de Ataco (Ahuachapán, El Salvador) (**Figura 18**). Para la determinación de la especie se ha recurrido a consulta de obras de referencia (Nagasawa et al., 2013). La confirmación la realizó la Doctora Sandrina Alves Heleno del Centro de InvestigaçãO de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança y la nomenclatura sigue la propuesta de Index Fungorum (2016). Estos se secaron alrededor de dos meses sobre papel de periódico en un lugar seco y alejado de la luz solar. Luego se liofilizaron (*Telstar modelo LyoQuest*) y se redujeron a polvo utilizando un molino.

Ambas muestras se almacenaron en tubos de Falcon a temperatura ambiente.



Figura 18. Vendedores ambulantes, Concepción de Ataco (Ahuachapán, El Salvador).

(Fuente: Blanca Castaneda)

3.2 Caracterización química, análisis nutricional de *Crotalaria longirostrata* y *Pseudofistulina radicata*.

3.2.1 Patrones y reactivos

Los disolventes acetonitrilo, *n*-hexano y acetato de etilo empleados fueron de pureza HPLC (*Lab-Scan; Lisboa, Portugal*). Los otros disolventes utilizados fueron de grado analítico y fueron adquiridos en fuentes comunes. El agua desionizada fue obtenida en un sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q (*TGI Water Systems, EUA*).

Para los análisis de micronutrientes y macronutrientes se emplearon mezclas de patrones: análisis de ácidos grasos, la mezcla contenía 37 ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) desde C4 hasta C24, (referencia 47885-U); análisis de tocoferoles, mezcla de las isoformas α , β , γ y δ ; análisis de azúcares mezcla de D(-)-fructosa, D(+)-glucosa anhidra, D(+)-melecitosa monohidratada, D(+)-rafinosa pentahidratada, D(+)-sacarosa, D(+)-trehalosa y D(+)-xilosa. Todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich (*Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA*), así como, la mezcla de patrones para el análisis de ácidos orgánicos y el análisis de compuestos fenólicos.

Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizaron los patrones: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Alfa Aesar; Ward Hill, MA), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) y ácido tricloroacético (TCA) (*Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA*).

Para la evaluación de la actividad antitumoral y citotóxica se utilizaron las siguientes soluciones: suero fetal bovino (SFB), L-glutamina, solución salina de Hank's (HBSS), tripsina-EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), aminoácidos esenciales (2 mM), penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 μ g/mL, respectivamente) y medios de cultivo RPMI-1640 y DMEM (Hyclone; Logan, Utah, EUA). También se utilizó ácido acético, elipticina, sulforrodamina B (SRB), azul tripano y tris[2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol] (*Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA*).

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria el *Kit Griess Reagent System (Promega)*, dexametasona (*Sigma*), etanol y todos los otros reactivos fueron de grado analítico y

adquiridos de fuentes comunes. El agua fue tratada en un sistema de purificación Millipore-Q (*TGI Water Systems, EUA*).

3.2.2 Preparación de extractos hidrometanólicos y decocciones

Para la preparación de los extractos hidrometanólicos 6 g de cada muestra se extrajeron en una disolución de metanol:agua 8:2 (v/v) (50 mL) con agitación constante durante 1 h, y posterior filtración a través de papel filtro. Los residuos se extrajeron nuevamente con otros 50 mL siguiendo el procedimiento anterior, uniéndose ambos extractos. Posteriormente se evaporó el metanol de los extractos en un rotavapor a 40 °C (Buchi R-2010), se congelaron y liofilizaron (Liofilizador Ly-8- FM-ULE). Se pesaron 100 mg del residuo de “chipilín” y 400 mg del residuo de “tenquique” y se redisolvieron en un volumen conocido de metanol:agua 8:2 (v/v) para obtener las soluciones madre de 10 mg/mL y 40 mg/mL, respectivamente. A partir de estas se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones para evaluar la actividad antioxidante, para el “chipilín” de 10-0,156 mg/mL y para el “tenquique” de 20-0,156 mg/mL.

Para la preparación de las decocciones 4 g de cada muestra se extrajeron con 100 mL de agua desionizada en ebullición por 5 min; posteriormente se realizó la filtración con papel filtro; se congelaron y liofilizaron (Liofilizador Ly-8- FM-ULE). Se pesaron 100 mg del residuo de “chipilín” y 400 mg del residuo de “tenquique” y se redisolvieron en un volumen conocido de agua desionizada para obtener las soluciones madre de 10 mg/mL y 40 mg/mL, respectivamente. A partir de estas se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones para evaluar la actividad antioxidante, para el “chipilín” de 10-0,156 mg/mL y para el “tenquique” de 20-0.156 mg/mL.

3.2.3 Valor nutricional

Para estudiar el valor nutricional de las muestras se analizaron las proteínas, los lípidos, los glúcidos o carbohidratos y las cenizas siguiendo los métodos oficiales de análisis de la AOAC (AOAC, 2016). El contenido de proteínas totales ($N \times 6,25$ para la planta y $N \times 4,38$ para el hongo) de las muestras secas se estimó por el método macro-Kjeldahl, los lípidos se determinaron por extracción con éter de petróleo de una masa conocida de muestra (3 g), usando un equipo de extracción *Soxhlet* y el contenido de cenizas se

determinó por incineración a 600 ± 15 °C. Los carbohidratos se calcularon por diferencia (valores en g/100g):

$$\text{Carbohidratos (g/100 g)} = (100 - (\text{proteínas} + \text{lípidos} + \text{cenizas}))$$

La energía total se calculó usando la siguiente ecuación (valores en g/100 g)

$$\text{Energía (kcal)} = 4 \times (\text{proteínas} + \text{glúcidos}) + 9 (\text{lípidos})$$

3.2.4 Análisis de fitoquímicos

3.2.4.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se determinaron a partir de los polvos secos de ambas matrices mediante cromatografía líquida de alta resolución con detectores de arreglo de diodos y espectrómetro de masas (**HPLC-DAD-MS**), según el procedimiento de Barros *et al* (2013).

Las muestras liofilizadas (20 mg) se disolvieron en 2 mL de metanol:agua 8:2 (v/v), filtrándose con discos de nylon 0.22 μm (*Millipore*); a viales, antes de su inyección.

Los compuestos fenólicos fueron analizados utilizando un cromatógrafo *Hewlett-Packard 1100* (*Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US*) con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos (**DAD**) acoplado a la estación de procesamiento de datos (*HP ChemStation*). Se empleó una columna *Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈* (3 μm , 4,6 x 150 mm) termostaticada a 35 °C. Los solventes utilizados fueron: ácido (A) fórmico en agua 0,1 % y (B) acetonitrilo. El gradiente de elución establecido fue isocrático 15 % por 5 min, 15 % B a 20 % B arriba de 5 min, 20-35 % B arriba de 10 min, 35-50 % por 10 min y reequilibración de la columna, usando un flujo de 0.5 mL/min. La doble detección en línea fue llevada a cabo en el DAD usando 280 y 370 nm como longitudes de onda preferidas y en un espectrofotómetro de masas (MS) conectada al sistema HPLC mediante la salida de celda del DAD.

Los compuestos fenólicos presentes en las muestras fueron caracterizados de acuerdo a sus espectros UV y de masas; y fueron comparados sus tiempos de retención con patrones cuando estos estaban disponibles. Para el análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos,

estos fueron comparados contra una curva de calibración obtenida por inyecciones de concentraciones conocidas de diferentes patrones.

3.2.4.2 Glúcidos

Los glúcidos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (**HPLC-RI**), según el procedimiento de Pinela *et al* (2012).

Las muestras de polvo seco de ambas matrices (1 g); previo procedimiento de desgrasado, fueron enriquecidos con melecitosa como patrón interno (**PI**, 5 mg/mL) para el “chpilín” y con rafinosa como patrón interno (**PI**, 5 mg/mL) para el “tenquique” y fueron extraídos con 40 mL de etanol al 80 % a 80 °C por 30 min. La suspensión resultante fue centrifugada (*Centurion K24OR refrigerated centrifuge, West Sussex, UK*) a 15000 g por 10 min. El sobrenadante fue concentrado a 60 °C bajo presión reducida y se realizaron tres lavados sucesivos de 10 mL de éter etílico. Después de concentrar a 40 °C, el residuo sólido fue disuelto en agua a un volumen final de 5 mL y filtrándose con discos de nylon 0.22 µm (*Millipore*).

Los glúcidos fueron analizados utilizando un HPLC con un sistema integrado con una bomba (*Knauer, Smartline system 1000, Berlin, Germany*), sistema desgasificador (*Smartline manager 5000*), automuestreador (*AS-2057 Jasco, Easton, MD, USA*) y un detector RI (*Knauer Smartline 2300*). Los datos fueron analizados por *Clarity 2.4 Software (DataApex)*. La separación cromatográfica fue lograda con una columna *Eurospher 100-5 NH₂* (5µm, 4.6 x 250 mm, *Knauer*) operando a 35 °C (*7971 R horno Grace*). La fase móvil fue acetonitrilo/agua desionizada, 70:30 (v/v) con un flujo de 1 mL/min. Los compuestos fueron identificados por comparación cromatográfica con patrones. La cuantificación se realizó usando el método del patrón interno y el contenido de glúcidos fue expresado en g/100 g de peso seco (DW).

3.2.4.3 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se determinaron usando cromatografía líquida ultra rápida acoplada a un detector de arreglo de fotodiodo (**UFCL-PDA**), según el procedimiento de Barros *et al* (2013).

Aproximadamente 2 g de polvo seco fueron extraídos con 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) por 45 min y filtrados subsecuentemente a través de papel Whatman No. 4. Antes del análisis, las muestras fueron filtradas a través de filtros de nylon 0.2 µm. El análisis se realizó utilizando un UFLC *Shimadzu* serie 20A (*Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*).

La separación se llevó a cabo en una columna *SphereClone* (*Phenomenex, Torrance, CA, USA*) fase reversa C₁₈ (5 µm, 250 x 4,6 mm) termostaticada a 35 °C. La elución se realizó con ácido sulfúrico (3,6 mM) usando un flujo de 0,8 mL/min. La detección se llevó a cabo en un PDA, usando 215 y 245 nm (para ácido ascórbico) como principales longitudes de onda. Los ácidos orgánicos encontrados fueron cuantificados por comparación del área de sus picos a 215 y 245 nm con curvas de calibración obtenidas de patrones comerciales de cada compuesto: ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido oxálico y ácido quínico. Los resultados fueron expresados en g/100 g de peso seco.

3.2.4.4 Tocoferoles

Los tocoferoles se determinaron según el procedimiento de Pinela *et al* (2012) utilizando el HPLC descrito en el apartado 3.2.3.2; y un detector de fluorescencia (FP-2020; Jasco). Butil-hidroxitolueno (BHT) solución en hexano (10 mg/mL; 100 µL) y solución de PI en hexano (tocol; 50 µg/mL; 400 µL) fueron adicionados a la muestra antes del procedimiento de extracción. Las muestras (500 mg aproximadamente de polvo seco) fueron homogenizadas en *vortex* (1 min) con metanol (4 mL). Luego, se adicionaron 4 mL de hexano y de nuevo se mezcló en el *vortex* por 1 min. Después se adicionó una solución acuosa saturada de NaCl (2 mL), la mezcla fue homogenizada por 1 min, centrifugada (5 min, 4000 g) y la capa superior transparente fue cuidadosamente transferida a un vial. La muestra fue re-extraída dos veces con hexano. La combinación de extractos fueron llevadas hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno, re-disuelta en 2 mL de n-hexano, deshidratada con sulfato de sodio anhidro, filtrada a través de filtros *Whatman* de nylon 0.2 µm y transferidos a viales oscuros antes del análisis.

El detector de fluorescencia fue programado para excitación a 290 nm y emisión a 330 nm. La separación cromatográfica se logró con una columna de fase normal de Polyamida II (250 mm x 4.6 mm) de *YMC Waters* operando a 30 °C. La fase móvil usada fue una mezcla

de *n*-hexano y acetato de etilo (70:30 v/v) a un flujo de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL.

Los compuestos fueron identificados por comparación cromatográfica con patrones auténticos. La cuantificación se basó en las curvas de calibración obtenidas de patrones comerciales de cada compuesto usando la metodología del PI. Los resultados fueron expresados en mg/100 g de peso seco.

3.2.4.5 Ácidos grasos

Los ácidos grasos, de las muestras secas, fueron determinados por un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (**GC-FID**)/ columna capilar, después del procedimiento de trans-esterificación según el procedimiento de Pinela *et al* (2012).

Los ácidos grasos obtenidos después de la extracción *Soxhlet* fueron metilados con 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v:v:v), durante al menos 12 h en baño de maría a 50 °C y 160 rpm; luego se añadieron 3 mL de agua desionizada, para obtener la separación de fases; se recuperaron los FAME con 3 mL de dietil éter agitando en *vortex* y la fase superior fue pasada a través de una micro-columna de sulfato de sodio anhidro, con el objetivo de eliminar el agua, la muestra fue recogida en un vial con *Teflón*, y antes de la inyección la muestra fue filtrada con un filtro nylon *Whatman* de 0.2 µm.

El análisis fue llevado a cabo en un sistema GC modelo DANI 1000 equipado con un inyector *split/splitless* y un detector de ionización de llama (FID) a 260 °C y una columna *Macherey-Nagel (Düren, Germany)* (50 % cianopropil-metil-50 % fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 µm). La temperatura del horno fue programada de la siguiente manera; la temperatura inicial de la columna fue 50 °C durante 2 min, luego 30 °C/min hasta los 125 °C, luego 5 °C hasta los 160 °C, 20 °C/min hasta los 180 °C, 3 °C/min hasta los 200 °C, 20 °C/min hasta los 220 °C y mantenido por 15 min. El gas portador fue hidrogeno con un flujo de 4.0 mL/min (0.61 bar). La inyección *Split* fue realizada a 250 °C.

La identificación de los ácidos grasos fue realizada por comparación de los tiempos de retención de los picos FAMEs de las muestras con patrones. Los resultados fueron grabados y procesados usando el *Software CSW 1.7 (DataApex 1.7)* y expresados en porcentaje relativo de cada ácido graso.

3.3 Extracción secuencial e identificación de compuestos de *Crotalaria longirostrata* y *Pseudofistulina radicata*

3.3.1 Patrones, reactivos, material y equipamiento

Los disolventes utilizados en estos procesos fueron hexano (*PamReac AppliChem*), diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) (*Carlo Erba Reagents Dasit Group*), todos ellos de grado analítico. El agua desionizada fue obtenida en un sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q (TGI Water Systems, EUA).

Las fracciones obtenidas se concentraron sobre presión reducida a temperatura de 40°C en un rotavapor (*Buchi R-210*) con baño calefactor (modelo B-491) de la misma marca. El agua de la fracción acuosa se eliminó en un liofilizador (*Telstar, modelo LyoQuest*).

Para la identificación de las moléculas presentes en los extractos se utilizaron los siguientes equipamientos:

- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (*Varian modelo Mercury Vx 400 MHz*), RMN: Utilizado para la obtención de los espectros de RMN de ^1H (400 MHz), DEPT y COSY. Las muestras se solubilizaron en cloroformo deuterado (CDCl_3) o en metanol deuterado (CD_3OD) (*Cambridge Isotope Laboratories*). Como referencia interna se utilizó la señal residual del disolvente sin deuterar. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz).
- Cromatógrafo de gases (*Hewlett Packard 5890 Series II*) acoplado a detector de masas (*MSD Hewlett Packard 5972*), GC/MS: Columna cromatográfica HP-5ms (Fenilo al 5 % y dimetilpolisiloxano al 95 %) con helio como gas portador. Identificación por comparación de los espectros de masas de los compuestos utilizando la biblioteca Wiley W9N08 de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology (NIST).

3.3.2 Obtención de extractos de *Crotalaria longirostrata* y *Pseudofistulina radicata*

Los extractos de *C. longirostrata* y *P. radicata* se obtuvieron por maceración del material seco y pulverizado siguiendo la secuencia hexano, DCM, DCM/MeOH (1:1), MeOH y H_2O , a temperatura ambiente y con agitación constante (McCloud, 2010). Posteriormente

se filtraron con embudo Büchner y se eliminó el disolvente por evaporación en el rotavapor y en el caso del agua mediante liofilización.

Se realizaron dos extracciones sucesivas de 100 mL para cada solvente, con 2 g de muestra y se reunían ambos extractos; a excepción de la extracción acuosa que se realizó una vez. De esta forma se obtuvieron los extractos designados por E. Hexano, E. DCM, E. DCM/MeOH, E. MeOH y E. H₂O; analizándose todas ellas por ¹H-RMN en cloroformo deuterado y/o metanol deuterado, y las tres primeras por CG/MS.

3.4 Bioensayos de *Crotalaria longirostrata* y *Pseudofistulina radicata*

3.4.1 Actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y de las decocciones de *C. longirostrata* y *P. radicata* empleando disoluciones de diferentes concentraciones (apartado 3.2.2) y también de los extractos secuenciales (apartado 3.3.2), mediante los ensayos que se describen a continuación y siguiendo la metodología descrita por Barros *et al* (2013). En todos los ensayos se utilizó trolox como control.

3.4.1.1 Efecto captador de radicales libres (DPPH)

La actividad captadora de radicales de DPPH fue realizada utilizando en lector de microplacas ELX800 (Bio-Tek instruments, Inc; Winooski, VT, EUA), los extractos y decocciones de diferentes concentraciones se depositaron en las microplacas de 96 pocillos (30 µL), donde se adicionaron 270 µL de una disolución metanólica de DPPH (6 x 10⁻⁵ mol/L). Después de un intervalo de 60 min en ausencia de luz, se midió la reducción del radical DPPH a través de la lectura de absorbancia a 515 nm

La actividad captadora de radicales libres (RSA) se calculó como el porcentaje de decoloración de DPPH usando la fórmula:

$$\% RSA = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

Donde A_S es la absorbancia de las muestras a 515 nm y A_{DPPH} es la absorbancia de la solución de DPPH. Los resultados se expresan en base a la concentración de la muestra capaz de inhibir el 50 % de los radicales DPPH (EC₅₀).

3.4.1.2 Poder reductor

Este ensayo se desarrolló empleando el lector de microplacas descrito anteriormente. Los extractos y decocciones de diferentes concentraciones (500 μL), se mezclaron con 500 μL de tampón fosfato de sodio (200 mmol/L; pH 6,6) y 500 μL de ferricianuro de potasio (0,1 % w/v). La mezcla se incubó a 50 °C durante 20 min. Pasado ese periodo se adicionaron 500 μL de ácido tricloroacético (10 % w/v). Las mezclas (800 μL) se transfirieron a la microplaca de 48 pocillos, donde se adicionaron 800 μL de agua desionizada y 160 μL de cloruro de hierro. De la misma forma se prepararon blancos con el disolvente de extracción, agua o metanol:agua 8:2 (v/v). La absorbancia se midió a 690 nm.

Se evaluó el poder reductor por la capacidad de convertir Fe^{3+} a Fe^{2+} , los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 0,5 de absorbancia (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico de absorbancia a 690 nm frente a la concentración del extracto o decocción.

3.4.1.3 Inhibición de la decoloración de β -caroteno

Se preparó primero la solución de β -caroteno disolviendo 2 mg de β -caroteno en 10 mL de cloroformo. Se transfirieron 2 mL de esta disolución a un matraz redondo donde se evaporó el disolvente en el rotavapor a 40 °C. Después se adicionaron 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween 80, 100 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. Se transfirieron alícuotas de 4,8 mL de esta emulsión a tubos de ensayos que contenían las diferentes concentraciones de los extractos y decocciones (0,2 mL), seguidamente se agitaron en *Vortex* y se midió a tiempo cero la absorbancia a 470 nm (*espectrofotómetro AnalytikJena*). Posteriormente se incubaron en baño a 50 °C durante 2 h y pasado ese tiempo se determinó nuevamente la absorbancia a 470 nm. De la misma forma se prepararon blancos con el disolvente de extracción, agua o metanol:agua 8:2 (v/v).

La inhibición de la decoloración de β -caroteno se evaluó a través del ensayo β -caroteno/linoleato, mediante la neutralización de los radicales libres del linoleato evitando la decoloración del β -caroteno, que es medido por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Decoloración} = (A_{\text{después } 2h} / A_{\text{inicial}}) \times 100$$

Los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 50 % de la capacidad antioxidante (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de decoloración frente a la concentración del extracto.

3.4.1.4 Inhibición de la peroxidación lipídica utilizando sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la realización de este ensayo se empleó tejido cerebral de cerdo (*Sus scrofa*), que se homogenizó en frío con tampón tris-HCl (20 mM; pH 7,4), centrifugando (*centrífuga refrigerada Centorion K24OR*) a 3500g durante 10 min, con el fin de producir un homogeneizado de tejido cerebral en proporción 1:2 (w/v). Se incubó una alícuota de 100 μ L de sobrenadante con las diferentes concentraciones de los extractos y decocciones (200 μ L), en presencia de 100 μ L de $FeSO_4$ (10 μ M) y 100 μ L de ácido ascórbico (0,1 mM) a 37 °C durante 1 h. La reacción se finalizó con la adición de 500 μ L ácido tricloroacético (28 %, v/v), seguida de 380 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2 %, w/v) y se colocó la mezcla en baño a 80 °C durante 20 min. Después de centrifugarla a 3000 g durante 10 min, para eliminar el precipitado de proteínas, la intensidad de color del complejo del sobrenadante se midió a través de su absorbancia a 532 nm. De la misma forma se prepararon blancos con el disolvente de extracción, agua o metanol:agua 8:2 (v/v).

La inhibición de la peroxidación lipídica fue evaluada por la disminución en sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS); la intensidad de color del ácido tiobarbitúrico-malondialdehído (MDA-TBA) fue medida por su absorbancia a 532 nm; el porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(A - B)/A] \times 100$$

Donde A es la absorbancia del blanco y B la absorbancia de la muestra. Los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 50 % de la inhibición de la peroxidación lipídica (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de inhibición TBARS frente a la concentración del extracto.

3.4.2 Actividad antitumoral

Para evaluar la actividad antitumoral in vitro se seleccionaron cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cáncer de pulmón),

HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular). Las células se mantuvieron rutinariamente en un medio de cultivo para células adherentes RPMI-1640 conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor y 2 mM de glutamina (MCF-7, NCI-H460); o en DMEM suplementado con 10 % de SFB, 2 mM de glutamina; 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (HeLa and HepG2) a 37°C en incubadora de aire humidificado conteniendo 5 % de CO₂ (*HF 151, Heal Force*). Todos los procedimientos se realizaron en ambiente aséptico en una cámara de flujo laminar vertical (*TLStar, AV-30/70*).

Cada línea celular fue colocada con una densidad apropiada (7.5×10^3 células/pozo para MCF-7y NCI-H460, o 1.0×10^4 células/pozo para HeLa and HepG2) en una placa de 96 pocillos. Las células fueron tratadas por 48 h con varias concentraciones de extracto metanólico, decocciones y extractos secuenciales (apartados 3.2.2 y 3.3.2). Seguido de este período de incubación, las células adherentes fueron fijadas por adición de ácido tricloroacético frío al 10 % (TCA 100 µL) y fue incubado por 60 min a 4 °C. Luego las placas fueron lavadas con agua desionizada y secadas; posteriormente se adicionó a cada pocillo una solución de sulforrodamina B (SRB) (0,1% en 1 % de ácido acético, 100 µL) e incubados por 30 min a temperatura ambiente. La SRB no ligada fue removida por lavado con ácido acético 1 %. Las placas se secaron al aire, la SRB ligada fue solubilizada con Tris 10 mM (200 µL) y la absorbancia fue medida a 540 nm en el lector de microplaca (apartado 3.2.5.1) (Barros, Pereira, & Ferreira, 2013; Guimarães et al., 2013).

3.4.3 Hepatotoxicidad

Un cultivo de células fue preparado a partir de un hígado de cerdo, recién recolectado, obtenido de un matadero local y fue designado como PLP2. Brevemente, los tejidos del hígado fueron enjuagados en solución salina equilibrada de Hank conteniendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y divididos en explantes de $1 \times 1 \text{ mm}^3$. Algunos de estos explantes fueron colocados en frascos para tejidos de 25 cm^2 en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 2mM de aminoácidos no esenciales y 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina e incubado a 37 °C con atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO₂. El medio se cambió cada dos días. Se continuó el cultivo de las

células con monitorización directa cada 2-3 días usando un microscopio invertido (*Nikon Eclipse Ts 100*).

Las células fueron sub-cultivadas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1.0×10^4 células/pozo, y cultivadas en medio DMEM con 10 % SFB, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Abreu et al., 2011; Barros, Pereira, & Ferreira, 2013). Las células se trataron con las diferentes concentraciones de muestra y se realizó el test de SRB descrito en el apartado 3.2.6.

3.4.4 Actividad antiinflamatoria

Los extractos, las decocciones y los extractos secuenciales (apartados 3.2.2 y 3.3.2) fueron disueltos en agua, las células de macrófago de rata RAW264.7 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB inactivado por calor y glutamina a 37 °C bajo 5 % de CO₂, en aire humidificado. La densidad de células fue 5×10^5 células/mL, la proporción de células muertas fue menor al 1 %, de acuerdo al ensayo de exclusión de azul tripano. Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos, luego se trataron con diferentes concentraciones de los extractos y decocciones por 1 h.

Dexametasona (50 µM) fue usada como control positivo, el siguiente paso fue estimulación con LPS (1 µg/mL) por 18 h. El efecto de las muestras testadas en ausencia de LPS también fue evaluado, con el objetivo de observar si induce cambios en los niveles basales de NO. En controles negativos, no se agregó LPS. Todas las muestras y LPS fueron disueltas en DMEM suplementado.

Para la determinación de óxido nítrico, fue utilizado el *Kit Griess Reagent System*; que contiene sulfanilamida, NED y soluciones de nitrito. 100 µL de sobrenadante de cada cultivo de células fue transferido a la placa en duplicada y mezclado con sulfanilamida y solución NED, por 5-10 min cada solución a temperatura ambiente. El nitrito producido fue determinado por medición de la densidad óptica a 515 nm, en el lector de microplaca (apartado 3.2.5.1) y fue comparado con la curva de calibración patrón (Peralta & Ferreira, 2015).

3.5 Análisis estadístico

Se utilizaron tres repeticiones de las muestras y se realizaron triplicados para cada lectura de concentración en todos los ensayos. Los resultados fueron expresados en valores medios \pm desviación estándar (SD). Los resultados fueron analizados usando análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos de test de Tukey's HSD $p = 0,05$. Para cada parámetro con solo dos valores disponibles se aplicó el test de *t*-Student para determinar la diferencia significativa entre las muestras correspondientes. Los análisis se llevaron a cabo usando IBM SPSS, versión 23.0. (IBM Corp., Armonk, New York, USA).

4 Resultados y discusión.

4.1 Valor nutricional y bioactividades de *Crotalaria longirostrata*.

4.1.1 Caracterización química, nutricional, glúcidos y ácidos orgánicos de *Crotalaria longirostrata*.

Los resultados del estudio del valor nutricional (proteínas, lípidos, glúcidos y cenizas) del valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos obtenidos en la planta seca *C. longirostrata*, se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Composición nutricional, valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos de planta seca *Crotalaria longirostrata* (media \pm SD).

<i>C. longirostrata</i>	
Valor nutricional	
Cenizas (g/100 g dw)	6,3 \pm 0,3
Proteínas (g/100 g dw)	39,0 \pm 0,6
Grasas (g/100 g dw)	2,96 \pm 0,01
Carbohidratos (g/100 g dw)	51,8 \pm 0,6
Energía (kcal/100 g dw)	390 \pm 1
Glúcidos	
Fructosa	1,66 \pm 0,01
Glucosa	0,42 \pm 0,01
Sacarosa	1,56 \pm 0,07
Trehalosa	0,17 \pm 0,01
Total (g/100 g dw)	3,80 \pm 0,07
Ácidos orgánicos	
Oxálico	1,07 \pm 0,02
Quínico	7,2 \pm 0,5
Málico	3,2 \pm 0,1
Cítrico	1,20 \pm 0,02
Fumárico	Tr
Total (g/100 g dw)	12,6 \pm 0,4

tr: trazas

Los carbohidratos fueron los macronutrientes más abundantes, seguido de un alto contenido de proteínas (39,0 g/100 g); al utilizar los datos de humedad del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)/Organización Panamericana de la Salud (OPS) (Menchú & Méndez, 2007) y convertir nuestros resultados en porción comestible (cenizas 1,19; proteínas 7,39; grasas 0,56 y carbohidratos 9,80) observamos que estos resultados concuerdan con la bibliografía citada en la **Tabla 3**, a excepción de la energía (73,82 kcal).

Según Menchú & Méndez (2007) el valor de energía, expresado en kilocalorías, para todos los casos ha sido determinado usando el equivalente calórico para proteínas, carbohidratos y grasas, dependiendo del tipo de cada alimento. Si colocamos los datos de la **Tabla 3** en la fórmula para obtener la Energía:

$$\text{Energía (kcal)} = 4 \times (\text{proteínas} + \text{glúcidos}) + 9 (\text{lípidos})$$

$$\text{Energía (kcal)} = 4 \times (7,0 + 9,1) + 9 (0,8)$$

$$\text{Energía (kcal)} = 71,6$$

Observamos que el valor es similar al obtenido de 73,82 kcal; por lo que el valor de 56 kcal reportado en la **Tabla 3** puede ser un error de cálculo de los autores antes mencionados.

En una dieta de aproximadamente 2000 kcal la ingesta aproximada de nutrientes es la siguiente: grasa total 70 g, hidratos de carbono 260 g, azúcares 90 g y proteínas 50 g (Parlamento Europeo, 2011). Al comparar los valores nutricionales de *C. longirostrata* con los valores nutricionales de 2 tazas de arroz cocido (energía 352 kcal, proteína 6,4 g, grasas 0,8, carbohidratos 79,7) (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO, 2014) podemos observar que *C. longirostrata* posee una baja contribución energética (73,82 kcal), un alto contenido en proteínas (7,39 g) y un bajo contenido en grasas (0,56 g) y carbohidratos (9,80 g); lo que la hace ideal para dietas con bajo aporte calórico; así como un alimento nutritivo y fácilmente intercambiable con este tipo de alimento de consumo habitual.

No se ha encontrado en la literatura, información relacionada con la caracterización de glúcidos y ácidos orgánicos de *C. longirostrata*.

Se identificaron cuatro azúcares libres: fructosa, glucosa, sacarosa y trehalosa (**Tabla 5**); presentando mayores niveles de fructosa (1,66 g/100 g), seguida muy de cerca por sacarosa (1,56 g/100 g). Con los procesos de digestión y absorción estos mono y disacáridos sufren transformaciones a través del metabolismo de carbohidratos para poder obtener energía o almacenarla en forma de glucógeno (Nelson & Cox, 2004). Al comparar los valores de los azúcares libres contra el total de carbohidratos, observamos que también posee carbohidratos de fibra dietética.

Cinco ácidos orgánicos fueron detectados: oxálico, quínico, málico, cítrico y fumárico (**Tabla 5**); siendo el más abundante el ácido quínico (7,2 g/100 g) el cual presenta actividad antioxidante (Hung et al., 2006).

4.1.2 Caracterización de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos encontrados en *C. longirostrata*, extracto hidrometanólico y decocción están listados en la **Tabla 6**. Fueron identificados ocho compuestos fenólicos: un ácido fenólico (el ácido cutárico) y siete flavonas (seis derivados glicosilados de apigenina y uno de luteolina). Las identificaciones fueron hechas teniendo en consideración todas las características de los espectros de UV-Vis y de los fragmentos obtenidos en el MS para cada compuesto.

Luteolina-6-*C*-glucósido (pico **3**), y apigenina-6-*C*-glucósido (pico **6**) fueron positivamente identificados de acuerdo con sus tiempos de retención y características de masa UV-Vis por comparación con patrones estándar.

Los picos **2**, **4**, **5**, **7** y **8** presentaron espectros UV similares como el pico **6** con λ_{\max} a 334-338 nm, sugiriendo que pueden derivar de apigenina. Todos estos picos muestran fragmentos de iones a m/z 311 y 341, correspondiendo a la aglicona (apigenina) +41 u y +71 u, respectivamente, estas son características de flavonas *C*-glicosiladas. El pico **2** presenta un ion molecular $[M-H]^-$ a m/z 593, que liberó tres iones fragmentados MS^2 a m/z 431 ($[M-162]^-$), m/z 341 ($[M-162-90]^-$) y m/z 311 ($[M-162-120]^-$). Este patrón de fragmentación permitió identificar el pico **2** como apigenina-*C*-glucósido-7-*O*-glucósido.

El pico **5** ($[M-H]$ a m/z 737) presenta una fragmentación resultante en varios fragmentos análogos: m/z 593, $[(M-H) - 144]^-$; 473, $[(M-H) - 144 - 120]^-$; y 413, $[(M-H) - 144 - 120 - 60]^-$. La pérdida significa escisiones en *C*-azúcar de las moléculas mientras que la pérdida de 144 u fue debida a la presencia de un resto que está *O*-unido a la molécula (Tahir et al., 2012). Sin embargo la observación del fragmento m/z 431 indica que uno de los sustituyentes es una *O*-hexosa, por lo tanto la molécula fue identificada como apigenina-*O*-hexosil-*C*-hexosil-*O*-ácido hidroximetil glutárico. Los compuestos restantes fueron identificados teniendo en cuenta el mismo patrón de fragmentación.

Los flavonoides, especialmente los derivados de apigenina, fueron los compuestos mayoritarios de la muestra. El pico **5**, apigenina-*O*-hexosil-*C*-hexosil-*O*-ácido hidroximetil glutárico fue el compuesto mayoritario. El extracto hidrometanólico presenta mayores concentraciones que la decocción, esto se puede deberse al hecho de que estos compuestos son sensibles a altas temperaturas y se pueden degradar fácilmente.

El ácido cutárico o *p*-cumárico posee propiedades antioxidantes del tipo *scavenger* (Kiliç & Yeşiloğlu, 2013), en su mayoría los compuestos identificados fueron flavonas ya que estas se encuentran en los tejidos de las leguminosas (Fabaceas) y de modo general los derivados de apigenina y luteolina tienen propiedades antioxidantes y antitumorales (Cartaya & Reynaldo, 2001; Trueba, 2003).

En la literatura científica se había descrito la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides realizada por métodos colorimétricos globales en esta planta (Jiménez-Aguilar & Grusak, 2015).

Tabla 6: Tiempos de retención (Rt), longitudes de onda de máxima absorción en la región visible (λ_{\max}), datos del espectro de masas, identificación y cuantificación tentativa (mg/g extracto) de compuestos fenólicos en *Crotalaria longirostrata*.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Identificación tentativa	Cuantificación		Prueba t-Student (p-valor)
						Extracto hidrometanólico	Decocción	
1	6,2	312	295	163(100)	Ácido cutárico	1,52 ± 0,03	1,37 ± 0,01	<0,001
2	12,7	338	593	431(62),341(100),311(60),283(10)	Apigenina-C-hexosil O-hexosido	5,67 ± 0,03	4,64 ± 0,05	<0,001
3	15,2	348	447	357(45),327(100),285(20)	Luteolina-6-C-glucósido	6,80 ± 0,07	5,83 ± 0,03	<0,001
				737(100),593(31),431(49),413(10),341(5)	Apigenina-O-pentosil-O-hexosil -C-hexosil-O-ácido	4,68 ± 0,09	4,64 ± 0,04	0,397
4	16,4	336	869	,311(12),283(8)	hidroximetil glutárico			
				593(100),473(5),431(89),413(7),341(5),3	Apigenina-O-hexosil-C-hexosil-O-ácido	65,5 ± 0,3	56,98 ± 0,05	<0,001
5	16,9	338	737	11(5),283(3)	hidroximetil glutárico			
6	19,7	338	431	341(5),311(100),283(10)	Apigenina-6-C-glucósido	7,85 ± 0,05	8,56 ± 0,09	<0,001
					Apigenina-C-hexosil-O-acetilhexosil-O-ácido	7,83 ± 0,09	3,68 ± 0,04	<0,001
7	22,0	334	779	635(100),431(44),341(5),311(4),283(3)	hidroximetil glutárico			
					Apigenina-O-hexosil-O-ácido hidroximetil	0,96 ± 0,05	0,54 ± 0,02	<0,001
8	27,7	336	575	431(100),269(47)	glutárico			
Total ácidos fenólicos						1,52 ± 0,03	1,37 ± 0,01	<0,001
Total flavonoides						99,32 ± 0,73	84,86 ± 0,09	<0,001
Total compuestos fenólicos						100,84 ± 0,75	86,24 ± 0,08	<0,001

4.1.3 Caracterización de ácidos grasos y tocoferoles

Los resultados de la composición de ácidos grasos, ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y de tocoferoles de la planta seca de *C. longirostrata* se presentan en la **Tabla 7**.

El perfil de ácidos grasos que presentó *C. longirostrata* fue una relación de ácidos grasos totales: PUFA > SFA > MUFA; donde son mayoritarios los ácido grasos poliinsaturados (72,59%), siendo los ácidos grasos mayoritarios el ácido α -linolénico (C18:3n3, 62,11%) y el ácido palmítico (C16:0, 16,29%). La FAO recomienda alimentos ricos en PUFA porque estos disminuyen la concentración del colesterol de las LDL y la relación colesterol total/colesterol HDL (FAO, 2008).

En el análisis de tocoferoles *C. longirostrata* presentó dos isoformas (α y β), siendo el α -Tocoferol (4,24 mg/100g) el mayoritario en la muestra y la isoforma con mayor actividad antioxidante (Bruneton, 2001; Carochó & Ferreira, 2013a). Las recomendaciones de la RDA (Recommended Dietary Allowance) con respecto al consumo adecuado de vitamina E es de 15 mg al día, y el adulto en promedio consume por la dieta aproximadamente 11 mg de α -Tocoferol (*Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*, 2000); la cantidad de α -Tocoferol presente en las hojas de *C. longirostrata* puede considerarse una fuente de vitamina E; ya que suple alrededor de la mitad de la ingesta diaria promedio en un adulto.

Podemos hablar de *C. longirostrata* como un alimento funcional ya que presenta moléculas bioactivas que generan beneficios a la salud, más allá de la nutrición; como es el caso del ácido α -linolénico y la vitamina E.

Tabla 7: Caracterización de ácidos grasos, en porcentaje relativo, y tocoferoles (mg/100 g) presentes en las muestras de planta seca de *Crotalaria longirostrata* (media \pm SD).

<i>C. longirostrata</i>	
Ácidos grasos	
C6:0	0,018 \pm 0,001
C8:0	0,032 \pm 0,007
C10:0	0,021 \pm 0,002
C12:0	0,129 \pm 0,002
C13:0	0,012 \pm 0,001
C14:0	0,397 \pm 0,006
C15:0	0,459 \pm 0,001
C16:0	16,29 \pm 0,05
C16:1	0,147 \pm 0,001
C17:0	0,345 \pm 0,001
C18:0	3,801 \pm 0,006
C18:1n9	2,371 \pm 0,012
C18:2n6	9,70 \pm 0,01
C18:3n3	62,11 \pm 0,03
C20:0	1,582 \pm 0,005
C20:1	0,131 \pm 0,002
C20:2	0,34 \pm 0,01
C20:3n6	0,037 \pm 0,001
C20:3n3+C21:0	0,09 \pm 0,01
C20:5n3	0,070 \pm 0,002
C22:1n9	0,98 \pm 0,01
C23:0	0,33 \pm 0,02
C22:6n3	0,250 \pm 0,003
C24:0	0,38 \pm 0,01
SFA (%)	23,78 \pm 0,04
MUFA (%)	3,63 \pm 0,02
PUFA (%)	72,59 \pm 0,02
Tocoferoles	(mg/100 g dw)
α -Tocoferol	4,24 \pm 0,07
β -Tocoferol	0,17 \pm 0,02
Total	4,40 \pm 0,09

Los resultados son expresados como la media \pm desvío estándar. Ácido caproico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido láurico (C12:0); ácido tridecanoico (C13:0); ácido mirístico (C14:0); ácido pentadecanoico (C15:0); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoleico (C16:1); ácido heptadecanoico (C17:0); ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1n9); ácido linoleico (C18:2n6); ácido α -linolénico (C18:3n3); ácido araquídico (C20:0); ácido eicosenoico (C20:1); ácido cis-11,14-eicosadienoico (C20:2); ácido eicosatrienoico (C20:3n6); ácido cis-11,14,17-eicosatrienoico y ácido heneicosanoico (C20:3n3 + C21:0); ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n3); ácido erúxico (C22:1n9); ácido tricosanoico (C23:0); ácido docosahexaenoico (C22:6n3), ácido tetracosanoico (C24:0); SFA saturated fatty acids (ácidos grasos saturados); MUFA monounsaturated fatty acids (ácidos grasos monoinsaturados) y PUFA polyunsaturated fatty acids (ácidos grasos polinsaturados).

4.1.4 Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de *Crotalaria longirostrata*

Los resultados de la actividad antioxidante, de la actividad antitumoral, de citotoxicidad en células no tumorales y de la actividad antiinflamatoria tanto del extracto hidrometanólico como de la decocción de *C. longirostrata* se muestran en la **Tabla 8**.

Para la evaluación de la actividad antioxidante no existe un único método que pueda determinar todos los mecanismos de protección contra la oxidación, por ello se realizaron cuatro métodos que son la captación de radicales libres (DPPH), el poder reductor, la inhibición de la decoloración de β -caroteno y la peroxidación lipídica (TBARS).

La decocción presentó los valores más bajos de EC_{50} en la actividad captadora DPPH y en la inhibición TBARS; y el extracto hidrometanólico en el ensayo de poder reductor y la inhibición de β -caroteno respectivamente, esto puede explicarse por su perfil fenólico; donde los compuestos mayoritarios detectados son flavonoides.

En la literatura se reporta actividad antioxidante de *C. longirostrata* realizada por métodos colorimétricos (Jiménez-Aguilar & Grusak, 2015).

La evaluación de la actividad antitumoral del extracto hidrometanólico y de la decocción se desarrolló sobre cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cáncer de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular) y la hepatotoxicidad sobre un cultivo primario de células de hígado de cerdo: PLP2. La evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidrometanólico y de la decocción se desarrolló con células de macrófago de rata (RAW264.7).

Ninguno de los dos extractos presentó actividad antitumoral y antiinflamatoria.

Al comparar los resultados de *C. longirostrata* con *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. (Fabacea) un árbol nativo de América; el extracto metanólico de las hojas no presenta actividad antitumoral frente a la línea MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y no presenta citotoxicidad (Tantengco & Jacinto, 2015), resultados similares a los obtenidos.

C. longirostrata como un potencial alimento funcional, se hace necesario garantizar la ausencia de citotoxicidad en contra de células de hígado, que son consideradas el mejor

modelo *in vitro* para estudios humanos de citotoxicidad. Tanto la decocción como el extracto hidrometanólico no presentan toxicidad a las células hepáticas PLP2; ya que el valor de GI_{50} obtenido fue mayor que la concentración más alta estudiada ($>400 \mu\text{g/mL}$).

Tabla 8: Actividad antioxidante, actividad antitumoral, hepatotoxicidad y actividad antiinflamatoria, del extracto hidrometanólico y decocciones de *Crotalaria longirostrata* (media \pm SD).

<i>C. longirostrata</i>			
	Extracto hidrometanólico	Decocción	Prueba t-Student (<i>p</i> -valor)
Actividad antioxidante (EC_{50} mg/mL)			
Actividad captadora DPPH	2,71 \pm 0,12	1,35 \pm 0,09	<0,001
Poder reductor	1,00 \pm 0,01	1,13 \pm 0,02	<0,001
Inhibición decoloración β -caroteno	0,227 \pm 0,008	0,52 \pm 0,02	<0,001
Inhibición TBARS	0,84 \pm 0,02	0,31 \pm 0,01	<0,001
Actividad antitumoral (GI_{50} $\mu\text{g/mL}$)			
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	>400	>400	-
NCI-H460 (cáncer de pulmón)	>400	>400	-
HeLa (carcinoma cervical)	>400	>400	-
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	>400	>400	-
Hepatotoxicidad (GI_{50} $\mu\text{g/mL}$)			
PLP2 (células hepáticas de cerdo)	>400	>400	-
Actividad antiinflamatoria (EC_{50} $\mu\text{g/mL}$)			
RAW264.7	>400	>400	-

Valores de EC_{50} (Media \pm SD): Concentración de muestras correspondientes al 50% de actividad antioxidante o 0,5 de absorbancia en el ensayo de poder reductor. Valores EC_{50} para Trolox (control positivo): 42 $\mu\text{g/mL}$ (actividad captadora DPPH), 41 $\mu\text{g/mL}$ (poder reductor), 18 $\mu\text{g/mL}$ (inhibición de decoloración β -caroteno) y 23 $\mu\text{g/mL}$ (inhibición TBARS). Valores de GI_{50} (Media \pm SD) corresponden a la concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento en las líneas de células tumorales humanas o en un cultivo primario de células de hígado-PLP2. Valores de GI_{50} para elipticina (control positivo): 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (MCF-7), 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (NCI-H460), 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (HeLa), 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (HepG2) y 3 $\mu\text{g/mL}$ (PLP2). Valores de EC_{50} (Media \pm SD): Concentración de muestra correspondiente a 50% de inhibición de la producción de NO en comparación con el control negativo (100% de la producción de NO). Valores de EC_{50} para dexametasona: 16 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 Caracterización química y bioactividades de los extractos secuenciales de *Crotalaria longirostrata*

4.2.1 Extractos secuenciales obtenidos de *Crotalaria longirostrata* y sus rendimientos

En el proceso de extracción por maceración con diferentes solventes de planta seca de *C. longirostrata* se obtuvieron los extractos y rendimientos que se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración de *Crotalaria longirostrata*.

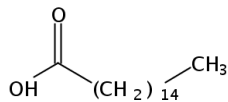
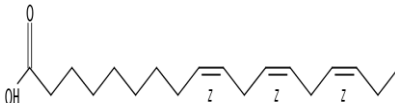
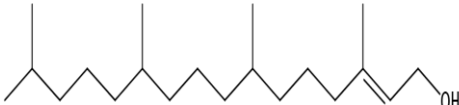
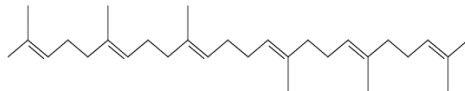
<i>C. longirostrata</i>		
Extractos	Masa (mg)	Rendimiento (%)
E. Hexano	63,0	3,15
E. DCM	61,4	3,07
E. DCM/MeOH	317,3	15,87
E. MeOH	193,6	9,68
E. H ₂ O	65,0	3,25

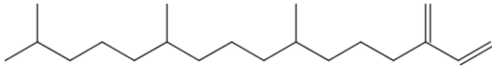
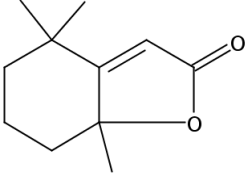
El mayor rendimiento se obtuvo para el extracto diclorometano/metanol (E. DCM/MeOH), lo que indica que una cantidad mayor de compuestos presentan una polaridad intermedia, el segundo mayor rendimiento lo encontramos en el extracto de metanol (E. MeOH).

4.2.2 Identificación de compuestos en extractos secuenciales de *Crotalaria longirostrata*

Los procedimientos descritos en la metodología permitieron la identificación de los compuestos descritos en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Listado de compuestos identificados en los extractos secuenciales de *Crotalaria longirostrata*.

Número	Nombre común	Estructura	Propiedades/Usos	Extracto en el que aparece
1	Ácido palmítico		Recubrimientos para evitar el desarrollo de microorganismos, prolongar la vida de anaquel de los productos agrícolas y mantener las propiedades sensoriales de estos (Lorena et al., 2010). Ha demostrado ser eficaz en el tratamiento y prevención de variadas enfermedades, tales como cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y lesión por isquemia/reperfusión (Valenzuela et al., 2014).	E. Hexano
2	Ácido linolénico		Aumenta el número de adipocitos y mejora la tolerancia a la glucosa, potencial agente nutricional para combatir la obesidad y la diabetes tipo 2 (Wang et al., 2017).	E. Hexano
3	Fitol		Presenta una alta actividad antimicrobiana, alta estabilidad y baja toxicidad (Ghaneian et al., 2015).	E. Hexano
4	Escualeno		Propiedades antioxidantes y cardioprotectoras (Aguilar et al., 2011;	E. Hexano

5	Neofitadieno		<p>Serrano, López & Espuñes, 2006).</p> <p>Actividad antiinflamatoria (Carretero et al., 2008).</p> <p>Cuando el neofitadieno se combina con el fitol, se obtiene un pequeño efecto sinérgico en la actividad insecticida contra el escarabajo colorado de la patata (CPBs) (Cáceres et al., 2015)</p> <p>Uno de los compuestos clave del sabor del tabaco, responsable de propiedades organolépticas únicas y de la formación del aroma del tabaco; usado habitualmente en cigarrillos electrónicos como aditivo de “real” aroma ardiente de cigarrillo (Carretero et al., 2008).</p>	E. Hexano y E. DCM
6	Dihidroactinidiolida		<p>Actividad antibacteriana (<i>Escherichia coli</i>; <i>Klebsiella pneumoniae</i>; <i>Proteus mirabilis</i>; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>; <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus</i>) (Canales et al., 2016).</p>	E. Hexano

En los extractos más apolares, obtenidos por maceración de *C. longirostrata*: E. Hexano y E. DCM; se identificaron dos ácidos grasos (palmítico y linolénico), tres diterpenos lineales (fitol, escualeno y neofitadieno) y un compuesto derivado de la degradación de terpenos (dihidroactinidiolida) mediante sus espectros de ¹H-RMN y por CG-MS.

4.2.3 Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de los extractos secuenciales de *Crotalaria longirostrata*

Los resultados de la actividad antioxidante, de la actividad antitumoral, de citotoxicidad en células no tumorales y actividad antiinflamatoria; de los extractos secuenciales de *C. longirostrata* se muestran en la **Tabla 11**.

Los valores más bajos de EC₅₀ para los ensayos de poder reductor e inhibición de decoloración de β-caroteno los presenta el E. DCM; el compuesto neofitadieno puede ser el responsable de esta acción antioxidante; actuando como donador de electrones en el caso del poder reductor o inhibiendo la continuación de la reacción en cadena de la oxidación en el ensayo del β-caroteno; mecanismo que puede llevar a cabo por su estructura química.

En la actividad captadora de radicales libres DPPH solo el E. MeOH presentó actividad y en el ensayo de inhibición TBARS el E. H₂O presentó mejor desempeño; por lo que moléculas polares son las responsables de estas actividades antioxidantes.

En la actividad antitumoral, nuevamente el extracto que mostró mejor desempeño fue el de DCM. De igual manera en la actividad antiinflamatoria el E. DCM es el que presenta el menor EC₅₀. Si bien los valores de GI₅₀ de la actividad antitumoral son inferiores a los GI₅₀ para hepatotoxicidad, siguen estando en un rango cercano o en el caso de la línea celular NCI-H460 (cáncer de pulmón) que sobrepasa dichos valores, no podemos concluir que el E. DCM no presente hepatotoxicidad. Podría realizarse un fraccionamiento de este extracto e intentar aislar el/los posibles principios activos y determinar a qué fracción está o no ligada la hepatotoxicidad.

A diferencia de los resultados presentados en la **Tabla 8**, donde el extracto hidrometanólico y la decocción no presentaron actividades antitumorales, ni antiinflamatorias; podemos decir que el E. DCM, extrae moléculas bioactivas que no se extraen en los métodos antes mencionados.

Tabla 11: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos secuenciales de *Crotalaria longirostrata*.

	E. Hexano	E. DCM	E. DCM/MeOH	E. MeOH	E. H₂O
Actividad antioxidante (EC₅₀ mg/mL)					
Actividad captadora DPPH	>1	>1	>1	1,99 ± 0,02	>1
Poder reductor	0,628 ± 0,006 ^c	0,515 ± 0,004 ^d	1,173 ± 0,003 ^b	1,17 ± 0,02 ^b	1,867 ± 0,002 ^a
Inhibición decoloración β-caroteno	0,86 ± 0,03 ^b	0,24 ± 0,0037 ^e	0,93 ± 0,03 ^a	0,72 ± 0,04 ^d	0,80 ± 0,02 ^c
Inhibición TBARS	>1	0,70 ± 0,004 [*]	>1	>1	0,59 ± 0,01 [*]
Actividad antitumoral (GI₅₀ µg/mL)					
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	243 ± 12 ^b	34 ± 3 ^c	224 ± 7 ^b	323 ± 5 ^a	>400
NCI-H460 (cáncer de pulmón)	243 ± 13 ^b	88 ± 3 ^c	311 ± 10 ^a	>400	>400
HeLa (carcinoma cervical)	266 ± 8 ^b	37 ± 2 ^d	74 ± 5 ^c	283 ± 12 ^a	>400
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	193 ± 11 ^c	36 ± 2 ^d	210 ± 19 ^b	358 ± 4 ^a	>400
Hepatotoxicidad (GI₅₀ µg/mL)					
PLP2 (células hepáticas de cerdo)	>400	83 ± 6	>400	>400	>400
Actividad antiinflamatoria (EC₅₀ µg/mL)					
RAW264.7	221 ± 4 ^b	60 ± 5 ^c	265 ± 9 ^a	>400	>400

Valores de EC₅₀ (Media ± SD): Concentración de muestras correspondientes al 50% de actividad antioxidante o 0,5 de absorbancia en el ensayo de poder reductor. Valores EC₅₀ para Trolox (control positivo): 42 µg/mL (actividad captadora DPPH), 41 µg/mL (poder reductor), 18 µg/mL (inhibición de descoloración β-caroteno) y 23 µg/mL (inhibición TBARS). Valores de GI₅₀ (Media ± SD) corresponden a la concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento en las líneas de células tumorales humanas o en un cultivo primario de células de hígado-PLP2. Valores de GI₅₀ para elipticina (control positivo): 1,0 µg/mL (MCF-7), 1,0 µg/mL (NCI-H460), 2,0 µg/mL (HeLa), 1,0 µg/mL (HepG2) y 3 µg/mL (PLP2). Valores de EC₅₀ (Media ± SD): Concentración de muestra correspondiente a 50% de inhibición de la producción de NO en comparación con el control negativo (100% de la producción de NO). Valores de EC₅₀ para dexametasona: 16 µg/mL. En cada línea, letras diferentes corresponden a valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). * Valores estadísticamente diferentes, test T de Student $p < 0,001$.

4.3 Valor nutricional y bioactividades de *Pseudofistulina radicata*.

4.3.1 Caracterización química, nutricional, glúcidos y ácidos orgánicos de *Pseudofistulina radicata*.

Los resultados del estudio del valor nutricional (proteínas, lípidos, glúcidos y cenizas), del valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos obtenidos en el hongo seco *P. radicata*, se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Composición nutricional, valor energético, glúcidos y ácidos orgánicos del hongo seco *Pseudofistulina radicata* (media \pm SD).

<i>P. radicata</i>	
Valor nutricional	
Cenizas (g/100 g dw)	6,0 \pm 0,4
Proteínas (g/100 g dw)	10,1 \pm 0,1
Grasas (g/100 g dw)	0,524 \pm 0,004
Carbohidratos (g/100 g dw)	83,4 \pm 0,3
Energía (kcal/100 g dw)	379 \pm 1
Glúcidos (g/100 g dw)	
Fructosa	0,73 \pm 0,08
Manitol	9,5 \pm 0,2
Trehalosa	8,36 \pm 0,03
Total	18,6 \pm 0,3
Ácidos orgánicos (g/100 g dw)	
Oxálico	0,03 \pm 0,01
Málico	1,17 \pm 0,03
Fumárico	Tr
Total	1,21 \pm 0,04

tr: trazas

Los macronutrientes más abundantes en *P. radicata* son los carbohidratos (83,4g/100g), seguidos de las proteínas (10,1g/100g) y posee un bajo aporte calórico. No se ha encontrado en la literatura, información relacionada con el valor nutricional de este hongo; pero al compararlo con un hongo de la misma familia (Fistulinacea) *Fistulina hepatica* se observan diferencias en sus contenidos nutricionales (proteínas 22,60, grasas 3,17, carbohidratos 66,0 y cenizas 8,20) (Ouzouni et al., 2009). Pero al compararlo con uno de los hongos comestibles más cultivados a nivel mundial; *Agaricus bisporus* (Aida et al., 2009; Miles & Chang, 2004), observamos grandes similitudes en sus contenidos nutricionales (proteínas

14,08, grasas 2,17, carbohidratos 74,02, cenizas 9,73 y energía 371,93) (Reis et al., 2012) por lo que sería fácil intercambiarlos en una dieta alta en proteínas y baja en grasas.

Se identificaron tres azúcares libres fructosa, manitol y trehalosa (**Tabla 12**). Manitol es el que se encuentra en mayor cantidad (9,5 g/100 g), seguido por trehalosa (8,36 g/100 g). A diferencia de *A. bisporus* (total azúcares libres 59,42 g/100 g dw) (Reis et al., 2012) *P. radicata* contiene una baja cantidad de azúcares totales libres (18,6 g/100 g dw) y una alta cantidad de carbohidratos (83,4 g/100 g dw), esto puede deberse a que *P. radicata* posee un alto nivel de carbohidratos de fibra dietética.

Los ácidos orgánicos presentes en *P. radicata* son oxálico, málico y fumárico (**Tabla 12**); siendo el más abundante el ácido málico (1,17 g/100g)

No se ha encontrado en la literatura, información relacionada con la caracterización de glúcidos y ácidos orgánicos de *P. radicata*, pero concuerda con la bibliografía general que fructosa, manitol y trehalosa son los azúcares mayoritarios presentes en los hongos (Toledo et al., 2016). Los ácidos orgánicos identificados han sido reportados previamente en *Fistulina hepatica* (Ribeiro et al., 2007).

4.3.2 Caracterización de ácidos grasos y tocoferoles.

Los resultados de la composición de ácidos grasos, ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y de tocoferoles del hongo seco *P. radicata* se presenta en la **Tabla 13**.

El perfil de ácidos grasos que presentó *P. radicata* fue una relación de ácidos grasos totales: SFA >PUFA >MUFA; donde son mayoritarios los ácido grasos saturados (70,9 %); siendo los ácidos grasos mayoritarios, el ácido palmítico (C16:0, 56,84 %) y el ácido linoleico (C18:2n6, 14,19 %). Al comparar *P. radicata* con *A. bisporus* observamos un perfil de ácidos grasos diferente; donde en el ácido linoleico (77,7 %) es el ácido mayoritario siendo la fracción PUFA la dominante, seguida de SFA con el ácido palmítico (11,9 %).

En el análisis de tocoferoles *P. radicata* presentó dos isoformas (α y δ), siendo el δ - tocoferol (0,720 mg/100g) el mayoritario en la muestra. A diferencia de *A. bisporus* que

presenta las cuatro isoformas, con un total de tocoferoles de 59,42 mg/100 g dw; siendo el mayoritario el δ -tocoferol (39,77 mg/100g) (Reis et al., 2012).

Las diferencias entre los valores de azúcares libres del apartado 4.3.1 y, los ácidos grasos y tocoferoles de *P. radicata* y *A. bisporus* no solo se deben a diferencias entre familias de hongos, sino también al hecho de que *P. radicata* es una muestra salvaje a diferencia de *A. bisporus* que es una muestra cultivada; así como el estado de desarrollo y las condiciones de pre y post cosecha (Manzi, Aguzzi, & Pizzoferrato, 2001). Todos estos parámetros influyen la composición química y el valor nutricional de cada especie.

Tabla 13: Caracterización de los ácidos grasos, en porcentaje relativo, presentes en las muestras de hongo seco de *Pseudofistulina radicata* (media \pm SD).

<i>P. radicata</i>	
Ácidos grasos	
C8:0	0,287 \pm 0,007
C10:0	0,306 \pm 0,008
C12:0	0,35 \pm 0,01
C14:0	1,323 \pm 0,008
C15:0	1,55 \pm 0,06
C16:0	56,84 \pm 0,01
C17:0	0,78 \pm 0,04
C18:0	7,60 \pm 0,05
C18:1n9	4,6 \pm 0,1
C18:2n6	14,19 \pm 0,09
C18:3n6	0,124 \pm 0,007
C20:1	8,4 \pm 0,3
C20:2	0,519 \pm 0,001
C20:4n6	0,335 \pm 0,007
C20:5n3	0,20 \pm 0,01
C22:0	0,217 \pm 0,004
C22:1n9	0,702 \pm 0,001
C23:0	0,518 \pm 0,004
C22:6n3	0,142 \pm 0,002
C24:0	1,10 \pm 0,03
SFA (%)	70,9 \pm 0,1
MUFA (%)	13,6 \pm 0,2
PUFA (%)	15,52 \pm 0,06
Tocoferoles	(mg/100g dw)
α -Tocoferol	0,022 \pm 0,001
δ -Tocoferol	0,720 \pm 0,001
Total	0,740 \pm 0,001

Los resultados son expresados como la media \pm desvío estándar. Ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido láurico (C12:0); ácido mirístico (C14:0); ácido pentadecanoico (C15:0); ácido palmítico (C16:0); ácido heptadecanoico (C17:0); ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1n9); ácido linoleico (C18:2n6); ácido α -linolénico (C18:3n3); ácido γ -linolénico (C18:3n6); ácido eicosenoico (C20:1); ácido cis-11,14-eicosadienoico (C20:2); ácido araquidónico (C20:4n6); ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n3); ácido docosanoico (C22); ácido erúxico (C22:1n9); ácido tricosanoico (C23:0); ácido docosahexaenoico (C22:6n3), ácido tetracosanoico (C24:0); SFA saturated fatty acids (ácidos grasos saturados); MUFA monounsaturated fatty acids (ácidos grasos monoinsaturados); PUFA polyunsaturated fatty acids (ácidos grasos polinsaturados).

4.3.3 Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de *Pseudofistulina radicata*

Los resultados de la actividad antioxidante, de la actividad antitumoral, de citotoxicidad en células no tumorales y actividad antiinflamatoria; del extracto hidrometanólico y de la decocción de *P. radicata* se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos hidrometanólicos y decocciones de *Pseudofistulina radicata* (media \pm SD).

	<i>P. radicata</i>		Prueba t-Student (<i>p</i> -valor)
	Extracto hidrometanólico	Decocción	
Actividad antioxidante (EC₅₀ mg/mL)			
Actividad captadora DPPH	6,8 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	<0,001
Poder reductor	3,52 \pm 0,07	1,82 \pm 0,01	<0,001
Inhibición decoloración β -caroteno	1,17 \pm 0,06	0,94 \pm 0,03	<0,001
Inhibición TBARS	1,1 \pm 0,2	2,59 \pm 0,05	<0,001
Actividad antitumoral (GI₅₀ μg/mL)			
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	162 \pm 13	177 \pm 14	0,002
NCI-H460 (cáncer de pulmón)	317 \pm 24	310 \pm 16	0,261
HeLa (carcinoma cervical)	170 \pm 4	193 \pm 16	<0,001
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	138 \pm 11	152 \pm 8	<0,001
Hepatotoxicidad (GI₅₀ μg/mL)			
PLP2 (células hepáticas de cerdo)	359,23 \pm 14,62	>400	-
Actividad antiinflamatoria (EC₅₀ μg/mL)			
RAW264.7	229 \pm 21	230 \pm 23	0,947
Compuestos relacionados (mg/100 g dw)			
Ácido cinámico	31,25 \pm 0,50	42,28 \pm 0,98	

Valores de EC₅₀ (Media \pm SD): Concentración de muestras correspondientes al 50% de actividad antioxidante o 0.5 de absorbancia en el ensayo de poder reductor. Valores EC₅₀ para Trolox (control positivo): 41 μ g/mL (poder reductor), 42 μ g/mL (actividad captadora DPPH), 18 μ g/mL (inhibición de decoloración β -caroteno) y 23 μ g/mL (inhibición TBARS). Valores de GI₅₀ (Media \pm SD) corresponden a la concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento en las líneas de células tumorales humanas o en un cultivo primario de células de hígado-PLP2. Valores de GI₅₀ para elipticina (control positivo): 1,0 μ g/mL (MCF-7), 1,0 μ g/mL (NCI-H460), 2,0 μ g/mL (HeLa), 1,0 μ g/mL (HepG2) y 3 μ g/mL (PLP2). Valores de EC₅₀ (Media \pm SD): Concentración de muestra correspondiente a 50% de inhibición de la producción de NO en comparación con el control negativo (100% de la producción de NO). Valores de EC₅₀ para dexametasona: 16 μ g/mL.

Para la actividad antioxidante, la decocción de *P. radicata* muestra los EC₅₀ más bajos a excepción del ensayo de inhibición TBARS; mostrando una efectiva capacidad antioxidante.

En la evaluación de la actividad antitumoral para las líneas celulares de MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y NCI-H460 (cáncer de pulmón) no hay diferencias estadísticamente significativas entre los GI₅₀ del extracto hidrometanólico y la decocción; mientras que las líneas celulares HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular) el mejor desempeño fue del extracto hidrometanólico; por lo que podemos afirmar en general que el extracto hidrometanólico posee mejor actividad antitumoral que la decocción.

En el ensayo de actividad antiinflamatoria no hay diferencia estadísticamente significativa entre los EC₅₀ del extracto hidrometanólico y la decocción; por lo que ambos poseen un potencial efecto antiinflamatorio. Ambos extractos demuestran con una disminución relevante de la producción de NO incluso en presencia de extractos de menor concentración (hasta 400 µg/mL)

En el ensayo de hepatotoxicidad el extracto hidrometanólico muestra una concentración cercana al valor de la concentración más alta estudiada (>400 µg/mL), siendo esta concentración segura para las células PLP2.

Al realizarse todo el procedimiento de identificación de compuestos fenólicos descritos en el apartado 3.2.4.1 se identificó solamente el ácido cinámico como derivado de compuesto fenólico, en mayor proporción en la decocción (42,28 mg/100 g), ésta molécula y sus derivados poseen actividades antioxidantes (Martínez-Valverde, Peragio, & Ros, 2000), la efectiva actividad antioxidante presentada por la decocción puede deberse a la presencia de dicho compuesto. No se ha encontrado en la literatura, información relacionada con las bioactividades de *P. radicata*, pero el ácido cinámico se identificó en *Fistulina hepatica*, especie que pertenece a la misma familia de *P. radicata* (Vaz et al., 2011).

4.4 Caracterización química y bioactividades de los extractos secuenciales de *Pseudofistulina radicata*.

4.4.1 Extractos secuenciales obtenidos de *Pseudofistulina radicata* y sus rendimientos.

En el proceso de extracción por maceración con diferentes solventes de carpóforos secos de *P. radicata* se obtuvieron los extractos y rendimientos que se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15: Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración de *P. radicata*.

<i>P. radicata</i>		
Extractos	Masa (mg)	Rendimiento (%)
E. Hexano	12,4	0,62
E. DCM	13,3	0,66
E. DCM/MeOH	195,0	9,75
E. MeOH	195,7	9,78
E. H ₂ O	228,4	11,48

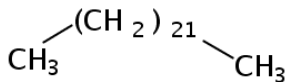
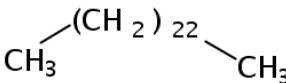
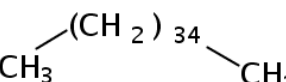
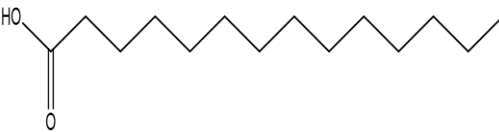
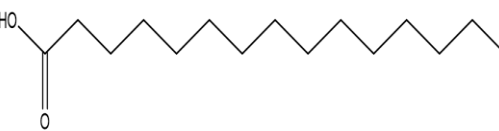
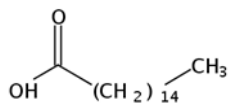
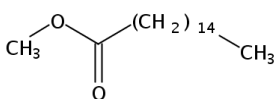
El mayor rendimiento se obtuvo para el extracto acuoso (11,48%), lo que indica una mayor cantidad de compuestos polares; se observa valores similares entre el E. DCM/MeOH y E. MeOH. Hay muy poca cantidad de compuestos apolares.

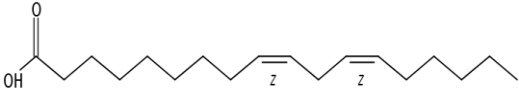
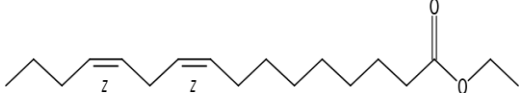
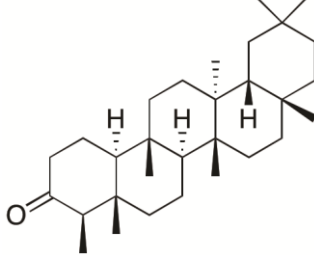
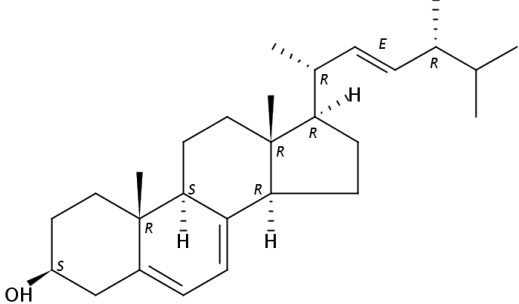
4.4.2 Identificación de compuestos en extractos secuenciales de *P. radicata*.

Los procedimientos descritos en la metodología permitieron la identificación de los compuestos descritos en la **Tabla 16**.

En las extracciones consecutivas desde E. Hexano hasta E. DCM/MeOH se identificaron mediante sus espectros ¹H-RMN y por CG-MS once compuestos: tres hidrocarburos, cuatro ácidos grasos y dos derivados de estos (palmitato de metilo y linoleato de metilo), un triterpeno (friedelina) y un estero (ergosterol).

Tabla 16: Listado de compuestos identificados en los extractos secuenciales de *Pseudofistulina radicata*.

Número	Nombre común	Estructura	Propiedades/Usos	Extracto en el que aparece
1	Tricosano		Podría ser responsable del aroma floral de <i>Posoqueria latifolia</i> (Ariza et al., 2007)	E. DCM/MeOH
2	Tetracosano		Clasificador quimiotaxonómico de <i>Smallanthus pyramidalis</i> (Triana) H. Rob. (Guzmán & Barrera, 2011).	E. DCM/MeOH
3	Hexatriacontano		Compuesto utilizado para verificar los mecanismos de limpieza con plasma (Mafra, 2008).	E. DCM/MeOH
4	Ácido mirístico		Al mezclarse con ésteres de alcohol de isopropilo forma un vehículo resistente a la oxidación y la hidrólisis; usado en preparaciones tópicas cosméticas (Acofarma, 2013).	E. Hexano
5	Ácido pentadecanoico		Usado como biomarcador en suero humano para determinar valores de energía consumidos en la dieta (Lampe et al., 2016).	E. Hexano
6	Ácido palmítico		Recubrimientos para evitar el desarrollo de microorganismos, prolongar la vida de almacenaje de los productos agrícolas y mantener las propiedades sensoriales de éstos (Lorena et al., 2010).	E. Hexano, E. DCM y E. DCM/MeOH
7	Palmitato de metilo		Componente del biodiesel (Zapata, et al, 2007).	E. DCM/MeOH

8	Ácido linoleico		<p>Actividades asociadas a la salud: anticancerígenas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antiobesidad y antiaterogénicas (B. Yang et al., 2015).</p>	<p>E. Hexano, E. DCM y E. DCM/MeOH</p>
9	Linoleato de metilo		<p>Componente del biodiesel (Zapata et al., 2007).</p>	<p>E. Hexano y E. DCM/MeOH</p>
10	Friedelina		<p>Inhibe el crecimiento celular de la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) (Subash-Babu, Li, & Alshatwi, 2017). Presenta actividad antiinflamatoria (Vijaykumar, Santosh, & Jyotiram, 2016).</p>	<p>E. DCM y E. DCM/MeOH</p>
11	Ergosterol		<p>Efecto antitumoral y antiproliferativo; disminuye el colesterol LDL en consecuencia reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares; potencial efecto contra esteatosis hepática, reduce inflamación; como precursor de la vitamina D2, puede mejorar el metabolismo de los huesos e inmunidad; inhibe la diferenciación de osteoclastos contribuyendo a reducir las lesiones de huesos (Corrêa et al., 2017).</p>	<p>E. Hexano</p>

Los ésteres metílicos; palmitato de metilo y linoleato de metilo podrían haberse formado como artefactos del proceso de extracción al usar metanol, por lo que no puede asegurarse la presencia real de estos ésteres en el producto natural. Para confirmarlo se podría hacer una extracción que sustituyera el metanol por etanol.

4.4.3 Bioactividad: Actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de los extractos secuenciales de *Pseudofistulina radicata*.

Los resultados de la actividad antioxidante, de la actividad antitumoral, de citotoxicidad en células no tumorales y actividad antiinflamatoria; de los extractos secuenciales de *P. radicata* se muestran en la **Tabla 17**.

En la actividad antioxidante se observa que el E. DCM muestra el valor más bajo de EC₅₀ para el ensayo de poder reductor e inhibición de TBARS, que podría estar asociadas a moléculas como ácido linoleico y el terpeno friedelina; y para la inhibición de la decoloración de β-caroteno fue el E. MeOH. En la actividad captadora DPPH ningún extracto muestra actividad.

Tanto en la actividad antitumoral y como en la antiinflamatoria, el extracto de hexano es el que posee el EC₅₀ más bajo para todas las líneas tumorales estudiadas y para RAW264.7; en dicho extracto se identificó el ergosterol y el ácido linoleico, moléculas reportadas en la bibliografía con efecto antitumoral y antiinflamatorio (Corrêa et al., 2017; B. Yang et al., 2015). Este extracto también presentó la mayor hepatotoxicidad, con el fraccionamiento de este podría identificarse alguna molécula responsable de la toxicidad.

Subash-Babu *et al* (2017) reporta inhibición efectiva del crecimiento celular de la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) para friedelina aislada, a diferencia de nuestro resultado en el que friedelina se encuentra en el E.DCM junto con otros componentes; Vijaykumar *et al* (2016) reporta actividad antiinflamatoria para la porción acuosa de un extracto alcohólico de hojas de *Nyctanthes arbor-tristis* Linn que contiene friedelina; podemos afirmar que la presencia de otros metabolitos en las matrices influyen, positiva o negativamente; en los resultados de los ensayos.

Tabla 17: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos secuenciales de *Pseudofistulina radicata*.

	E. Hexano	E. DCM	E. DCM/MeOH	E. MeOH	E. H₂O
Actividad antioxidante (EC₅₀ mg/mL)					
Actividad captadora DPPH	>1	>1	>1	>1	>1
Poder reductor	1,66 ± 0,01 ^d	1,43 ± 0,01 ^e	1,88 ± 0,004 ^b	1,96 ± 0,02 ^a	1,79 ± 0,02 ^c
Inhibición decoloración β-caroteno	2,16 ± 0,01 ^b	2,50 ± 0,08 ^a	2,5 ± 0,2 ^a	1,93 ± 0,03 ^c	2,21 ± 0,07 ^b
Inhibición TBARS	>1	0,62 ± 0,02	>1	>1	>1
Actividad antitumoral (GI₅₀ µg/mL)					
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	34,6 ± 0,1 ^d	>400	308 ± 24 ^a	160 ± 5 ^c	199 ± 23 ^b
NCI-H460 (cáncer de pulmón)	40 ± 2 ^b	>400	>400	297 ± 18 ^a	300 ± 20 ^a
HeLa (carcinoma cervical)	23 ± 1 ^d	>400	66 ± 4 ^c	181 ± 5 ^a	165 ± 3 ^b
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	45 ± 2 ^d	>400	170 ± 14 ^b	140 ± 3 ^c	179 ± 6 ^a
Hepatotoxicidad (GI₅₀ µg/mL)					
PLP2 (células hepáticas de cerdo)	120 ± 7 ^c	>400	358 ± 9 ^a	338 ± 11 ^b	>400
Actividad antiinflamatoria (EC₅₀ µg/mL)					
RAW264.7	70 ± 6 ^d	>400	225 ± 13 ^b	239 ± 11 ^a	260 ± 20 ^c

Valores de EC₅₀ (Media ± SD): Concentración de muestras correspondientes al 50% de actividad antioxidante o 0.5 de absorbancia en el ensayo de poder reductor. Valores EC₅₀ para Trolox (control positivo): 41 µg/mL (poder reductor), 42 µg/mL (actividad captadora DPPH), 18 µg/mL (inhibición de descoloración β-caroteno) y 23 µg/mL (inhibición TBARS). Valores de GI₅₀ (Media ± SD) corresponden a la concentración de muestra responsable por 50% de la inhibición del crecimiento en las líneas de células tumorales humanas o en un cultivo primario de células de hígado-PLP2. Valores de GI₅₀ para elipticina (control positivo): 1,0 µg/mL (MCF-7), 1,0 µg/mL (NCI-H460), 2,0 µg/mL (HeLa), 1,0 µg/mL (HepG2) y 3 µg/mL (PLP2). Valores de EC₅₀ (Media ± SD): Concentración de muestra correspondiente a 50% inhibición de la producción de NO en comparación con el control negativo (100% de la producción de NO). Valores de EC₅₀ para dexametasona: 16 µg/mL. En cada línea, letras diferentes corresponden a valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). * Valores estadísticamente diferentes, test T de Student $p < 0,001$.

5 Conclusiones y perspectivas futuras

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización química y nutricional (valor nutricional/valor energético, composición de compuestos fenólicos, glúcidos libres, ácidos orgánicos, ácidos grasos y tocoferoles) de dos productos alimentarios consumidos en El Salvador, la planta *Crotalaria longirostrata* y el hongo *Pseudofistulina radicata*, así como la determinación de la actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria de sus extractos hidrometanólico y decocción acuosa. También se realizaron estos últimos ensayos de bioactividad y se inició la caracterización química de extractos de polaridad creciente obtenidos de ambas especies.

C. longirostrata puede ser catalogado como un alimento funcional; ya que se ha demostrado que no solo es nutritivo; al tener un gran aporte de proteínas y fibra dietética y un bajo aporte calórico y de grasas; características ideales para una dieta baja en calorías, sino que también presenta moléculas bioactivas que generan beneficios a la salud, como el ácido α -linolénico, vitamina E, ácido cutárico y ácido quínico y, se determinó la actividad antioxidante y ausencia de citotoxicidad en la forma de consumo local (decocción).

De igual manera podemos concluir que el hongo *P. radicata* presenta similar valor nutricional con *A.bisporus*; uno de los hongos más consumidos y cultivados a nivel mundial. Y la decocción presenta buena actividad antioxidante y antiinflamatoria.

El perfil fenólico del extracto hidrometanólico y la decocción de *C. longirostrata* muestra en su mayoría derivados glicosilados de la apigenina (flavonoides), y el ácido cutárico que es un éster del ácido cumárico y del ácido tartárico. En *P. radicata* solamente se identificó el ácido cinámico.

El perfil de ácidos grasos de *C. longirostrata* mostró una relación de ácidos grasos totales: PUFA (72,59 %) > SFA > MUFA; siendo el mayoritario el ácido α -linolénico; un ácido graso esencial Omega-3, beneficioso para la salud. El perfil de ácidos grasos de *P. radicata* mostró una relación de ácidos grasos totales: SFA (70,9%) > PUFA > MUFA, el ácido palmítico es el mayoritario.

En la evaluación de la actividad antioxidante para *C. longirostrata* la decocción presentó los valores más bajos de EC₅₀ en la actividad captadora DPPH y en la inhibición TBARS; y en el extracto hidrometanólico el ensayo de poder reductor y la inhibición de β-caroteno respectivamente, esto puede explicarse por su perfil fenólico; donde los compuestos mayoritarios detectados son flavonoides. Para la actividad antioxidante la decocción de *P. radicata* muestra los EC₅₀ más bajos a excepción del ensayo de inhibición TBARS; mostrando una efectiva capacidad antioxidante. Las diferencias entre ensayos de actividad antioxidante pueden explicarse porque existen diferentes compuestos en ambos métodos extractivos (extracto hidrometanólico y decocción) con capacidades distintas y específicas para participar en los mecanismos involucrados en los ensayos realizados.

Tanto el extracto hidrometanólico como la decocción de *C. longirostrata* no presentaron actividades antitumorales o antiinflamatorias, mientras que para *P. radicata* podemos afirmar en general que el extracto hidrometanólico posee mejor actividad antitumoral que la decocción. En el ensayo de actividad antiinflamatoria no hay diferencia estadísticamente significativa entre los EC₅₀ del extracto hidrometanólico y la decocción; por lo que ambos poseen la misma actividad antiinflamatoria.

Los extractos secuenciales de *C. longirostrata* y *P. radicata* se obtuvieron por maceración del material seco y pulverizado siguiendo la secuencia hexano, DCM, DCM/MeOH (1:1), MeOH y H₂O, a temperatura ambiente y con agitación constante. Siendo los extractos de mayor rendimiento para *C. longirostrata* el E. DCM/MeOH (15,87%) y para *P. radicata* el E. H₂O (11,48%).

En los extractos más apolares, obtenidos por maceración de *C. longirostrata* (E. Hexano y E. DCM) se identificaron dos ácidos grasos (palmítico y linolénico), tres diterpenos lineales (fitol, escualeno y neofitadieno) y un compuesto derivado de la degradación de terpenos (dihidroactinidiolida) mediante sus espectros de ¹H-RMN y mediante CG-MS.

Al evaluar la actividad antioxidante de los extractos secuenciales, los valores más bajos de EC₅₀ para los ensayos de poder reductor e inhibición de decoloración de β-caroteno los presentó el E. DCM, que contiene la molécula identificada como neofitadieno; en la

actividad captadora de radicales libres DPPH solo el E. MeOH presentó actividad y en el ensayo de inhibición TBARS el E. H₂O presentó mejor desempeño.

Los resultados del extracto hidrometanólico y la decocción no presentaron actividad antitumoral ni antiinflamatoria; sin embargo los extractos secuenciales sí mostraron bioactividad, el extracto que mostró mejor desempeño fue el de DCM; esto demuestra que en este extracto apolar se extraen compuestos que no se extraen en la decocción o en el extracto hidrometanólico. De igual manera en la actividad antiinflamatoria el E. DCM es el que presenta el menor EC₅₀. Sin embargo, este extracto presenta valores de hepatotoxicidad cercanos a los de actividad antitumoral y antiinflamatoria, lo que nos lleva a concluir que no es un extracto seguro, por lo que podría realizarse un fraccionamiento de este extracto e intentar aislar el/los posibles principios activos y determinar a qué fracción está o no ligada la hepatotoxicidad.

En las extracciones consecutivas de *P. radicata* desde E. Hexano hasta E. DCM/MeOH se identificaron mediante sus espectros ¹H-RMN y por CG-MS once compuestos: tres hidrocarburos, cuatro ácidos grasos y dos derivados de éstos (palmitato de metilo y linoleato de metilo), un triterpeno (friedelina) y un estero (ergosterol).

Al evaluar la actividad antioxidante de los extractos secuenciales se observó que el E. DCM muestra el valor más bajo de EC₅₀ para el ensayo de poder reductor e inhibición de TBARS, que podría estar asociadas a moléculas como ácido linoleico y el triterpeno friedelina; y para la inhibición de la decoloración de β-caroteno fue el E. MeOH. En la actividad captadora DPPH ningún extracto muestra actividad.

Tanto la actividad antitumoral y antiinflamatoria el extracto de hexano es el que posee el EC₅₀ más bajo para todas las líneas tumorales estudiadas y para RAW264.7; en dicho extracto se identificó el ergosterol y el ácido linoleico. Este extracto también presentó la mayor hepatotoxicidad, con el fraccionamiento de este podría identificarse alguna molécula responsable de la toxicidad.

Es el primer trabajo en el que se evalúan para ambas matrices su perfil de compuestos fenólicos, glúcidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos y tocoferoles; así como sus bioactividades e identificación de moléculas. Se realiza un gran aporte al identificar y

cuantificar los compuestos mostrados a lo largo de este trabajo para su inclusión en bases de datos.

Se demostró el gran aporte nutricional, las bioactividades enumeradas y los compuestos de interés (nutricional y farmacológico) de ambas matrices naturales, que pueden ampliar su uso a nivel medicinal (tradicional y farmacéutico) y en la alimentación como ingredientes funcionales con beneficios para la salud en la prevención de enfermedades. A su vez es importante enseñar a los salvadoreños las formas adecuadas de consumo de estas matrices para aprovechar al máximo sus beneficios, ya que no toda la población tiene recursos para acceder a otros alimentos reconocidos como funcionales.

Como perspectivas futuras sería interesante continuar el estudio de los extractos secuenciales más polares en la búsqueda e identificación de otros metabolitos; así como el fraccionamiento y aislamiento de los compuestos responsables de la citotoxicidad del E. DCM activo en *C. longirostrata* y el E. Hexano activo para *P. radicata*.

Referencias

- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2- carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 5800–5806. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.029>
- Acofarma. (2013). Fichas De Información Técnica Miristato de Isopropilo. *Acofarma. S.A.* Retrieved from http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4167-ab8da0f0e3915d95870268660f970c3b869987a5/main/files/Benzo__lo_per__xido.pdf
- Aguilar, Y. M., Yero, O. M., López, J. C., Navarro, M. V., & Espinosa, M. E. (2011). Fitoesteroles y escualeno como hipocolesterolémicos en cinco variedades de semillas de Cucurbita maxima y Cucurbita moschata (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 72–81.
- Aida, F. M. N. A., Shuhaimi, M., Yazid, M., & Maaruf, A. G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(11–12), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.007>
- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analysis Chemists International* (20th ed.).
- Ariza, O., Rueda, E., Archila, J., Martínez, J., & Stashenko, E. E. (2007). Determinación mediante HS-SPME/GC-MS, de la composición química de la fragancia y el absoluto de las flores de Posoqueria latifolia. *Scientia et Technica*, XIII, 59–61.
- Atlas geográfico universal y de El Salvador*. (1995). San Salvador: Océano.
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Ayala, J. C. G. (2002). *Botánica Medicinal Popular. Etnobotánica Medicinal de El*

Salvador. (W. G. Berendsohn, Ed.) (2da Edició). Antiguo Cuscatlán: Jardín Botánico La Laguna.

Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), 309–316.

<https://doi.org/10.1007/s12161-012-9443-1>

Barros, L., Pereira, E., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>

Borchers, A. T., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2004). Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 229(5), 393–406. <https://doi.org/10.1258/ebm.2009.009e01>

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales* (2 da). Zaragoza: Editorial Acribia.

C.F.R. Ferreira, I., A. Vaz, J., Vasconcelos, M. H., & Martins, A. (2010). Compounds from Wild Mushrooms with Antitumor Potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(5), 424–436. <https://doi.org/10.2174/1871520611009050424>

Cáceres, L. A., McGarvey, B. D., Briens, C., Berruti, F., Yeung, K. K. C., & Scott, I. M. (2015). Insecticidal properties of pyrolysis bio-oil from greenhouse tomato residue biomass. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 112, 333–340.

<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.01.003>

Calixto, J. B., Campos, M. M., Otuki, M. F., & Santos, A. R. S. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, 70(2), 93–103.

<https://doi.org/10.1055/s-2004-815483>

Canales, N., Montenegro, I., P??rraga, M., Olgu??n, Y., Godoy, P., Werner, E., & Madrid,

- A. (2016). In Vitro Antimicrobial Activity of *Embothrium coccineum* Used as Traditional Medicine in Patagonia against Multiresistant Bacteria. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(11), 1–8. <https://doi.org/10.3390/molecules2111144>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013a). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013b). The role of phenolic compounds in the fight against cancer--a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236–58. <https://doi.org/10.2174/18715206113139990301>
- Carretero, M. E., López-Pérez, J. L., Abad, M. J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., & Noguera-P, B. (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.034>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Castillo, B. E., & Parada, R. Y. (2013). Hongos de El Salvador. 2009-2013. Retrieved from http://centa.gob.sv/upload/TECNOLOGIAS_CENTA/04- Hongos de El Salvador 2009-2013.pdf
- Chang, S. T., & Buswell, J. a. (1996). Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12(5), 473–6. <https://doi.org/10.1007/BF00419460>
- Chízar Fernández, C. (2009). *Plantas Comestibles de Centroamérica*.
- Cho, J. Y., Baik, K. U., Yoo, E. S., Yoshikawa, K., & Park, M. H. (2000). In vitro antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Coptis japonica*. *Journal of Natural Products*, 63(9), 1205–1209. <https://doi.org/10.1021/np9902791>

- Cho, J. Y., Paper, O., Kim, A. R., & Park, M. H. (2000). *Coptis japonica*. *Planta Med*, 67(4), 312–316.
- Choe, E., & Min, D. B. (2005). Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Food. *Journal of Food Science*, 70(9), 142–159.
<https://doi.org/10.1080/10408390500455474>
- Corrêa, R. C. G., Peralta, R. M., Bracht, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). The emerging use of mycosterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 19–35.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.012>
- Crozier, A., Clifford, M., & Ashihara, H. (Eds.). (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (1^o). Blackwell Publishing Ltd.
- Cunha, A. P. da. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. (F. C. Gulbenkian, Ed.). Lisboa.
- Danz, H., Baumann, D., & Hamburger, M. (2002). Quantitative determination of the dual COX-2/5-LOX inhibitor tryptanthrin in *Isatis tinctoria* by ESI-LC-MS. *Planta Medica*, 68(2), 152–157. <https://doi.org/10.1055/s-2002-20252>
- Danz, H., Stoyanova, S., Thomet, O. A. R., Simon, H. U., Dannhardt, G., Ulbrich, H., & Hamburger, M. (2002). Inhibitory activity of tryptanthrin on prostaglandin and leukotriene synthesis. *Planta Medica*, 68(10), 875–880. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34922>
- Danz, H., Stoyanova, S., Wippich, P., Brattström, A., & Hamburger, M. (2001). Identification and isolation of the cyclooxygenase-2 inhibitory principle in *Isatis tinctoria*. *Planta Medica*, 67(5), 411–416. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15805>
- Darmanyan, A. P., Gregory, D. D., Guo, Y., Jenks, W. S., Burel, L., Eloy, D., & Jardon, P. (1998). Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: Evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 120(2), 396–403. <https://doi.org/10.1021/ja9730831>
- Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. (2000).

- Washington, D.C.: National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9810>
- Drago Serrano, M. E., López López, M., & Saínz Espuñes, T. del R. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4).
- Encyclopedia of Life. (2016). Retrieved from <http://eol.org/pages/640350/names>
- Esquivel, A., Zamora, A., & Narvaez, R. (2009). *El costo del hambre. Impacto social y económico de la desnutrición infantil*. Santiago de Chile.
- Europeo, P. Reglamento 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, 2011 Diario Oficial de la Unión Europea § (2011).
- FAO. (2008). *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. Estudio FAO alimentación y nutrición*. <https://doi.org/978-92-5-3067336>
- FAO. (2017). Biodiversidad, 1–5. Retrieved from <http://www.fao.org/biodiversity/es/>
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Abreu, R. M. V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543–1560. <https://doi.org/10.2174/092986709787909587>
- Flores, A., & Guardado, J. (2010). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010: EL Salvador*.
- Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S., & Mahmoudi, M. (2015). Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environmental Health Engineering And Management Journal*, 2(1), 13–16. Retrieved from http://chemj.com/browse.php?a_id=48&sid=1&slc_lang=en
- Giang, P. M., Jin, H. Z., Son, P. T., Lee, J. H., Hong, Y. S., & Lee, J. J. (2003). ent-Kaurane diterpenoids from croton tonkinensis inhibit LPS-induced NF-kappaB activation and NO production. *Journal of Natural Products*, 66(9), 1217–20. <https://doi.org/10.1021/np030139y>
- Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs, 767–776.

<https://doi.org/10.1007/s12094-007-0138-9>

- Gordo, M. M. (2015). *Aspectos químicos y bioactivos de tres matrices naturales : Calendula officinalis L., Mentha cervina L. y Macrolepiota procera (Scop .) Singer.* Instituto Politécnico de Bragança y Universidad de Salamanca.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2013). Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*, 136(2), 718–725. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.025>
- Guzmán, A., & Barrera, D. (2011). Estudio fotoquímico de hojas y flores de *Smallanthus pyramidalis* y su uso en la recuperación de los humedales de Bogota. *Colombia Forestal*, 14(1), 41–50.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research*, 9(I), 1–32. <https://doi.org/10.3109/10715769009148569>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Huang, D. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 4437–4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Hung, T. M., Na, M., Thuong, P. T., Su, N. D., Sok, D., Song, K. S., ... Bae, K. (2006). Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.029>
- Index Fungorum. (2016). Retrieved from <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (2011). Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin*, 49(2), 1,33-64. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>. Available

- Jiménez-Aguilar, D. M., & Grusak, M. A. (2015). Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 357–364. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0512-7>
- John Bailey, Esq., R. M. (1850). *Central America; Describing Each of the States of Guatemala, Honduras, Salvador, Nicaragua, and Costa Rica*. Trelawney Saunders. Retrieved from <https://www.wdl.org/es/item/7306/view/1/101/>
- Kancheva, V. D. (2009). Phenolic antioxidants - Radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(11), 1072–1089. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900005>
- Kelloff, G. J., & Sigman, C. C. (2005). Intervention and Chemoprevention of Cancer. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/0470025077.chap32>
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., & Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749–1770. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.037>
- Kiliç, I., & Yeşiloğlu, Y. (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.110>
- Lampe, J. W., Huang, Y., Neuhouser, M. L., Tinker, L. F., Song, X., Schoeller, D. A., ... Prentice, R. L. (2016). Dietary biomarker evaluation in a controlled feeding study in women from the Women's Health Initiative cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/105/2/466.short>
- Lawrence, T. (2007). Inflammation and cancer: a failure of resolution? *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(4), 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.003>
- Lorena, M. De, Ramos-garcía, M. D. L., Bautista-baños, S., Barrera-, L. L., Desarrollo, C.

- De, Bióticos, D. P., ... Agropecuarias, F. D. C. (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 44–57.
- Lü, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840–860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>
- Mafra, M. (2008). *Estudo dos Mecanismos de Limpeza por Plasma: Interação Pós-Descarga Ar-O2 e Hexatriacontano*. Universidade Federal de Santa Catarina. Retrieved from http://www.tede.ufsc.br/tesesimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=624
- Mantovani, A., & Pierotti, M. A. (2008). Cancer and inflammation: A complex relationship. *Cancer Letters*, 267(2), 180–181. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.003>
- Manzi, P., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73(3), 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00304-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00304-6)
- Martínez-Valverde, I., Peragio, M., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*.
- McCloud, T. G. (2010). High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. *Molecules*, 15(7), 4526–4563. <https://doi.org/10.3390/molecules15074526>
- Menchú, M., & Méndez, H. (2007). *Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. Tabla de composición*
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. <https://doi.org/10.1201/9780203492086>
- Missouri Botanical Garden. (2016). Tropicos. Retrieved from

<http://www.tropicos.org/Name/13029284>

- Monjarás-Barrera, J. I., Morales-Reyes, C., & Smith, D. R. (2015). A New Species of *Sphacophilus* (Hymenoptera: Argidae) from Mexico Feeding on Chipilin, *Crotalaria longirostrata* (Fabaceae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 117(2), 179–182. <https://doi.org/10.4289/0013-8797.117.2.179>
- Moradali, M., Mostafavi, H., Ghods, S., & Hedjaroude, G. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi), 7, 701–724. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.01.008>
- Morton, J. F. (1994). and Chipilin Two Soporific Vegetables of Central America, 6(October 1992), 130–138.
- Nagasawa, E., Maekawa, N., Sotome, K., Shorouzu, T., & Ushijima, S. (2013). *Hongos de El Salvador*. (N. Maekawa, T. Shirouzu, R. Y. Parada Jaco, B. E. Castillo Aguilar, & A. Nakagiri, Eds.) (Tottori Un). CENTA.
- Nelson, D., & Cox, M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). New York: W.H. Freeman.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. (2014). Necesidades Nutricionales. *FAO*, 30–64. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s03.pdf>
- Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W. D., & Riganakos, K. A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 115(4), 1575–1580. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.014>
- Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. *Food & Function*, 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/c5fo00465a>
- Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Use of UFLC-PDA

- for the Analysis of Organic Acids in Thirty-Five Species of Food and Medicinal Plants. *Food Analytical Methods*, 6(5), 1337–1344. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9548-6>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pinela, J., Barros, L., Maria, A., Santos-buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Antioxidant activity , ascorbic acid , phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples : Effects of drying and oral preparation methods, 135, 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.038>
- Pinela, J., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). CHAPTER 3 Bioactive Compounds of Tomatoes as Health Promoters. In *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters* (Vol. 2, pp. 48–91). <https://doi.org/10.2174/9781681082431116010006>
- Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better - and safer - Than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629–642. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064>
- Prosky, L., & Hoebregs, H. (1999). Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose 1. *J. Nutr*, 129, 1418–1423.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., & Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6(3), 75–82. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88967-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88967-0)
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.056>
- Ribeiro, B., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2007). Phenolic

- compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1805–1813.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.015>
- Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, Å., Flock, S., Skattebøl, L., Perera, P., & Bohlin, L. (2001). COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *Journal of Natural Products*, 64(6), 745–749. <https://doi.org/10.1021/np000620d>
- Robles, G. R., Oliveira, K., & Villalobos, R. (2000). Evaluacion de los Recursos Forestales Mundiales 2000: evaluacion de los productos forestales no madereros en America Central.
- Royal Botanic Gardens, K. and M. B. G. (2016). The Plant List. Retrieved from <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-20188>
- Selvam, C., Jachak, S. M., Oli, R. G., Thilagavathi, R., Chakraborti, A. K., & Bhutani, K. K. (2004). A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from *Indigofera aspalathoides*: Structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking. *Tetrahedron Letters*, 45(22), 4311–4314. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.04.010>
- Seong, S. H., Lee, S. A., Xiang, H. H., Hui, Z. J., Jeong, H. L., Lee, D., ... Bang, Y. H. (2007). Kaurane diterpenoids from *Isodon excisus* inhibit LPS-induced NF- κ B activation and NO production in macrophage RAW264.7 cells. *Journal of Natural Products*, 70(4), 632–636. <https://doi.org/10.1021/np060638+>
- Serrano, M. E. D., López, M. L., & Espuñes, T. D. R. S. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 37(4), 58–68.
- Smith, R. J. (2005). Therapies for rheumatoid arthritis: Hope springs eternal. *Drug Discovery Today*, 10(23–24), 1598–1606. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03636-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03636-6)
- Sommerkamp, Y. (1990). *Hongos Comestibles en los Mercados de Guatemala*.

Universidad San Carlos de Guatemala.

- Standley, P. C., & Steyermark, J. A. (1946). Flora of Guatemala : families Leguminosae, Geraniaceae, Oxalidaceae, Tropaeolaceae, Linaceae, Erythroxylaceae, Zygophyllaceae, Rutaceae, Simaroubaceae, Burseraceae, Meliaceae, and Malpighiaceae. *Fieldiana: Botany*, 24, 1–502. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.2435>
- STPP, & MINEC-DIGESTYC. (2015). *Medición muntidimensional de la pobreza en El Salvador*. San Salvador.
- Subash-Babu, P., Li, D. K., & Alshatwi, A. A. (2017). In vitro cytotoxic potential of friedelin in human MCF-7 breast cancer cell: Regulate early expression of Cdkn2a and pRb1, neutralize mdm2-p53 amalgamation and functional stabilization of p53. *Experimental and Toxicologic Pathology*, (April), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.05.011>
- Tantengco, O. A. G., & Jacinto, S. D. (2015). Cytotoxic activity of crude extracts and fractions from *Premna odorata* (Blanco), *Artocarpus camansi* (Blanco) and *Gliricidia sepium* (Jacq.) against selected human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1037–1041. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.011>
- Taofiq, O., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.005>
- Toledo, C. V, Barroetaveñ, C., Fernandes, Â., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical and antioxidant properties of wild edible mushrooms from native *nothofagus* spp. forest, Argentina. *Molecules*, 21(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules21091201>
- Tostes, R. M. (2001). Natural products in anticancer therapy Adriana B da Rocha , Rafael M Lopes and Gilberto Schwartzmann *, 364–369.
- Trueba, G. P. (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 22(1), 48–57.

- Valenzuela B, R., Barrera R, C., Gonzalez-Astorga, M., Sanhueza C, J., Valenzuela B, A., Tapia O, G., ... Valenzuela B, R. (2014). Alpha linolenic acid (ALA) from Rosa canina, sacha inchi and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n-3 LCPUFA in diverse tissues of the rat. *Revista Chilena de Nutrición*, 5(3), 356–367. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000200012>
- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Morais, J. S., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 343–346. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.029>
- Vijaykumar, B., Santosh, J., & Jyotiram, S. (2016). REVIEW ON: INDIAN MEDICINAL PLANTS HAVING ANTI-ARTHRITIC PROPERTY. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 6(4).
- Villalta, I., & Benítez, T. (n.d.). Estudio de plantas alimenticias, consumidas por la población de la zona Central y Occidental de El Salvador. Fase II. *Masferrer Investiga*.
- Villalta, I., & Benítez, T. (2014). Estudio de Plantas Alimenticias, consumidas por la población del área Metropolitana de San Salvador- AMSS- y municipios aledaños. *Masferrer Investiga*, 22, 4,23.
- Wang, J., Hu, X., Ai, W., Zhang, F., Yang, K., Wang, L., ... Wang, S. (2017). Phytol increases adipocyte number and glucose tolerance through activation of PI3K/Akt signaling pathway in mice fed high-fat and high-fructose diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 489(4), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.160>
- Woolf, A. D., & Pfleger, B. (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(9), 646–656. <https://doi.org/S0042-96862003000900007> [pii]
- Yang, B., Chen, H., Stanton, C., Ross, R. P., Zhang, H., Chen, Y. Q., & Chen, W. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15, 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.050>

Yang, Y., Hou, L., El Ouaamari, A., & Xin, L. (2015). Anti-inflammatory natural products. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/608613>

Zapata, C., Martínez, I., Castiblanco, E., & Uribe, C. (2007). Producción De Biodiesel a Partir De Aceite Crudo De Palma: 1. Diseño Y Simulación De Dos Procesos Continuos Biodiesel Production From Crude Palm Oil: 1. Design and Simulation of Two Continuous Processes, *151*(November 2016), 71–82.