



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA**  
**Y TECNOLOGÍA AVANZADA**



**ÁREA DE BIOMATERIALES**

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
TOXICOLÓGICA DE DIFERENTES EXTRACTOS  
DE PLANTAS MEDICINALES”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN**  
**TECNOLOGÍA AVANZADA**

**PRESENTA:**  
**MTRA. ELBA RONQUILLO DE JESÚS**

**Director: Dr. Eduardo San Martín Martínez.**

**México D. F. a 09 de diciembre 2013**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10 horas del día 9 del mes de Diciembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA Unidad Legaria para examinar la tesis titulada:

Estudio de la actividad antioxidante y toxicológica de diferentes extractos de plantas medicinales

Presentada por el alumno:

Ronquillo  
Apellido paterno

de Jesús  
Apellido materno

Elba  
Nombre(s)

Con registro: 

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

Doctorado en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

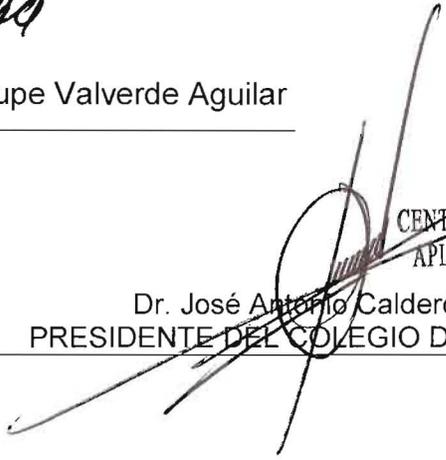
  
Dr. Eduardo San Martín Martínez

  
Dra. Javiera Cervini Silva

  
Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez

  
Dr. Fernando Trejo Zarraga

  
Dr. María Guadalupe Valverde Aguilar

  
Dr. José Antonio Calderón Arenas  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA  
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
DEL I.P.N.





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F. el día 9 del mes de Diciembre del año 2013, el (la) que suscribe Elba Ronquillo de Jesús alumno(a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada, con número de registro A100333, adscrito(a) al CICATA IPN Unidad Legaria, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dr. Eduardo San Martín Martínez y Dra. Javiera Cervini Silva**, y cede los derechos del trabajo titulado: **Estudio de la actividad antioxidante y toxicológica de diferentes extractos de plantas medicinales**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Legaria 649, Colonia Irrigación, México D.F. C.P. 11500. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Elba Ronquillo de Jesús  
Nombre y firma del alumno(a)

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Pruebas Biológicas, del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, unidad Cicata-Legaria.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con la beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y con la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del I.P.N.

## **Agradecimientos y Dedicatorias**

- ♣ A mi madre, por su ejemplo de vida, por creer en mí.
- ♣ A mis hermanos Ana, Rodrigo, Cesar, Miguel y Silbano, por tu amor incondicional, y por confiar en mi.
- ♣ A mi esposo, por su paciencia en este proceso de vida, por acompañarme a cumplir mis mentas.
- ♣ A mi hijo por que es la personita más valiosa que tengo en el mundo, por esa sonrisa que me brinda todos los días y me motiva a ser una mejor persona.
- ♣ A Leticia Cardona, Laura Vega Pablo Méndez, por su amistad, y ayuda.
- ♣ A mis compañeras y amigas: Carmen, Marlene, Nathaly y Elizabeth.
- ♣ A mis compañeros del Laboratorio: Horacio, Matilde, Martín y Martha Campos
- ♣ Especialmente, a mi amigo Miguel Aguilar, por su amistad incondicional, por guía y consejos y sobre todo por su infinita ayuda
- ♣ A mi director de tesis, Dr. Eduardo San Martín por permitirme formar parte de su equipo.
- ♣ De manera muy especial quisiera agradecer al M en C. Antonio Nieto Camacho, quien dedicó su tiempo para ayudarme en la primera parte del proyecto, laboratorio de análisis bioquímico del Instituto de Química.
- ♣ Al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por proporcionarnos los ratones utilizados en este proyecto
- ♣ Al M. en C. Rafael Torres Colin del Herbario Nacional de México del Departamento de Botánica, del Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México, por su ayuda en la determinación taxonómica, de tres ejemplares
- ♣ A la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal, por su tiempo, orientación y paciencia, sobre todo por su valiosa ayuda en la última parte de este proyecto, del Departamento de Investigación en Microbiología Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

- ♣ Al Banco de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza, por proporcionarnos los paquetes Leucocitos, necesarios en esta tesis.

## Índice General

| <b>Índice</b>         | <b>Página</b> |
|-----------------------|---------------|
| Resumen               | 1             |
| Introducción          | 4             |
| Antecedentes          | 7             |
| Justificación         | 12            |
| Hipótesis             | .....13       |
| Objetivos Generales   | .....14       |
| Objetivos Específicos | .....15       |
| Parte experimental    | .....16       |
| Resultados            | .....33       |
| Conclusiones          | .....51       |
| Referencias           | .....52       |
| Anexos                | ..... 55      |

## Tablas y Figuras

| Índice de Tablas y Figuras   | Página |
|--|--------|
| <b>TABLAS</b>  |        |
| Table 1. Resultados del contenido de fenoles totales de extractos de <i>Justicia spicigera</i> Schult, <i>Eryngium comosum</i> Delar f., <i>Cuphea aequipetala</i> Cav., <i>Crataegus gracilior</i> Phipps, <i>Amphypteringium adstringens</i> and <i>Hippocratea excels</i> | 33     |
| Tabla 2. Valore de IC50 de extractos etanolicos y acuosos del modelo de DPPH   | 40     |
| Tabla 3. Valore de IC50 de extractos etanolicos y acuosos correspondientes al modelo de TBARS.   | 44     |
| Table 4. Valores de IC50 de extractos de plantas de: <i>Hippocratea excels</i> , <i>Amphypteringium adstringens</i> <i>Justicia spicigera</i> Schult, <i>eryngium comosum</i> Delar f.) y <i>Eryngium comosum</i> Delar f  | 46     |
|  | 4      |
|  | 20     |
|  | 30     |

|   |    |
|---|----|
|   | 33 |
| <b>FIGURAS</b>  |    |
| Figura 1. Países considerados como mega—diversos  | 35 |
| Figura 2. Obtención de los extractos  | 36 |
| Figura 3. Representación esquemática de las diferentes actividades metodológicas para la exposición de células mononucleares con diferentes extractos de plantas. | 37 |
|   | 38 |
| Figura 4. Curva de calibración utilizando ácido gálico  |    |
| Figura 5. Curva de calibración utilizando al antioxidante $\alpha$ -tocoferol como estándar de reducción del radical libreDPPH.                                   | 40 |
| Figura 6. Resultados de la actividad atrapadora de radicales libres de los extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y de éter de petróleo                         | 41 |
| Figura 7. Porcentajes de reducción del DPPH con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 100 ppm                |    |
| Figura 8. Porcentajes de reducción del DPPH con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 1000 ppm               | 42 |
|   | 43 |
| Figura 9. Curvas del porcentaje de reducción de los extractos de a) Hierba del cáncer, b) Cuachalalate, c) Tejocote y d) Cancerina.                               | 44 |
| Figura 10. Porcentaje de inhibición del TBARS con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 1 ppm.               | 49 |
| Figura 11. Porcentaje de inhibición del TBARS con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 10 ppm.              |    |
| Figura 12. Porcentaje de inhibición del TBARS con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 100 ppm.             |    |
| Figura 13. Curvas de los extractos etanolicos y acuosos de HC, cuachalalate,  |    |

tejocote y cancerina

Figura14. Efecto inmunomodulador de extractos etanolicos y acuosos sobre células mononucleares.

## SUMMARY

The fast pace of life that we humans are experimenting, mainly in big cities, has resulted in the generation of oxidative stress in the population at a general level, causing the outbreak of various chronic degenerative diseases, among which we can find cancer in general, diabetes, and heart disease, to mention only a few. In this context there is a search for natural source alternatives to counteract the harmful effects that oxidative stress can have on the population. Various vegetable species such as white, green, and red tea, and/or some fruits, as well as some medicinal plants (according to Mexican traditional medicine), have been evaluated regarding their antioxidant properties.

However, the use of traditional medicine employs different metabolites present in plants, which may or may not contain active principles useful for supplementing with natural antioxidants. Hence plants like Muicle (*Justicia spicigera Schult*), toad herb (*Eryngium comosum Delar f.*), cancer herb (*Cuphea aequipetala Cav.*), tejocote (*Crataegus gracilior Phipps*), cuachalalate (*Amphypteringium adstringens*), and cancerina (*Hippocratea excelsa H.B.K.*) have been used in the traditional manner for the treatment of some ailments, considering their possible antioxidant effect. For that reason the objective of this work was to evaluate total phenol content (Folin Ciocalteu). Antioxidant activity was determined by the stable free radical DDPH method and substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), as well as cytotoxicity in saline *Artemia in vivo* and mono-nuclear peripheral blood cells *in vitro*, of thanolic, aqueous, hexanic and petroleum ether extracts of the plants Muicle (*Justicia spicigera Schult*), toad herb (*Eryngium comosum Delar f.*), cancer herb (*Cuphea aequipetala Cav.*), tejocote (*Crataegus gracilior Phipps*), cuachalalate (*Amphypteringium adstringens*), and cancerina (*Hippocratea excelsa H.B.K.*).

In order to determine free radical scavenging activity, preliminary tests were conducted with extract concentrations of 1, 10 and 100 ppm. It was determined that the ethanolic extracts of cancer herb, cuachalalate, tejocote, and cancerina, presented an extraordinary free radical scavenging capacity, with values of (IC<sub>50</sub>, 4.12±0.39, 4.93±0.33, 5.31±0.29 and 8.33±0.24 mg/ml), respectively, surpassing the positive control  $\alpha$ -tocoferol (IC<sub>50</sub>, 13.67±0.45). Regarding the test of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), the concentrations preliminarily tested were 1, 10 and 100 ppm, obtaining the best antioxidant capacity properties from the ethanolic extracts of cancer herb, cuachalalate, tejocote, and cancerina, with values of (IC<sub>50</sub>, 4.63±0.25, 4.98±0.44, 5.12±0.04y 11.15±1.04  $\mu$ g/ml) respectively, with values of IC<sub>50</sub> very similar to the reference control quercetin of (IC<sub>50</sub>, 3.68±0.16 g ml). Susequently tests were performed with saline Artemia to determine the cytotoxicity of the extracts. The results obtained showed that the extracts of petroleum ether, cancerina hexanics, and cuachalalate, followed by cancer herb extract and muicle in water were the only ones than presented cytotoxicity in the larvae. Moreover, while testing ethanolic and water extract cytotoxicity on mono-nuclear peripheral blood cells, we found out that the cancer herb extract in water showed toxicity on the mono-nuclear cells from 0.1-1000 mmp.

## RESUMEN

El ritmo de vida acelerado que venimos experimentando los humanos, principalmente en las grandes ciudades, se ha traducido en la generación de estrés oxidativo a nivel general en la población, provocando el desencadenamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas, entre las que se encuentran el cáncer en general, la diabetes, cardiopatías, solo por mencionar algunas. En este contexto se buscan alternativas de origen natural para contrarrestar los efectos nocivos que puede ocasionar el estrés oxidativo en la población. Diversas especies vegetales como las especias el te blanco, verde y rojo, y/o algunos frutos, y algunas plantas medicinales, según la medicina tradicional mexicana, ha sido evaluadas en cuanto a sus propiedades antioxidante.

Sin embargo, el uso de la medicina tradicional, emplea diferentes metabolitos presentes en plantas, que pueden contener o no principios activos útiles para el la suplementación de antioxidantes naturales. Así se tiene que las plantas como Muicle (*Justicia spicigera Schult*), hierba del sapo (*Eryngium comosum Delar f.*), hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*), tejocote (*Crataegus gracilior Phipps*), cuachalalate (*Amphypteringium adstringens*), y cancerina (*Hippocratea excelsa H.B.K.*), han sido utilizadas de manera tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos, entre ellos se puede considerar su posible efecto antioxidante. Por tal motivo el objetivo del trabajo fue evaluar el contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu), la actividad antioxidante, se determinó por el método del radical libre estable DDPH y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (BARS); así como la citotoxicidad en *Artemia salina in vivo* y células mononucleares de sangre periférica *in vitro*, de extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y en éter de petroleo de las

plantas Muicle (*Justicia spicigera* Schult), hierba del sapo (*Eryngium comosum* Delar f.), hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* Cav.), tejocote (*Crataegus gracilior* Phipps), cuachalalate (*Amphypteringium adstringens*), y cancerina (*Hippocratea excelsa* H.B.K.).

Para determinar la actividad secuestradora de radicales libres, se realizaron ensayos preliminares con concentraciones de los extractos en 1, 10 y 100 ppm. Determinando que los extractos etanolicos de Hierba del cáncer, Cuachalalate, Tejocote y Cancerina, presentaron una extraordinaria capacidad captadora de radicales libres, con valores de (IC<sub>50</sub>, 4.12±0.39, 4.93±0.33, 5.31±0.29 y 8.33±0.24 mg/ml) respectivamente, superando al control positivo  $\alpha$ -tocoferol (IC<sub>50</sub>, 13.67±0.45). Con respecto al ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), las concentraciones probadas preliminarmente fueron 1, 10 y 100 ppm, obteniendo las mejores propiedades de capacidad antioxidante de los extractos etanolicos de Hierba del cáncer, Cuachalalate, Tejocote y Cancerina con valores de (IC<sub>50</sub>, 4.63±0.25, 4.98±0.44, 5.12±0.04y 11.15±1.04  $\mu$ g/ml) respectivamente, con valores de IC<sub>50</sub> muy parecidos al control de referencia quercetina de (IC<sub>50</sub>, 3.68±0.16  $\mu$ g/ml). Posteriormente se realizaron ensayos con Artemia salina para determinar la citotoxicidad de los diferentes extractos. Los resultados obtenidos mostraron a los extractos de éter de petróleo y los hexanicos de cancerina, cuachalalate, seguido del extracto de hierba del cáncer éter de petróleo y muicle agua, fueron los únicos que presentaron citotoxicidad en las larvas. Por otro lado al probar la citotoxicidad de los extractos etanolicos y acuosos sobre células mononucleares de sangre periféricas, encontramos que el extracto de hierba del cáncer agua presentó toxicidad sobre las células mononucleares desde 0.1-1000 mmp.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el estilo y ritmo de vida de las grandes ciudades, nos conduce en general a malos hábitos en la salud, como es no dormir diariamente las horas que el cuerpo necesita para realizar las actividades cotidianas, la falta de ejercicio, ingerir bebidas alcohólicas en exceso, fumar y por si fuera poco, cada vez es más común consumir comida rápida y/o procesada, ya que se encuentra al alcance de las personas que no disponen de tiempo para cocinar o comer en casa. Aunado a estos malos hábitos, también existen otros factores que pueden afectar la salud humana, como son la contaminación ambiental, el estrés vial, la radiación UV, entre otros. Estos factores pueden causar diferentes enfermedades como son diabetes, cáncer en general, enfermedades cardiovasculares, enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central, solo por mencionar algunas. Es por lo anterior que en los últimos años se ha incrementado el interés por la buena salud humana, y se esta buscando cada vez más regresar al consumo de alimentos frescos e incrementar la ingesta de frutas y verduras, por lado cada vez es más frecuente la ingesta de suplementos alimenticio entre los que encontramos a los minerales, alimentos con altos contenidos proteicos, vitaminas y antioxidantes en general. Muchos estudios han mostrado que los componentes de las frutas, verduras, alimentos no procesados y los suplementos alimenticios como los antioxidantes son beneficiosos para la salud humana y estos además ayudan en la prevención de los procesos degenerativos causados por la oxidación celular; es decir que estas enfermedades están asociadas a un desbalance entre las especies antioxidantes y los radicales libres. Los antioxidantes pueden ser considerados como una alternativa terapéutica para la prevención

de enfermedades asociadas al estrés oxidativo que constituyen en la actualidad un problema de salud.

México se encuentra dentro de los 12 países considerados como megadiversos, figura 1. Entre los factores que han contribuido a que México sea un país de gran diversidad biológica; son las condiciones ambientales y microambientales que promueven una gran variedad de hábitats y de formas de vida de especies de plantas y animales, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética CONABIO, 1998. México también es considerado como un centro de origen a nivel mundial de diversidad y domesticación de numerosas plantas cultivadas (Rzedowski 1978.)



Figura 1. Países considerados como mega--diversos

Además, México cuenta con una gran variedad de plantas con propiedades medicinales, sin embargo, muchos de los compuestos biológicamente activos de la plantas aún no han sido evaluados en su totalidad, como fuente de nuevos medicamentos y antioxidantes.

Algunas de estas plantas son cotidianamente utilizadas por la medicina tradicional mexicana desde tiempos prehispánicos, en patologías relacionadas con procesos inflamatorios, diabetes, cáncer, infecciones etc., entre las que se encuentran al Muicle

(*Justicia spicigera* Schult), hierba del sapo (*Eryngium comosum* Delar f.), hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* Cav.), tejocote (*Crataegus gracilior* Phipps), cuachalalate (*Amphypteringium adstringens*), y cancerina (*Hippocratea excelsa* H.B.K.).

Algunas de estas plantas han sido objetos de numerosas investigaciones, sin embargo, aún falta mucha investigación en cuanto a los estudios de toxicidad y en cuanto a sus propiedades antioxidantes.

## ANTECEDENTES

La mayoría de los medicamentos empleados en los diversos padecimientos humanos fueron extraídos de plantas medicinales y posteriormente sintetizados químicamente para su aplicación a escala comercial, por lo que las regiones que dispongan y conserven su biodiversidad de plantas tendrían muchas alternativas para atender las enfermedades (Bugno et al., 2006). La Republica Mexicana cuenta con una gran biodiversidad de plantas alrededor de 26,000 especies de las cuales se estiman que cerca de 4,000 especies son usada por la medicina tradicional o herbolaria (Vega-Avila E Fau - Espejo-Serna et al., 2009, Ruiz-Bustos et al., 2009). Sin embargo se tienen pocos estudios sobre sus propiedades químicas, toxicas, farmacológicas e investigaciones clínicas sobre su efecto en determinados padecimientos. Las investigaciones realizadas con plantas medicinales fueron dirigidas a estudiar sus propiedades antioxidantes (Schinella et al., 2002) (Wangensteen et al., 2004) (Zhang et al., 2010) (Basma et al., 2011) (B.A. Cardenas-Sandoval, 2012) antibacterial y antifungico (Alanís et al., 2005, Ruiz-Bustos et al., 2009) Antigiardia intestinalis (Mena-Rejón et al., 2007), (Caceres-Castillo et al., 2008) Anti-Helicobacter pylori (Castillo-Juárez et al., 2009) toxicológicos (Bugno et al., 2006), citotoxicos (Vega-Avila E Fau - Espejo-Serna et al., 2009), antiinflamatorios (Perez et al., 1995) (Schinella et al., 2002) y antitumorales. Estos estudios fueron realizados en extractos con solventes polares (Perez et al., 1995)

Castillo-Juárez et al., 2009 (Wangensteen et al., 2004) y apolares (B.A. Cardenas-Sandoval, 2012) (Perez et al., 1995) (Zhang et al., 2010) (Wangensteen et al., 2004) empleando técnicas de maceración (Ruiz-Bustos et al., 2009) (Basma et al., 2011), reflujo por soxhlet

(Castillo-Juárez et al., 2009) (Perez et al., 1995) (Zhang et al., 2010), ultrasonido y otros. Empleando temperaturas ambiente (Wangensteen et al., 2004) y de ebullición con reflujo (Bugno et al., 2006), combinando tiempo temperatura y frecuencia de ultrasonido. Sin embargo los estudios realizados son todavía insuficientes para obtener fitofármacos con aplicación específica sobre los diversos padecimientos humanos, debido a que la mayoría de los estudios están limitados a evaluaciones in vitro (Bugno et al., 2006, Ruiz-Bustos et al., 2009) y en pocos casos a estudios in vivo (Castillo-Juárez et al., 2009) y muy escasos todavía estudios clínicos en pacientes, por lo que es necesario continuar investigando los efectos de extractos de plantas potencialmente medicinales en diferentes solventes.

Las plantas seleccionadas en este trabajo de investigación son el Muicle (*Justicia spicigera* Schult), hierba del sapo (*Eryngium comosum* Delar f.), hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* Cav.), Tejocote (*Crataegus gracilior* Phipps), cuachalalate (*Amphypteringium adstringens*), y cancerina (*Hippocratea excelsa* H.B.K.), algunas de estas plantas son consideradas malezas porque se reproducen y crecen rápidamente, son de fácil adaptación en cualquier ambiente, proliferando en ambientes con suelo, vegetación natural dañada. Estudios realizados con extractos metanolicos de *Amphypteringium adstringens* Schiede ex Schlecht Julianiaceae (Cuachalalate) observaron que tenía un potente efecto inhibitorio del crecimiento de bacterias *S. flexneri*, *E. coli* and *S. aureus* y en menor intensidad sobre los hongos *F. verticillioides* *A. niger* (Ruiz-Bustos et al., 2009).

El extracto etanolico de la planta *Hippocratea excelsa* H.B.K cancerina fueron probados su efecto antiinflamatorio en modelos murinos (Perez et al., 1995), teniendo efecto protector

sobre el calor que induce la lisis de los eritrocitos y es eficaz en las fases exudativa y proliferativa crónica de la inflamación. Otros estudios realizados indican que tiene actividad antiprotozoal (Mena-Rejón et al., 2007) en *Giardia intestinalis* y que los componentes Pristimerine and tingenone were the most active, compared with metronidazole, the current drug of choice. También estudios realizados por (Caceres-Castillo et al., 2008) sobre esta planta identifican seis nuevos compuestos de 21b-hydroxy pentacyclic triterpenes de los cuales solo el componente 1 presenta actividad inhibitoria moderada sobre el crecimiento en *Giardia intestinalis*. Por otro lado (Alanís et al., 2005) observó que extractos crudos metanolicos de *Hippocratea excelsa* tiene una fuerte actividad antibacterial contra enteropathogens: *Escherichia coli* species; *Shigella sonnei* species; *Shigella flexneri* species; and *Salmonella* sp. Species at concentrations lower.

Estudios con hierba del cáncer indican que los extractos acuosos de hojas de (*Cuphea aequipetala* Cav.) tienen un alto efecto inhibitorio sobre *Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez et al., 2009) y mayor poder reductor antioxidante y fue observado el flavonoide quercetina 3-D-glucosideo por TLC (B.A. Cardenas-Sandoval, 2012). Extractos acuosos y etanolicos de *Justicia spicigera* Schult Muicle presentaron efecto citotóxico en dos líneas celulares T47D (cáncer de mama humano) y HeLa (cáncer de cuello uterino humano), empleando colchicina como control positivo. Extracto etanólico de *J. spicigera* presentó el mejor efecto citotóxico (Vega-Avila E Fau - Espejo-Serna et al., 2009).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar concentración de los compuestos fenoles solubles totales, actividad secuestradora de radicales libres, actividad antioxidante, además la toxicidad de los extractos el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante y la toxicidad de seis plantas mexicanas, seleccionadas a través de la medicina tradicional mexicana; como fuente potencial de antioxidantes naturales. Las condiciones a evaluar fueron: concentración de los compuestos fenoles solubles totales, actividad secuestradora de radicales libres, actividad antioxidante, además la toxicidad de los extractos.

Después de revisar los antecedentes se observó que no se cuenta con suficiente información sobre las propiedades toxicas y antioxidantes de las seis plantas utilizadas en el presente estudio. Por lo tanto, el propósito de este trabajo de investigación, fue determinar compuestos fenoles solubles totales, actividad secuestradora de radicales libres, actividad antioxidante, además de la toxicidad de los extractos. Diferentes plantas medicinales, seleccionadas a través de la medicina tradicional de México; como fuente potencial de antioxidantes naturales. Las condiciones a evaluar fueron: concentración de los compuestos fenoles solubles totales, actividad secuestradora de radicales libres, actividad antioxidante, además la toxicidad de los extractos.

Consecuencias de daño oxidativo.

El estrés oxidativo, surge como el resultado de un desbalance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes, esto esta asociado con el daño de un amplio rango de especies moleculares, incluyendo a los lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos.

## **Plantas a estudiar**

A continuación se describen brevemente las características más importantes de cada una de las plantas que se evaluaron en este trabajo.

*Hippocratea excelsa* e *H. celastroides* La familia Hippocrateaceae está integrada por más de 300 especies, distribuidas principalmente en las regiones tropicales de ambos hemisferios (Dodson y Robyns, 1965), que en su mayoría están contenidas en dos géneros: *Hippocratea* con alrededor de 100 especies y *Salacia* con 200 aproximadamente. En México, *Hippocratea excelsa* es llamada popularmente mata piojo, miseg-bat (Oaxaca), barajillo (Guerrero), piojo, zipche (Chiapas) y palo de reguilete (Yucatán), aunque por su anatomía puede confundirse con *Hippocratea celastroides* (Villa y Barajas-Morales 1998). En medicina tradicional se le conoce como cancerina y ha sido utilizada para el tratamiento de enfermedades como úlceras gástricas, padecimientos renales, afecciones de la piel, amenorrea y algunas infecciones uterinas.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se ha incrementado el interés por la ingesta de antioxidantes naturales como una alternativa de los antioxidantes sintéticos, debido a que los antioxidantes ayudan a la prevención de diversas enfermedades crónico-degenerativas, que se relacionan con el estrés oxidativos como las cardiopatías, el cáncer, la diabetes e, envejecimiento, entre otras. México cuenta con una amplia gama de plantas con propiedades antioxidantes y medicinales. Solo algunos de los metabolitos presentes en las plantas con propiedades medicinales y/o antioxidantes han sido estudiados y validados científicamente; es por esto que surge la necesidad de caracterizar y estandarizar los metabolitos presentes en extractos de plantas, así como determinar la concentración a la cual no es toxica para los humanos.

## HIPOTESIS

Algunos de los extractos de *Justicia spicigera* Schult, *eryngium comosum* Delar f., *Cuphea aequipetala* Cav., *Crataegus gracilior* Phipps, *Amphypteringium adstringens* y *Hippocratea excelsa*. Presentan actividad antioxidante, y no son tóxicos para los seres humanos.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades antioxidantes, y cito tóxicas de los extractos de los extractos de *Justicia spicigera* Schult, *eryngium comosum* Delar f., *Cuphea aequipetala* Cav., *Crataegus gracilior* Phipps, *Amphytergium adstringens* y *Hippocratea excelsa*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos de las plantas con solventes de distinta polaridad por el método de maceración a temperatura ambiente
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos utilizando el método de Difenil picrahidrazil (DPPH) y (TBARS).
- Realizar pruebas de citotoxicidad de los extractos en Artemia Salina.
- Evaluar la toxicidad de los extractos de plantas sobre células primarias humanas
- Nanoencapsular aquellos extractos que no presenten toxicidad en las células primarias en concentraciones menores a 1000 ppm, utilizando el Nano spray dryer
- Realizar la caracterización mediante microscopia electrónica de barrido (MEB ) de las nanopartículas obtenidas.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Lugar de la investigación**

El procesamiento de las plantas, se llevó a cabo en el laboratorio de Pruebas Físicas de CICATA-LEGARIA Del IPN.

Los Análisis de la inhibición de la formación de TBARS en cerebro y la actividad antioxidante, se realizó en el departamento de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México, bajo la dirección del M. en C. Antonio Nieto Camacho.

### **2.2. Materiales y equipos**

2.2.1 Material biológico. Muicle (*Justicia spicigera* Schult), hierba del sapo (*Eryngium comosum* Delar f.), y hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* Cav.) fueron recolectadas en el ejido de Tequexquahuac, municipio de Texcoco, Estado de México, entre los meses de agosto y septiembre del 2010, durante la época de floración. La parte foliar del árbol de tejocote (*Crataegus gracilior* Phipps), y la corteza del cuachalalate (*Amphypteringium adstringens*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*) fueron adquiridas en el Mercado de la Merced de la Ciudad de México.

#### **2.2.2 Materiales de laboratorio**

- Vasos de precipitado
- Pipetas
- Probetas

- Cajas de 96 pozos para cultivo
- Termometro
- Viales Eppendorf
- Cámara de Neubauer
- Tubos Falcón para centrifuga de 50 mL estériles
- Pipetas Pasteur de plástico estériles
- Micropipetas y puntas (estériles)
- Tobos eppendorf de 1.5 mL
- Vórtex
- Centrifuga
- Gradilla
- Porta eppendorf
- Guantes de látex o vinilo estériles

### **2.2.3 Equipos**

- Lector de Elisa
- Balanza analítica ()
- Potenciómetro (Fisher Accumet pH Model 620)
- Campana de extracción
- Molino de martillos (Mikro pulverizer model 2TH, USA)
- Estufa de Secado ()
- Rotavapor (Evaporador rotatorio, Yamato, modelo RE500)
- Estufa
- Microscopio invertido
- Sonicador
- Equipo de extracción
- Centrifuga (Centrifuga Sol-Bat Eppendorf, modelo M25)
- Buchi Nano Spray Dryer B-90.

- Campana de flujo laminar
- Cámara de CO<sub>2</sub>
- Autoclave
- Nanosizer

#### **2.2.4 Reactivos y medios de cultivo**

##### **Extracción (maceración)**

- Plantas (varias)
- Paquetes Leucocitarios
- Agua destilada
- Etanol
- Hexano
- Éter de Petróleo

##### **Método de DPPH**

- Extractos (muestra)
- Etanol
- 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)
- DMSO
- BHT
- $\alpha$ -tocoferol

##### **Método de TBARS**

- Cerebro de rata
- Buffer salino de fosfato de PBS
- Proteína de cerebro de rata
- Agua destilada
- Reactivo catalizador: Sulfato de cobre II (CuSO<sub>4</sub>)
- Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

- Tartrato de Na/K Potasio (NaK<sub>2</sub>)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Reactivo de Folin Ciocalteu
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Cloruro de sódio NaCl
- Sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>)
- Reactivo cromó de Ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Reactivo antioxidante (BHT)
- Ácido tricloroacético (TCA)
- Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Fosfato de sodio (NaHPO<sub>4</sub>)

#### **Modelo biológico de Artemia salina**

- Quistes de artemia salina
- Sal de mar
- Agua desionizada
- DMSO
- Extractos de plantas (acuosos, etanolicos, hexanicos y en éter de petróleo)

#### **Método de Folin**

- Reactivo de Folin Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Ácido gálico

#### **Evaluación de toxicidad de los extractos sobre células primarias humanas**

- Medio RPMI-1640 (alta glucosa, con L-Glutamina , con Hepes, esteril)
- X-Vivo10 (con gentamicina y rojo de fenol)
- Lymphoprep
- Premixed WST-1 Cell Proliferation reagent
- Azul tripano
- Dimetilsulfóxido estéril (DMSO)

## **Nanoencapsulación**

- Pectina
- Suero de leche
- Agua destilada

## **2.3 Metodología**

**2.3.1 Recolección.** Muicle (*Justicia spicigera Schult*), hierba del sapo (*eryngium comosum Delar f.*), y hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*) fueron recolectadas en Texcoco Estado de México, entre los meses de agosto y septiembre del 2010, durante la época de floración. Las ramas de tejocote (*Crataegus gracilior Phipps*), y las cortezas de cuachalalate (*Amphipteringium adstringens*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*) fueron adquiridas en el Mercado de la Merced de la Ciudad de México.

### **2.3.2 Acondicionamiento del material vegetal**

Se realizó la limpieza total de la planta, eliminando los cuerpos extraños, posteriormente estas fueron lavadas con abundante agua y sumergidas en una solución de hipoclorito al 1% durante 10 minutos, transcurrido este tiempo, las plantas se dejaron secar bajo sombra por un periodo de 15 días a temperatura ambiente. En otro paso el material vegetal fue cortado en pequeños pedazos para facilitar la trituration hasta obtener una granulometría de 80 mesh (0.1778 mm), finalmente, el polvo seco obtenido fue almacenado en contenedores de polietileno para su posterior uso.

**2.3.3 Obtención de los extractos.** La extracción de los compuestos a analizar, se realizó mediante maceración y el uso de los siguientes solventes: agua, etanol, hexano y éter de petróleo. Esto se llevó a cabo por un periodo de veinticuatro horas, a temperatura ambiente, colocando sesenta gramos de polvo seco de cada una de las siguientes plantas: muicle (*Justicia spicigera Schult*), hierba del sapo (*Eryngium comosum Delar f.*), hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*), parte del tronco de tejocote (*Crataegus gracilior Phipps*), corteza de cuachalalate (*Amphipteringium adstringens*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*) en matraces Erlenmeyer con 560 mL de cada solvente. Transcurridas las veinticuatro horas la solución fue decantada, quedando así únicamente el residuo de cada una de las plantas; estos residuos fueron lavados sucesivamente con cada uno de los solventes hasta que todos los componentes solubles en la solución se agotaron. Las diferentes soluciones que se obtuvieron se colocaron en un matraces bola de 1000 ml, 500 ml y 250 ml, para eliminar cada uno de los solventes mediante evaporador rotatorio.



Figura No 2. Obtención de los extractos

**2.3.4 Determinación taxonomica.** Se tomaron tres muestras de las siguientes plantas: de hierba del cáncer, tejocote y hierba del sapo en estado de floración o con fruto y se enviaron al Herbario Nacional de México del Departamento de Botánica, del Instituto de Biología de

la Universidad Autónoma de México, para la realización de la determinación taxonómica, dirigida por el M. en C. Rafael Torres Colin, quien determinó el ejemplar.

## **2.4 Contenido de fenoles totales**

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. El mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total. El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965) de uno empleado para la determinación de tirosina, el cual se basaba en la oxidación de los fenoles por un reactivo de molibdeno y wolframio (tungsteno). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (Ghiselli A., Nardini M., Baldi A. and Scaccini C., 1998). Se trata de un método simple, preciso y sensible pero que sin embargo sufre numerosas variaciones cuando es aplicado por diferentes grupos de investigación, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes empleados de muestra, concentraciones de reactivos y tiempos y temperaturas de incubación.

La determinación del contenido de fenoles totales de todos los extractos, se llevo a cabo utilizando la metodología propuesta por Singleton y Rossi (1965) con ciertas modificaciones.

**2.4.1 Preparación de la curva estándar de calibración.** Se disolvieron 0.5 g/L de ácido gálico en 10 ml de etanol y aforado a 100 ml con agua destilada. De la solución estándar de

ácido gálico de (5 g/L) se tomaron diferentes volúmenes hasta obtener las siguientes concentraciones 100 mg/L a 900 mg/L, en intervalos de 100 mg/L, respectivamente.

**2.4.2. Preparación de la solución de carbonato de sodio.** Se disolvieron 200 g de carbonato de sodio anhidro en 800 ml de agua, retirándose cuando el agua alcanzo el punto de ebullición, una vez enfriada la solución, se saturó agregándole unos pocos de cristales de carbonato de sodio y se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo la solución saturada fue filtrada a través de papel filtro Whatman no, 1 y aforada a un litro con agua destilada.

**2.4.3. Determinación de los fenoles totales de los extractos.** A 10 $\mu$ L de los extractos y estándares se les adicionó 0.7 $\mu$ L de agua destilada y 50 $\mu$ L del reactivo de Folin–Ciocalteu (2N) estas soluciones fueron dejadas en reposo durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 1500 $\mu$ L de una solución saturada de carbonato de sodio (20% w/v), y se dejaron en reposo durante 80 minutos en oscuridad, la absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 760nm utilizando un espectrofotómetro Cary 50 (Varian, USA). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco. El experimento se llevó a cabo con cuatro repeticiones.

## **2.5. Análisis de la actividad antioxidante**

El análisis de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante dos métodos con fines de comparación. Con el primer método se determinó la capacidad captadora de radicales libres

mediante el modelo de DPPH, con la finalidad de probar las siguientes concentraciones: 10, 100 y 1000 ppm, de cada uno de los extractos, y con esto determinar si los extractos son capaces de reducir al radical DPPH y en que concentración. El segundo método utilizado fue el de TBARS, en donde se analizaron las concentración de 1, 10 y 100 ppm de cada extractos, y determinándose, si los diferentes extractos presentan alguna actividad antioxidante y en que concentración. Estos análisis se realizaron en el departamento de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México, bajo la dirección del M. en C. Antonio Nieto Camacho.

#### **2.5.1 Actividad secuestradora de radicales libres mediante (DPPH•)**

El método DPPH se basa en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo para reaccionar con donadores de H. El radical DPPH tiene un electrón desapareado, en una longitud de onda de 517 nm, observándose una coloración azul-violeta en solución, decolorándose hacia el amarillo pálido o incoloro por la reacción con una sustancia captadora de radicales libres. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos OH activos donadores de H capaces de capturar los radicales libres (Kaneda et al, 1995).

**2.5.2 Solución stock de los extractos.** Se prepararon 500 µl de cada una de las muestras (extractos de plantas) diluyéndolas en DMSO en concentraciones finales de 40, 400 y 4000 ppm.

**2.5.3 Solución de DPPH•.** Se preparó una solución madre de DPPH 1 mM, disolviendo 2.075 mg de DPPH en 5.26 ml de etanol, esta solución fue agitada en un sonicador para disolver los cristales de DPPH. A partir de la solución madre de DPPH se realizó una segunda disolución para obtener una concentración de 133.33 Mm.

**2.5.4 Método de DPPH•** En una microplaca de 96 pozos, fueron añadidos 150µL del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•, 133.33 µM) y 50 µL de cada extracto. La mezcla de 150µL de (DPPH•, 133.33 µM) y 50µL de etanol fueron utilizados como control. Los compuestos BHT y α tocoferol fueron utilizados como estándar. La microplaca se mantuvo durante 30 minutos en agitación constante, a 37°C, después de los 30 minutos de agitación se procedió a leer la absorbancia de las muestras en un lector de placas Bio-Teck EL x 808 plate a una longitud de onda de  $\lambda=515$  nm. Todas las muestras y los estándares se preparan por triplicado. La actividad antioxidante se calculó utilizando la siguiente formula.

$$(\%) \text{ de Inhibición} = \left( \frac{A1 - A0}{A1} \right) \times 100$$

Donde A1 es la absorción del blanco al tiempo cero, A0 es la absorción de los extractos probados a los 30 minutos

A partir de las gráficas obtenidas del porcentaje de inhibición contra el logaritmo de las concentraciones probadas, fue posible calcular los valores de IC50 para cada extracto a través de la interpolación de los datos por medio de una de una función logarítmica.

## **2.6 Determinación de la Peroxidación Lipídica**

La determinación de la peroxidación lipídica en principio es difícil debido a que los productos de la misma son muy reactivos y de vida corta. Es por ello, que se determinan los productos de la degradación metabólica de los lipoperóxidos. Pero son, fundamentalmente, los diferentes aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos presentes en el cerebro los que son objeto de cuantificación. El malondialdehído (MDA) es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y también el más cuantificado. Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para cuantificar al malondialdehído endógeno el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del mismo con el 2-tiobarbiturico (TBA). El (MDA), en condiciones de bajo pH y alta temperatura, reacciona con el ácido tiobarbiturico (TBA) dando lugar al aducto (MDA-TBA) cromogeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría o por fluorimetría. Por lo tanto, la reacción del (TBA) es considerada una metodología muy sensible para la determinación de la peroxidación de lipídica de tejidos animales.

Animales. Los ratas Wistar adultas (200-250 g) fueron proporcionados por el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se aprobó el uso de ratas Wistar adultas por parte del Comité de Cuidados y Usos de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Las condiciones de los animales fueron las siguientes, temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h, con acceso libre para comida y agua

**2.6.1 Preparación del homogenizado de cerebro de rata.** El sacrificio animal fue efectuado evitando dolor innecesario. Los ratones fueron sacrificados con  $\text{CO}_2$ . El tejido

celular de todo el cerebro fue rápidamente diseccionado y homogenizado en una solución salina de fosfatos (PBS) preparada con las siguientes concentraciones (0.2 g de KCl, 0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g de NaCl, y 2.16 g de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  / L. El pH se ajustó a 7.4) reportado en (Ohkawa, H.) para producir 1/10 (w/v) del homogenizado. Después, el homogenizado fue centrifugado por 10 min en 3400 rpm, obteniéndose un pellet que es desechado y se guardó el sobrenadante.

**2.6.2 Contenido total de proteínas en la suspensión del sobrenadante:** El método de Lowry es altamente sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteínas totales. El contenido de proteína en la suspensión del sobrenadante de cerebro de rata, se cuantificó utilizando el reactivo de Folin y Ciocalteu's el cual se ajustó a 2.666 el mg de proteína/ml con solución de PBS (Lowry, O. H et al)

La determinación de la peroxidación lipídica se realizó por el método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbiturico (TBARS), como índice de peroxidación lipídica. Los niveles de TBARS fueron se cuantificaron utilizando homogenizado de cerebro de rata de acuerdo al método descrito por by J.I. Rossato and Ng et al, con algunas modificaciones. A (375  $\mu\text{L}$ ) de la suspensión del sobrenadante se le adicionarón 50  $\mu\text{L}$  de 20  $\mu\text{M}$  EDTA, 25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos disueltos en DMSO en concentraciones de 1, 10 o 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (25  $\mu\text{L}$  de DMSO para el grupo control) e incubada a 37 °C por 30 minutos. La peroxidación lipídica se llevó a cabo justo en el momento que se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución fresca de 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , y las muestras fueron incubadas a 37°C por 1 hora adicional. El contenido de TBARS se determinó como los describen Ohkawa et al and Domínguez, M. con la modificación de agregar a la suspensión final 0.5 ml del reactivo de TBA (0.5% 2-ácido tiobarbiturico en 0.05 N NaOH y 30% ácido tricloroacético, en una

proporción 1:1) esta suspensión fue enfriada en hielo por 10 minutos, centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos, y calentada a 95 °C en un baño maría de agua por 30 minutos. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la densidad óptica del supernadante (200 µL) fue medida a  $\lambda=540$  nm en un lector de microplacas BIO-TEK ELx808. La concentración de TBARS se calculó por la interpolación de la curva estándar experimental determinada para tetrametoxipropano (TMP) como se describe en (Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H.). Finalmente los resultados se expresaron como nmoles de TBARS por mg de proteína. El porcentaje (%) de inhibición se define como el decremento de la formación de TBARS debido al extracto probado y se calculó de la siguiente forma.

$$\text{Porcentaje de Inhibición (\%)} = \left( \frac{C - E}{C} \right) * 100$$

Donde C y E corresponden a la absorbancia para el control y la muestra probada, respectivamente, a  $\lambda=540$  nm. El butil hidroxitolueno (BHT) y el  $\beta$ -tocoferol fueron usados como control positivo

## **2.7 Ensayo de toxicidad empleando el modelo biológico de Artemia Salina**

Para llevar a cabo la evaluación de la toxicidad de los extractos de ... se emplearon larvas de Artemia salina siguiendo el método de ....

Procedimiento experimental. Se utilizaron quistes de Artemia salina que fueron donados por el departamento de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México; los quistes fueron transferidos en 500 mL de una solución de agua

marina Instant Ocean, para favorecer su eclosión, a temperatura de entre 24 y 27°C. Los huevecillos eclosionaron en 48 horas. Las larvas recién emergidas fueron las que se utilizaron para realizar la prueba de toxicidad. Esta prueba se desarrolló de la siguiente forma: en una caja de 96 pozos que contenía 100 µl solución salina fueron transferidas con una micropipeta 10 artemias , y 100 µl de cada uno de los extractos en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, respectivamente, realizaron tres replicas de cada concentración. El control positivo estándar para el ensayo de toxicidad en Artemia salina se utilizó el dicromato de potasio.

Veinticuatro horas después de que las artemias fueron expuestas a los extractos se procedió a cuantificar a simple vista, el número de artemias sobrevivientes y muertas. Una vez terminado esto se les agrego 100 µl de etanol y se dejan en refrigeración durante 15 minutos para proceder a desecharlas. Se determinó la concentración letal media letal media (CL50) empleando el método de Reed –Muench.

### **2.8 Evaluación de la cixicidad de extractos de plantas sobre células mononucleares de sangre periférica in vitro.**

Para realizar las pruebas de citotoxicidad, fueron seis extractos etanolicos y seis extractos acuosos de los 24 original mente probados, esta selección se basó en los resultados previamente obtenidos en donde se observó que los extractos apolares no presentaron actividad antioxidante relevante.

Esta técnica se realizó mediante la estimulación de los extractos de plantas sobre células mononucleares de sangre periférica, extraídas de paquetes leucocitarios, donados por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza.

El estudio de viabilidad celular fue evaluado mediante el uso del métodos fotométrico utilizando el reactivo WST-1. El método con el WST-1, consistió en la determinación colorimétrica de la actividad metabólica y de la proliferación celular. El cual se basa en la reducción de las sales de tetrazolio WST-1 [2-(4-Iodofenil)-3- (4-nitrofenil)-5- (2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] a sales de formazán, mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa que es activo solo en el caso de células viables, produciendo un cambio de color. A mayor proliferación, mayor actividad mitocondrial, que se traduce en una mayor hidrólisis del reactivo WST-1, dando una coloración que se detecta a 450 nm. Esta técnica permite medir de una forma directa la viabilidad celular frente a diferentes estímulos químicos (toxicidad), y de una manera indirecta, medir la proliferación celular.

Los resultados se expresan como % de viabilidad (actividad de la deshidrogenasa mitocondrial) con respecto a las células control (no tratadas).

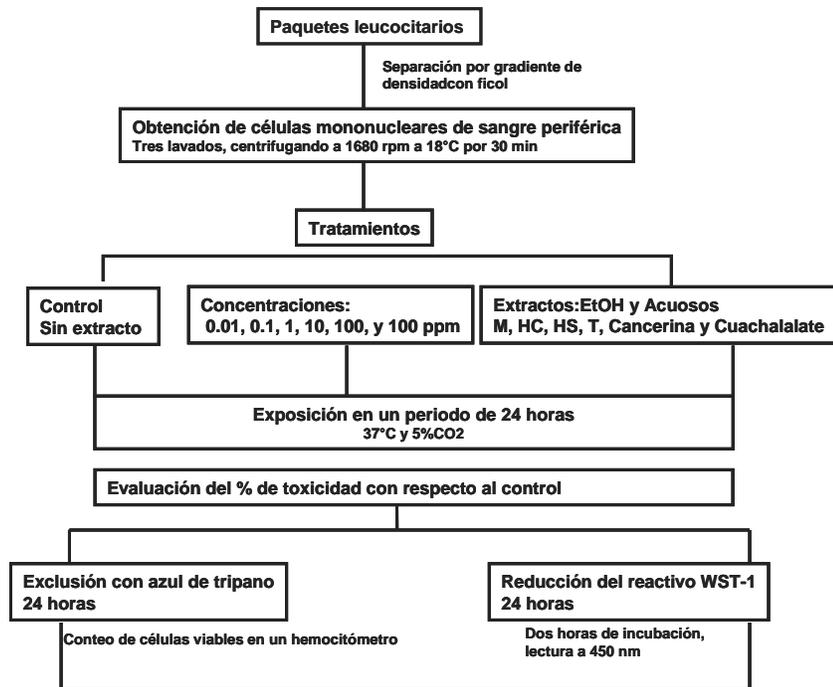


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes actividades metodológicas para la exposición de células mononucleares con diferentes extractos de plantas.

**Estrategia:** En un tubo de 50 ml se adicionó lo siguiente: 20 ml del medio de cultivo RPMI 1640, 20 ml de sangre y 10 ml de la solución de linfocitos con pipeta Pasteur, esta se adicionó lentamente, la mezcla fue centrifugada a 1680 rpm a 18°C por 30 min.

### 2.8.1 Obtención de las células mononucleares

Una vez centrifugada la mezcla se procedió a aspirar el anillo que se localiza en la interfase del medio de cultivo y la solución separadora de linfocitos y fue transferido a otro tubo de 50ml, evitando llevarse eritrocitos (células rojas) y tomando la menor cantidad posible de las dos soluciones de las fases; el tubo de separación fue desechado.

El anillo que se fue transferido a otro tubo, se llevó a 40 ml con el medio RPMI 1640 para ser centrifugado nuevamente a 1680 rpm a 18°C, por 10 min. El sobrenadante fue desechado en un bote con cloro al 10% y el sedimento (botón de células) se fueron disgregas mediante un vortex; y se realizó el segundo lavado, ahora con 30ml del medio RPMI 1640 y se centrifugó nuevamente a 1680 rpm a 18°C, por 10 min. Se realizó un tercer lavado de la misma forma que las dos anteriores pero con 20ml del medio RPMI1640. Una vez terminados los tres lavados, se adicionaron 5 ml del medio de cultivo X-vivo™, a las células mononucleares. Finalmente se procedió a contar las células para preparar una suspensión celular de  $1 \times 10^6$  células/ml.

### **2.8.2 Llenado de la placa**

Para el ensayo colorimétrico de viabilidad fue necesario colocar  $5 \times 10^4$  células/pozo en un volumen final de 100  $\mu$ l. Se colocaron 50  $\mu$ l de la suspensión celular en cada pozo, y se añadieron 5 $\mu$ l de cada extracto, ajustando el volumen a 100 $\mu$ l con medio X-VIVO, el blanco se preparó de la misma forma pero sin extracto. Finalmente la placa se matuvo incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) y 37°C por 24 horas, al término de este tiempo se aplicaron 10 $\mu$ L del reactivo wst-1 a todos los pozos, después de 2 horas de haber aplicado el WST-1, se procedió a leer la absorbancia a 450nm, previa agitación por 5 segundos.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las propiedades antioxidantes de las plantas son atribuidas a los diferentes metabolitos presentes en ellas, entre los que encontramos a los compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, y taninos. Huan-Bin , et al, 2007). En este contexto, se buscan compuestos naturales con alto contenido de antioxidantes, que se puedan incorporar a nuestra dieta, entre los que se mencionan a los polifenoles, carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico, entre muchos otros, estos antioxidantes se asocian a ciertos beneficios relacionados con la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo. Con base a los resultados de la (tabla 1), se observa, en general, que los extractos etanolicos de *Crataegus gracilior* Phipps, *Cuphea aequipetala* Cav., *Amphypteringium adstringens* y *Hippocratea excelsa* presentaron mayor contenido de fenoles totales, (778, 623, 519.06y 439.31 mg GAE/g extracto seco), respectivamente. Mientras que los extractos no polares mostraron actividad antioxidante moderada, en cuanto al contenido de fenoles alrededor de 100-300 mg GAE/g extracto. Estos resultados sugieren, que existe correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante, (Sre et al., 2012), ( $R= 0.997$ ), la actividad antioxidante de los polifenoles que mostraron los extractos etanolicos y acuosos, probablemente, se debe a sus propiedades redox, las cuales les permite actuar como agentes de reducción o como donadores de hidrógeno, (Déciga-Campos et al., 2007). Previamente, (Sepúlveda Jiménez, 2013) reportaron que los extractos acuosos, de las hojas *Justicia spicigera* Schult., mostraron la máxima contenido fenólico  $5.01\pm 0.02$ .

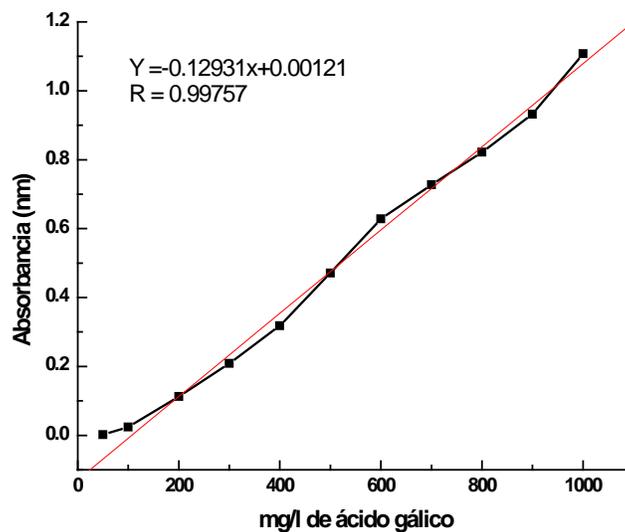


Figura 4. Curva de calibración utilizando ácido gálico

Table 1. Resultados del contenido de fenoles totales de extractos de *Justicia spicigera* Schult, *Eryngium comosum* Delar f., *Cuphea aequipetala* Cav., *Crataegus gracilior* Phipps, *Amphyterium adstringens* and *Hippocratea excels*.

| Plant Name                                    | Extracts      | Absorbancia promedio | Contenido Fenólico (mgAG/g extract) |
|---|---------------|----------------------|-------------------------------------|
|   | Agua          | 0.5417±0.03712       | 554.59                              |
| Tejocote ( <i>Crataegus gracilior</i> Phipps) | EtOH          | 0.8132±0.03019       | 778.97                              |
|   | Éter petróleo | 0.0347±0.0035        | 135.59                              |
|   | Hexano        | 0.1037±0.0039        | 192.61                              |
|   | Agua          | 0.1262±0.00759       | 211.21                              |
| Cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> )      | EtOH          | 0.4022±0.03036       | 439.31                              |
|   | Éter petróleo | 0.0157±0.00592       | 119.88                              |

|  |               |                |        |
|--|---------------|----------------|--------|
|  | Hexano        | 0.0162±0.0098  | 120.30 |
|  | Agua          | 0.2997±0.02821 | 354.59 |
| Hierba del cáncer ( <i>Cuphea<br/>aequipetala Cav.</i> )   | EtOH          | 0.62470.05546± | 623.19 |
|  | Éter petróleo | 0.0056± 0.0051 | 110.38 |
|  | Hexano        | 0.011±0.00358  | 115.96 |
|  | Agua          | 0.2605±0.01729 | 322.16 |
| Cuachalalate<br>( <i>Amphypteringium<br/>adstringens</i> ) | EtOH          | 0.4987±0.03588 | 519.06 |
|  | Éter petróleo | 0.0387±0.01841 | 138.89 |
|  | Hexano        | 0.0317±0.00371 | 133.11 |
|  | Agua          | 0.1667±0.02017 | 244.68 |
| Hierba del sapo ( <i>eryngium<br/>comosum Delar f.</i> )   | EtOH          | 0.058±0.00418  | 154.80 |
|  | Éter petróleo | 0.012±0.00596  | 116.78 |
|  | Hexano        | 0.008±0.00464  | 113.48 |
|  | Agua          | 0.1097±0.01716 | 197.57 |
| Muicle ( <i>Justicia spicigera<br/>Schult</i> )            | EtOH          | 0.061±0.00995  | 157.69 |
|  | Éter petróleo | 0.020±0.00654  | 123.81 |
|  | Hexano        | 0.0082±0.00304 | 113.69 |

Los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes ± el error estándar.

### Reducción del DPPH

La disminución de la absorción del radical DPPH en presencia de extractos de plantas, es un indicativo de la capacidad de los extractos para captar radicales libres, independientemente de cualquier actividad enzimática. La figura, muestra los resultados obtenidos de los diferentes extractos de plantas en concentración de 10 ppm, expresado

como porcentaje de reducción del radical DPPH. El antioxidante  $\alpha$ -tocoferol, se utilizó como control de referencia captadora de radicales libres. De los veinticuatro extractos analizados, se observa, que los extractos etanolicos mostraron la mejor actividad reductora del radical DPPH, con porcentajes de reducción por arriba del 40%, excepción de los extractos de mutile y hierba del sapo, y con respecto a los extractos acuosos únicamente el extracto de tejocote supero al control de referencia ( $\alpha$ -tocoferol 30%), y los extractos hexanicos y en éter de petróleo, resultaron ser los menos adecuados para reducir al DPPH en esta concentración.

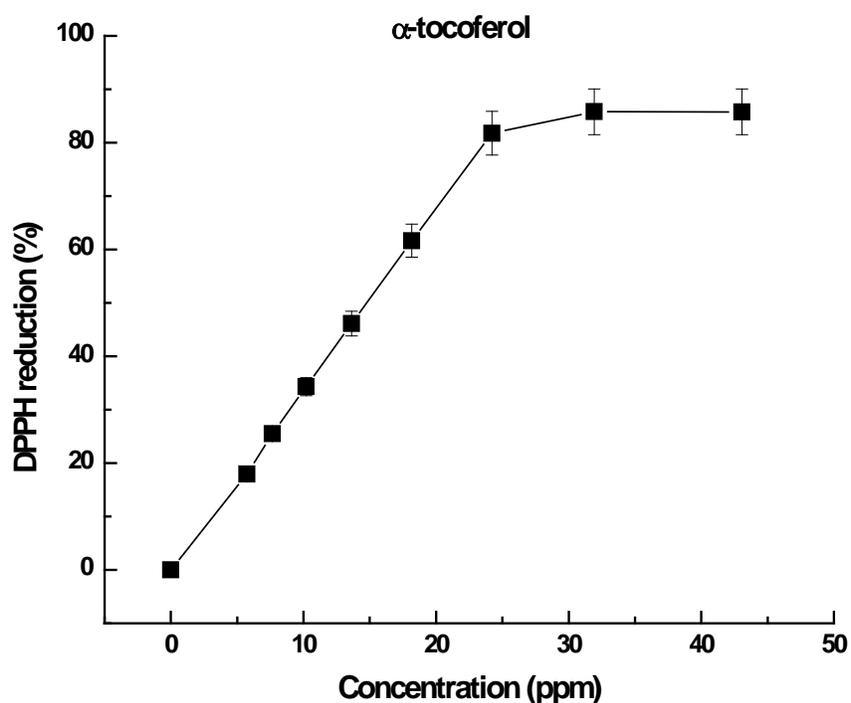


Figura 5. Curva de calibración utilizando al antioxidante  $\alpha$ -tocoferol como estándar de reducción del radical libre DPPH.

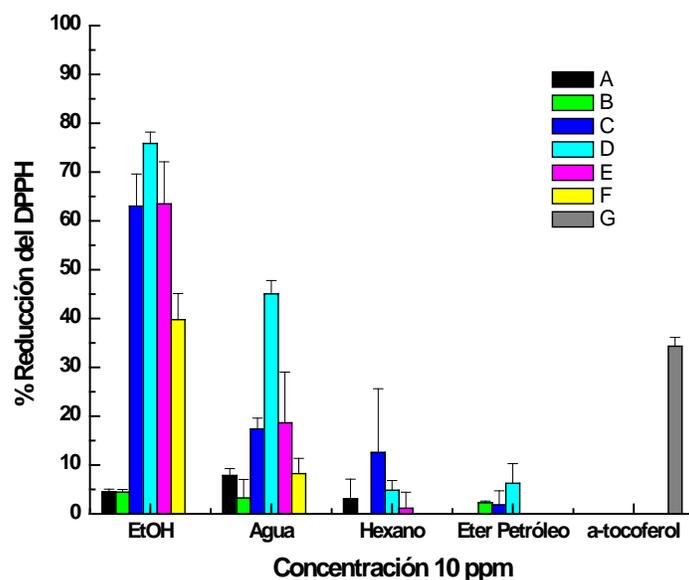


Figura 6. Resultados de la actividad atrapadora de radicales libres de los extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y de éter de petróleo

Sin embargo al realizar el mismo experimento de la reducción del DPPH, ahora incrementando la concentración a 100 ppm, podemos ver que todos los extractos etanolicos y acuosos muestran una extraordinaria capacidad captadora de radicales libres, figura 1b, a excepción del extracto acuoso de muicle, sin embargo, en este caso el extracto de tejocote hexano también presentó una excelente capacidad reductora del DPPH del 58%, los demás extractos probados a esta concentración siguen estando muy por debajo del control.

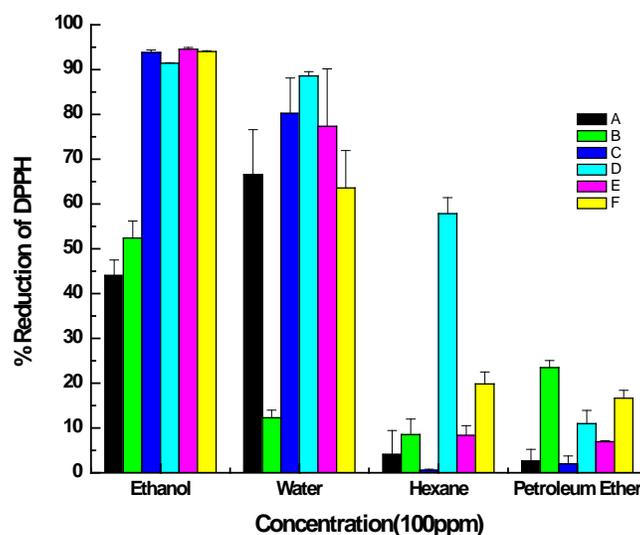


Figura 7. Porcentajes de reducción del DPPH con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 100 ppm.

Ahora al aumentar la concentración de 100 a 1000 ppm, observamos que todos los extractos probados incrementaron el porcentaje de reducción del DPPH, esto es un indicativo de que la actividad antioxidante de los diferentes extractos esta relacionada directamente con la concentración de extracto utilizado, también notamos que los resultados de los extractos etanolicos siguen siendo los mejores candidatos de captura del radical libre de la molécula del DPPH con porcentajes por arriba del 90%, en comparación con los demás extractos probados, aún a pesar de que la mayoría de los extractos, en este caso, presentaron una excelente capacidad antioxidante, mayor al 50%, a excepción del extracto extraído con hexano y con de éter de petróleo, figura 7.

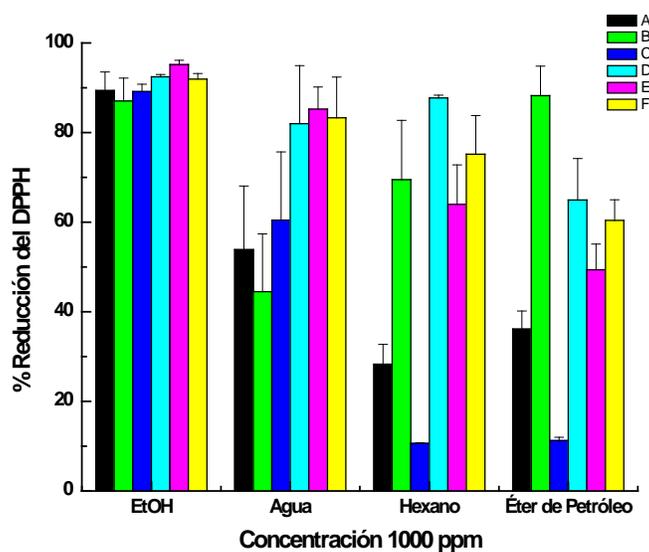


Figura 8. Porcentajes de reducción del DPPH con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 1000 ppm.

Una vez terminado el ensayo preliminar de la actividad antioxidante, y que se determinó que los extractos etanolicos y acuosos fueron los mejores candidatos para reducir al DPPH, se procedió a realizar las curvas patrón de los extractos con mayor actividad antioxidante en etanol y agua Figurascon el fin de seguir el comportamiento de los extractos frente al radical libre DPPH, además estas gráficas nos permitieron calcular los valores del IC50.

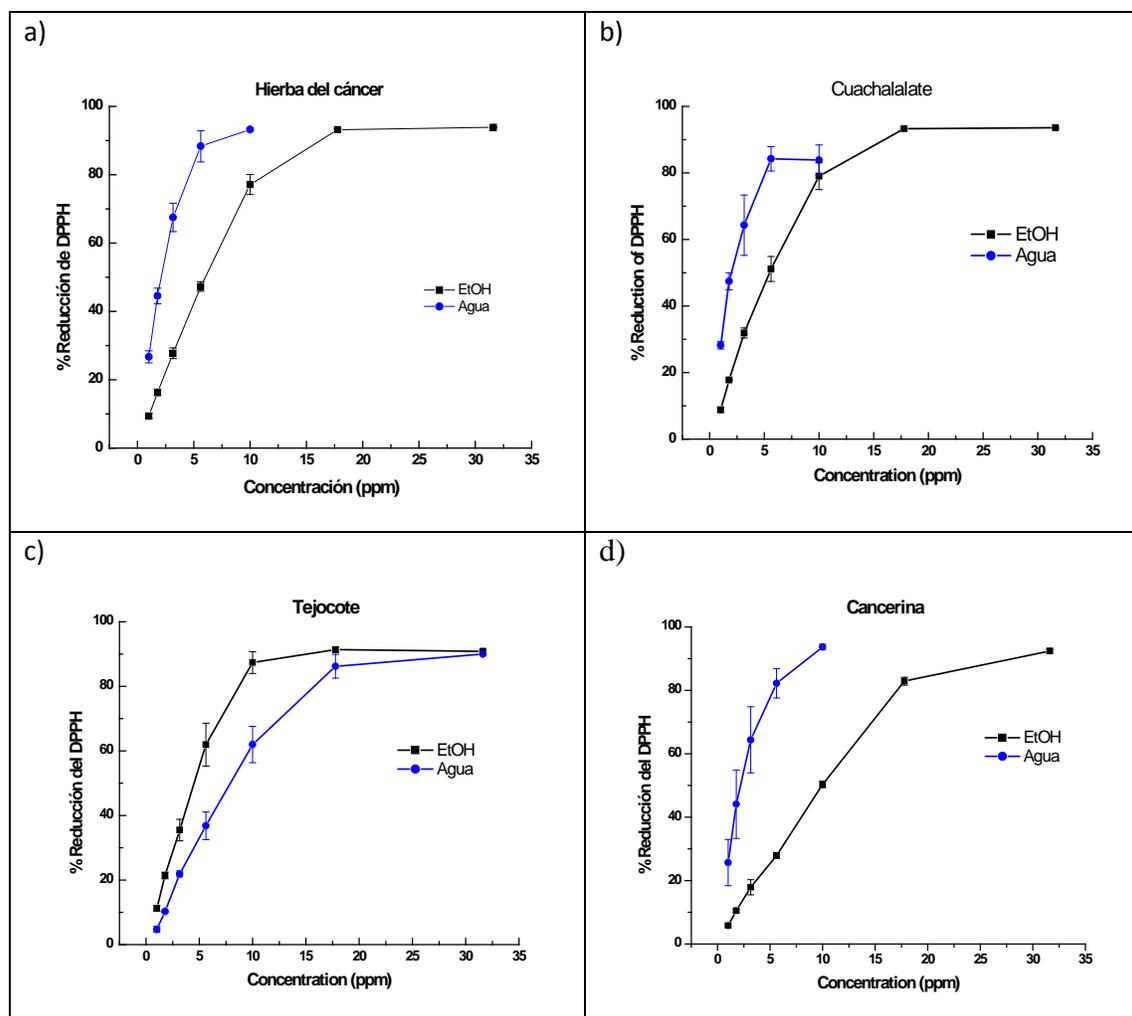


Figura 9. Curvas del porcentaje de reducción de los extractos de a) Hierba del cáncer, b) Cuachalalate, c) Tejocote y d) Cancerina

La figura 1b, muestra la variación de los valores de IC<sub>50</sub>, (cantidad de extracto requerida para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH) entre los extractos etanolicos y los extractos acuosos. Siendo los siguientes extractos etanolicos: Hierba del cáncer, Cuachalalate, Tejocote y Cancerina, los que presentaron los menores valores de (IC<sub>50</sub>, 4.12±0.39, 4.93±0.33, 5.31±0.29 y 8.33±0.24 mg/ml) respectivamente, mostrando su extraordinaria capacidad captadora de radicales libres, sin embargo, los extractos acuosos fueron los menos activos en cuanto a su habilidad captadora de radicales libres, con valores

de IC50 por arriba del control (IC50, 13.67±0.45), a pesar de haber presentado porcentajes de reducción mayores al 60%. Los valores encontrados son muy superiores a los reportados por (Sepúlveda Jiménez, 2013), quien reportó los siguientes valores de (IC50, 60.08±1.71, 174.72±4.48 y 994.67±6.85), de los extractos acuosos de las hojas, flores y tallos de *Justicia spicigera* Schult respectivamente. Esta diferencia puede explicarse considerando que la capacidad antioxidante de una muestra vegetal no viene dado solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada componente, sino que también depende de los micronutrientes que contiene pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios, también pueden afectar otros factores como son el método de extracción, las partes de las plantas utilizadas así como los solventes usados en cada extracción.

Tabla 2. Valore de IC50 de extractos etanolicos y acuosos del modelo de DPPH

| Plant Name  | Extracts | (IC <sub>50</sub> µg/ml) |
|---|----------|--------------------------|
| Tejocote ( <i>Crataegus gracilior</i> Phipps)       | EtOH     | <b>7.29±0.73</b>         |
|   | EtOH     | <b>4.12±0.39</b>         |
| Cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> )            | Agua     | 19.82±7.46               |
|   | EtOH     | <b>8.33±0.24</b>         |
| Hierba del cáncer ( <i>Cuphea aequipetala</i> Cav.) | Agua     | 19.90±1.52               |
|   | EtOH     | <b>5.31±0.29</b>         |
| Cuachalalate ( <i>Amphypteringium adstringens</i> ) | Agua     | 20.20±2.11               |
|   | EtOH     | <b>4.93±0.33</b>         |
| Hierba del sapo ( <i>eryngium comosum</i> Delar f.) | Agua     | 49.52±1.85               |
| $\alpha$ -tocoferol <sup>b</sup>                    |          | 13.67±0.45               |

## Determinación de peroxidación lipídica

Con el bioensayo de TBARS, se observan los cambios en la concentración de especies producto del proceso de la oxidación lipídica, evaluadas mediante el seguimiento de la formación de especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS). De los resultados mostrados en la **figura 5**, observamos que los diferentes extractos de plantas, presentan la capacidad para inhibir la formación de lipoperóxidos. En este caso, se utilizó la concentración de 1 ppm, para probar todos los extractos. La actividad antioxidante de los extractos se incrementó, teniendo un máximo de inhibición sobre el TBARS del 23-26% con los extractos de cuachalalate, tejocote y hierba del cáncer.

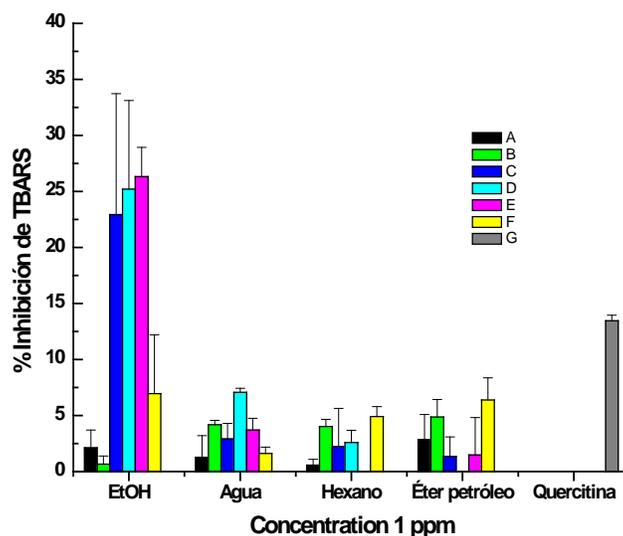


Figura 10. Porcentaje de inhibición del TBARS con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 1 ppm.

Los resultados de la concentración de 10 ppm, se muestran en la **figura**. Estos resultados nos indican nuevamente que los valores del porcentaje de inhibición del TBARS estan por

arriba del 50% para los extractos de cualalalate, tejocote y cancerina etanol, y tejocote agua, y los demás extractos probados no muestran una buena actividad sobre el TBARS.

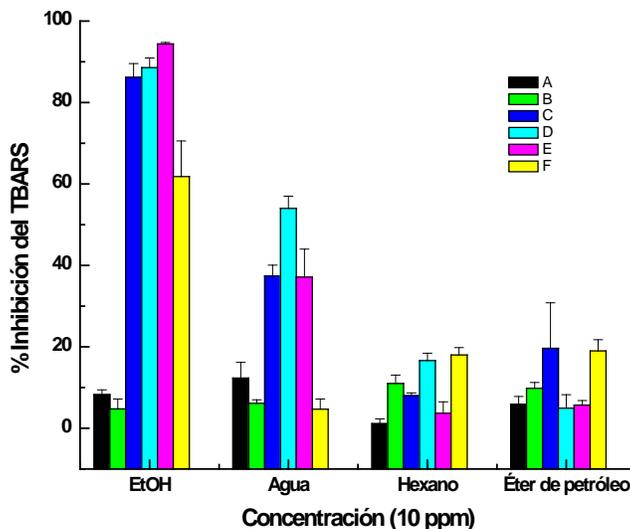


Figura 11. Porcentaje de inhibición del TBARS con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 10 ppm.

La figura 2, exhibe los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de plantas, observando un comportamiento muy parecido a los resultados obtenidos con el método de DPPH. Con este bioensayos en todo el experimento podemos ver una buena relación dosis-respuesta; es decir, con el aumento de concentración del extracto hay una inhibición del TBARS, respecto al control.

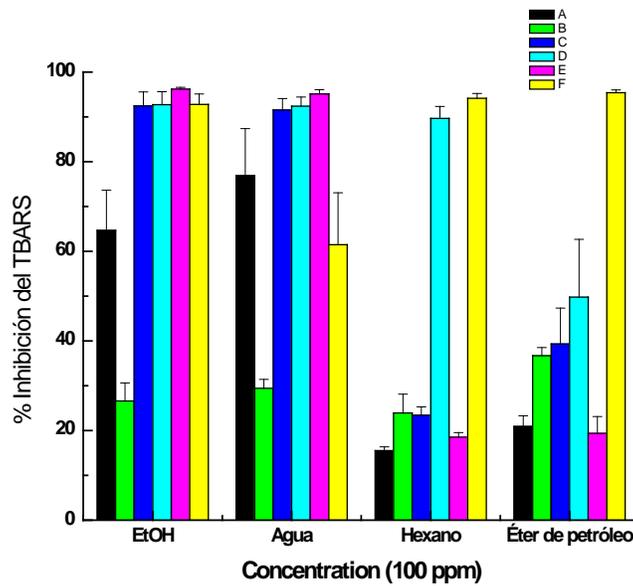


Figura 12. Porcentaje de inhibición del TBARS con extractos etanolicos, acuosos, hexanicos y con éter de petróleo de diferentes extractos en 100 ppm.

La figura 1b, muestra los valores de IC50, de los extractos etanolicos y los extractos acuosos. Observamos que los extractos etanolicos de Hierba del cáncer, Cuachalalate, Tejocote y Cancerina, fueron los que mostraron las mejores propiedades de capacidad antioxidante con valores de (IC50,  $4.63 \pm 0.25$ ,  $4.98 \pm 0.44$ ,  $5.12 \pm 0.04$  y  $11.15 \pm 1.04$  mg/ml) respectivamente. Sin embargo, los extractos acuosos de tejocote, hierba del cáncer y cuachalalate, exhibieron los siguientes valores de (IC50,  $11.44 \pm 0.77$ ,  $13.69 \pm 0.57$ ,  $17.70 \pm 0.44$  mg/ml), mostrando una capacidad antioxidante similar al control de referencia quercetina de (IC50,  $3.68 \pm 0.16$  µg/ml).

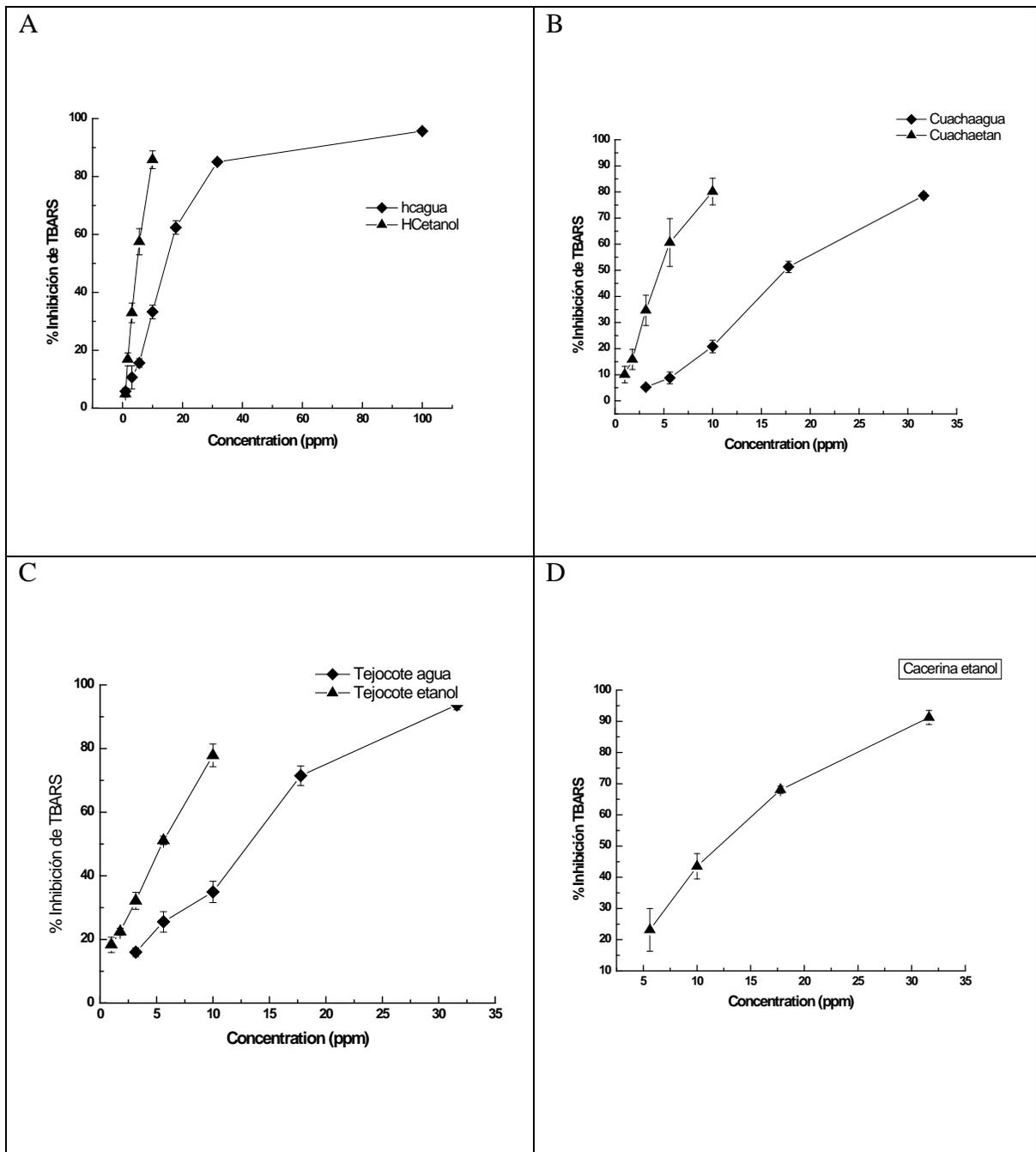


Figura 13. Curvas de los extractos etanolicos y acuosos de HC, cuachalalate, tejocote y cancerina.

Tabla 3. Valore de IC50 de extractos etanolicos y acuosos correspondientes al modelo de TBARS.

| Extractos           | (IC <sub>50</sub> µg/ml) |
|---------------------|--------------------------|
| Nombre de la planta |                          |

|  |             |                  |
|--|-------------|------------------|
| Tejocote ( <i>Crataegus gracilior</i> Phipps)        | Agua        | 11.44±0.77       |
|  | <b>EtOH</b> | <b>5.12±0.04</b> |
| Cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> )             | EtOH        | 11.15±1.04       |
| Hierba del cáncer ( <i>Cuphea aequipetala</i> Cav.)  | Agua        | 13.69±0.57       |
|  | <b>EtOH</b> | <b>4.63±0.25</b> |
| Cuachalalate ( <i>ADmphypteringium adstringens</i> ) | Agua        | 17.70±0.44       |
|  | <b>EtOH</b> | <b>4.98±0.44</b> |
| Quercitina   |             | 3.68±0.16        |

### Bioensayo de toxicidad aguda con *Artemia salina*

Dado que algunos productos naturales de plantas pueden ser perjudiciales para la salud en determinadas concentraciones (Oke & Aslim, 2010), en este ensayo fue necesario realizar un perfil preliminar de la toxicidad de cada extracto. El bioensayo con *Artemia salina* es considerada como una herramienta importante para la valoración preliminar de la toxicidad de los extractos de la plantas. Por lo tanto, nosotros realizamos este ensayo con 24 extractos de plantas evaluados mediante *Artemia salina*, con el fin de determinar su toxicidad. De acuerdo a los resultados de **la tabla 2**, se observa que únicamente seis de los veinticuatro extractos evaluados mostraron efecto tóxico contra las larvas, con valores de (IC50, 1.988422-2.972954), similares al del control positivo, lo que sugiere que no hay diferencias significativas de toxicidad entre los extractos apolares ensayados. Sin embargo, los extractos acuosos y etanolicos no presentaron actividad toxica contra la *Artemia Salina* en ninguna de las concentraciones probas. En base a estos resultados, observamos que los compuestos que presentaron excelente actividad antioxidante, no exhibieron toxicidad contra las larvas de *Artemia Salina*.

Table 4. Valores de IC50 de extractos de plantas de: *Hippocratea excelsa*, *Amphypteringium adstringens* *Justicia spicigera* Schult, *eryngium comosum* Delar f.) y *Eryngium comosum* Delar f.

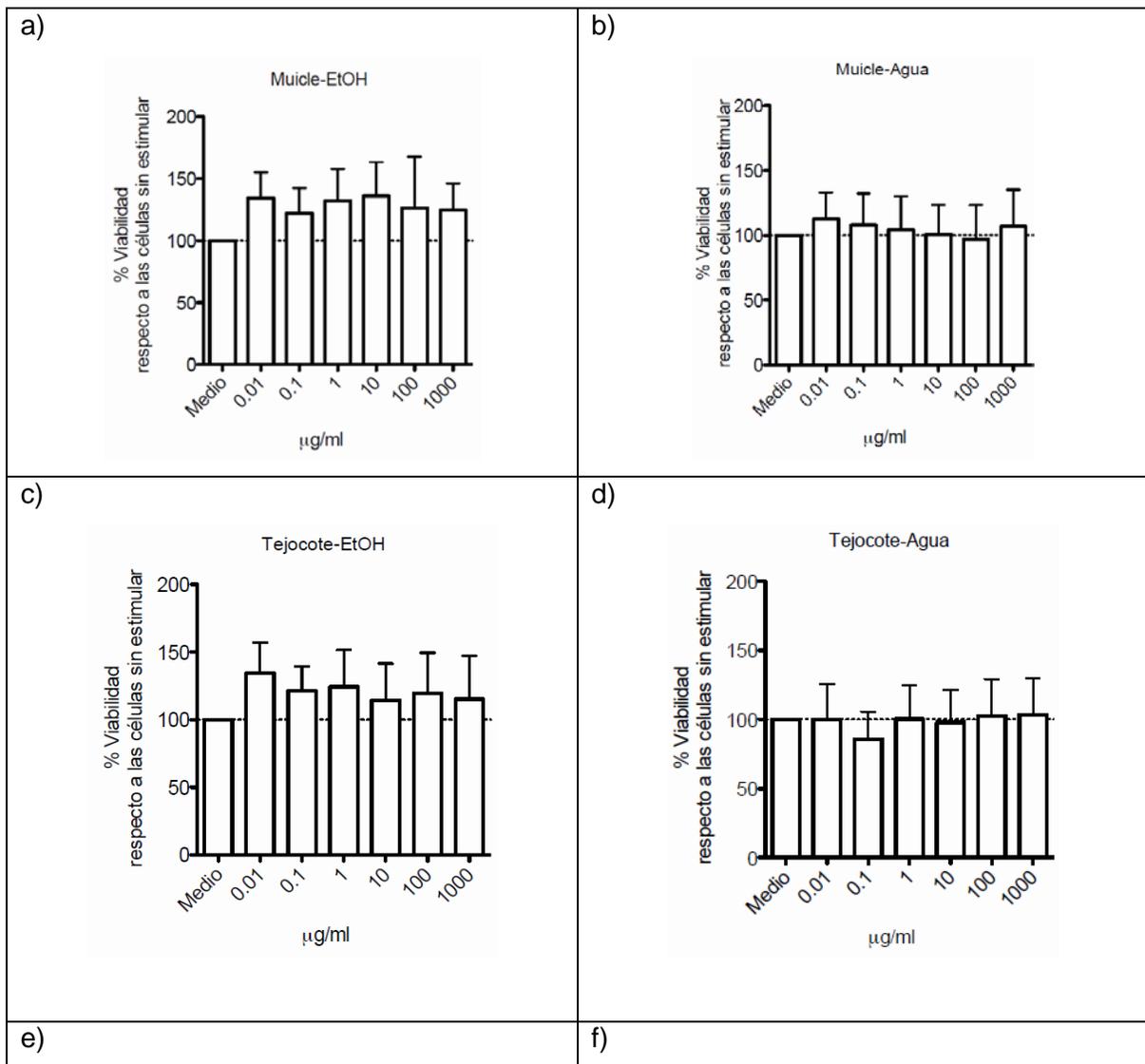
| Nombre de la planta                                 | Extractos     | IC50 (ppm) |
|---|---------------|------------|
| Cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> )            | Éter petróleo | 2.499427   |
|   | Hexano        | 1.988422   |
| Cuachalalate ( <i>Amphypteringium adstringens</i> ) | Éter petróleo | 1.998854   |
|   | Hexano        | 2.052486   |
| Muicle ( <i>Justicia spicigera</i> Schult)          | Water         | 2.972954   |
| Hierba del sapo ( <i>eryngium comosum</i> Delar f.) | Éter petróleo | 2.925074   |
| Kr2Cr2O7  |               | 2.038377   |

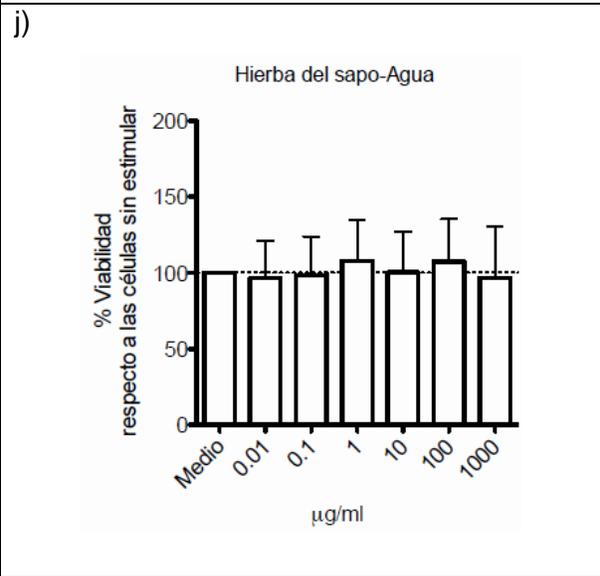
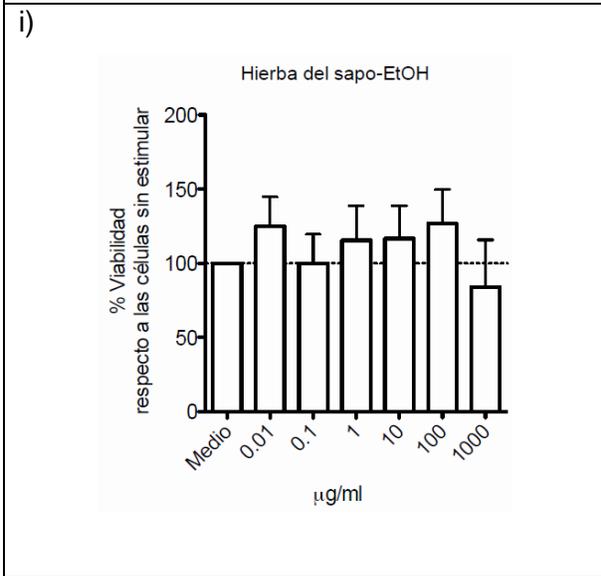
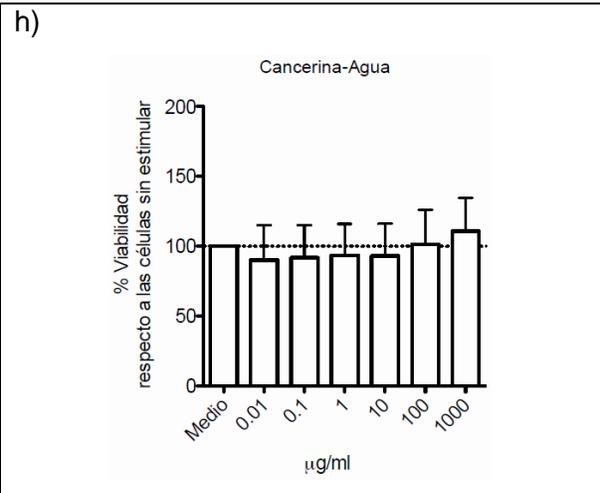
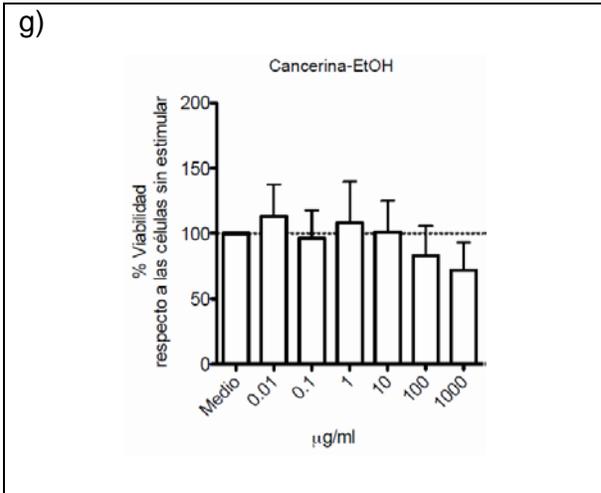
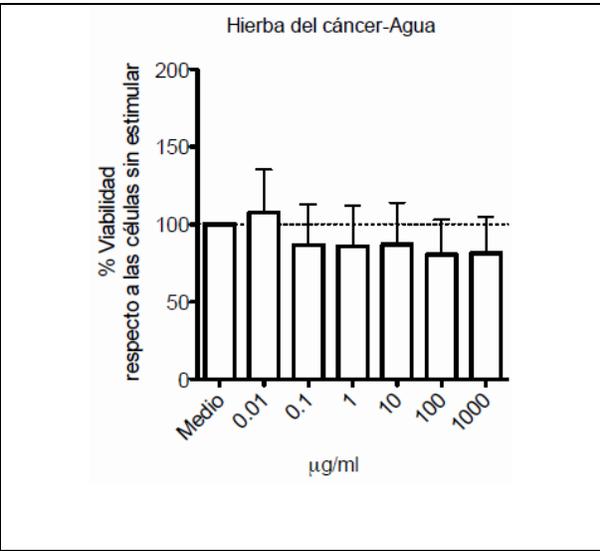
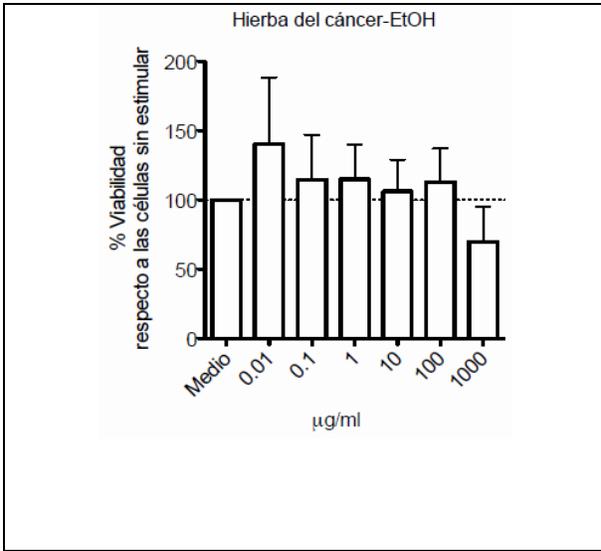
Means of three experiments  $\pm$  standard deviation.

### **Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas sobre células mononucleares de sangre periférica *in vitro*.**

En los resultados del estudio inmunomodulador sobre los efectos de extractos etanolicos y acuosos probados en células mononucleares de sangre periférica, se muestra que los extractos etanolicos de muicle, tejocote, hierba del cáncer y hierba del sapo inducen la proliferación de las células blancas de 24 horas de incubación, lo cual sugiere que estos extractos no son tóxicos para las células inmunológicas normales, por lo tanto se pueden considerar como potenciales moduladores del sistema inmune celular. Sien embargo los extractos de cancerina, hierba del sapo y cuachalalate, mostrarón toxicidad en la concentración de 1000 ppm, y hierba del cáncer en 100 y 1000ppm.

Por otro lado, al estimular las células mononucleares con los extractos acuosos de muicle, tejocote, hierba del cáncer y hierba del sapo, cáncarina y cuachalalate, estos no mostraron ninguna habilidad para la proliferación de las células mononucleares, pero tampoco se observó toxicidad alguna en las concentraciones probada, a excepción del extracto de hierba del cáncer agua que muestra toxicidad a partir de la concentración de 0.1 a 1000 ppm.





k)

l)

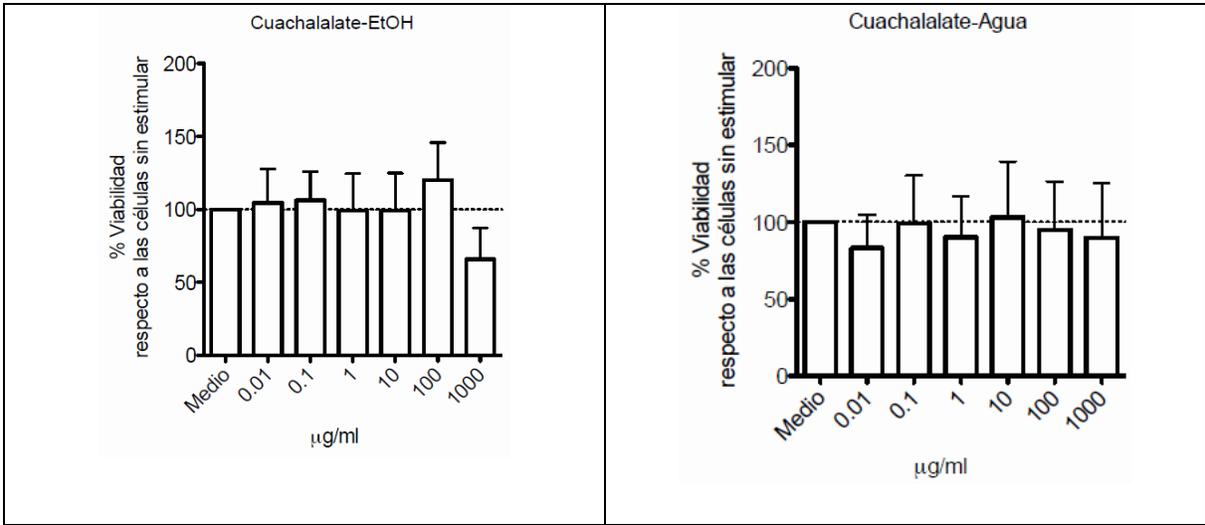


Figura 14. Efecto inmunomodulador de extractos etanolicos y acuosos sobre células mononucleares.

## **Conclusiones**

Los resultados revelan, que los extractos etanolicos y acuosos exhibieron la mejor actividad antioxidante, medida a través del contenido de fenoles totales, DPPH y TBARS con porcentajes mayores al 60 % de reducción del DPPH e Inhibición de TBARS. Por otro lado se corroboró que utilizando cualquiera de estas dos pruebas es posible obtener valores de actividad antioxidante similares. Los extractos que mostraron mayor actividad antioxidante pueden ser una alternativa en el uso de suplementos alimenticios

Con el bioensayo de *Artemia salina*, se comprobó que los extractos etanolicos y acuosos a excepción del muicle agua, no presentaron toxicidad en ninguna de las concentraciones probadas, concluimos que se debió a su actividad antioxidante.

En cuanto al estudio inmunomodulador sobre los efectos de extractos etanolicos y acuosos probados en células mononucleares de sangre periférica, concluimos que los extractos etanolicos tienen la capacidad de proliferación de las células blancas y los extractos acuosos no presentaron proliferación celular, sin embargo no son tóxicos en las concentraciones probadas, a excepción de la hierba del cáncer.

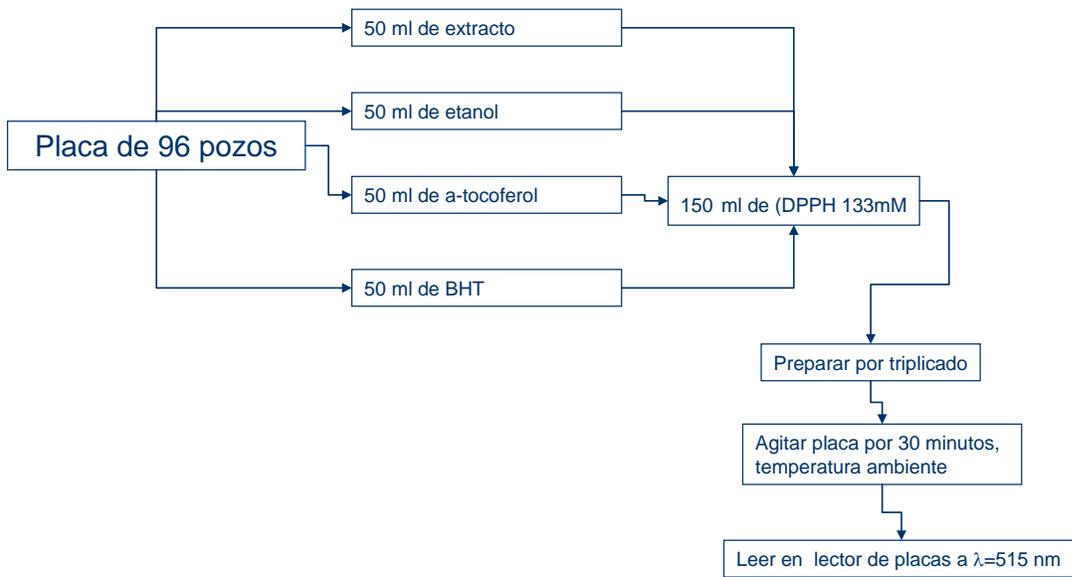
## BIBLIOGRAFIA

- Alanís AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J, Ceballos GM, 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 153-7.
- B.A. Cardenas-Sandoval ARLO-L, B.P. Martinez-Bonfil, K. Bermudez-Torres and G. Trejo-Tapia, 2012. Advances in the phytochemistry of *Cuphea aequipetala*, c. *Aequipetala* var. *Hispidula* and c. *Lanceolata*: extraction and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 101 - 13.
- Basma AA, Zakaria Z, Latha LY, Sasidharan S, 2011. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4, 386-90.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.
- Bugno A, Almodovar AaB, Pereira TC, Pinto TDJA, Sabino M, 2006. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 47-51.
- Caceres-Castillo D, Mena-Rejon GJ, Cedillo-Rivera R, Quijano L, 2008. 21beta-Hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry* 69, 1057-64.
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, et al., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 402-5.
- Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, et al., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 334-42.
- Dominguez M, Nieto A, Marin JC, Keck A-S, Jeffery E, Cespedes CL, 2005. Antioxidant Activities of Extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae)†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5889-95.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.
- Mena-Rejón GJ, Pérez-Espadas AR, Moo-Puc RE, et al., 2007. Antigiardial Activity of Triterpenoids from Root Bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products* 70, 863-5.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351-8.
- Oke F, Aslim B, 2010. Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1728-33.
- Perez RM, Perez S, Zavala MA, Salazar M, 1995. Anti-inflammatory activity of the bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Ethnopharmacology* 47, 85-90.
- Reyes-Chilpa R, Jiménez-Estrada M, Cristóbal-Telésforo E, et al., 2003. Natural Insecticides from *Hippocratea Excelsa* and *Hippocratea Celastroides*. *Economic Botany* 57, 54-64.
- Rossato JI, Ketzer LA, Centurião FB, et al., 2002. Antioxidant Properties of New Chalcogenides Against Lipid Peroxidation in Rat Brain. *Neurochemical Research* 27, 297-303.
- Ruiz-Bustos E, Velazquez C, Garibay-Escobar A, et al., 2009. Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *J Med Food* 12, 1398-402.
- Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, De Buschiazzo PM, Ríos JL, 2002. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences* 70, 1023-33.
- Sepúlveda Jiménez G, 2013. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND FLAVONOIDS FROM *JUSTICIA SPICIGERA*.
- Singleton, C.L., and Rossi, K.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-153.
- Sre PRR, Sheila T, Murugesan K, 2012. Phytochemical screening and “in-vitro” anti-oxidant activity of methanolic root extract of *Erythrina indica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, S1696-S700.

- Vega-Avila E Fau - Espejo-Serna A, Espejo-Serna a Fau - Alarcon-Aguilar F, Alarcon-Aguilar F Fau - Velasco-Lezama R, Velasco-Lezama R, 2009. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proc.West. Pharmacol. Soc.* 52, 78-82.
- Wangensteen H, Samuelsen AB, Malterud KE, 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chemistry* 88, 293-7.
- Waterhouse AL, 2002. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry.*
- Zhang Y, Li X, Wang Z, 2010. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2656-62.
- Huan-Bin Li, Ka-Wing Cheng. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected micralgae. *Food Chemistry* 102, 771-776
- CONABIO. 1998. *Diversidad Biológica de México: estudio de país* Comisión Nacional para el conocimiento y el Uso de la Biodiversidad. México, D. F.
- Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México.* Escuela de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional Editorial Limusa, México D. F.
- <http://www.authorstream.com/Presentation/Sharminmahbub-1764667-presentation-phytochemical-analysis-biological-evaluation-ocim/>
- Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms

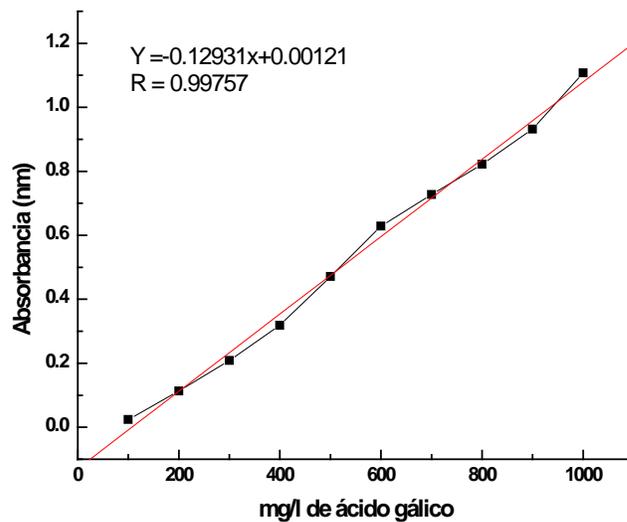
## ANEXO

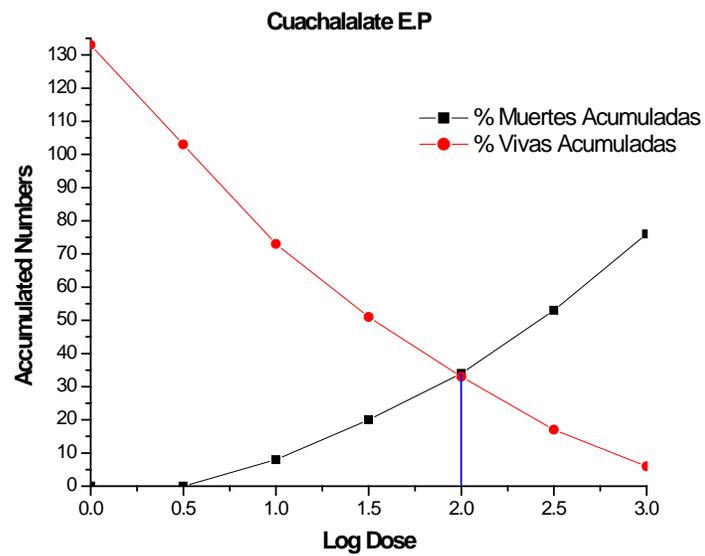
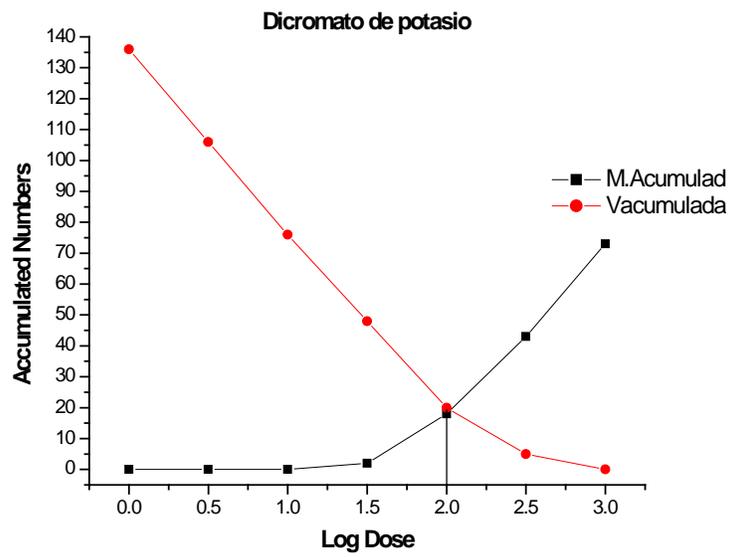


Esquema del método de DPPH•

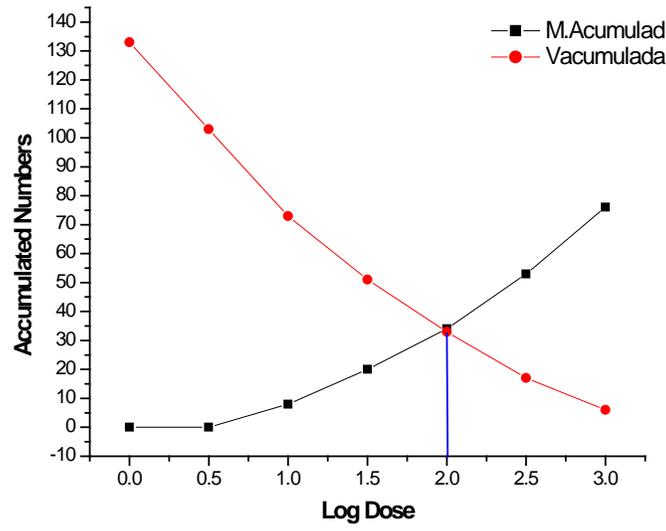
$$Y = -0.12931X + 0.00121, R = 0.99757$$

Curva de Calibración de ácido gálico

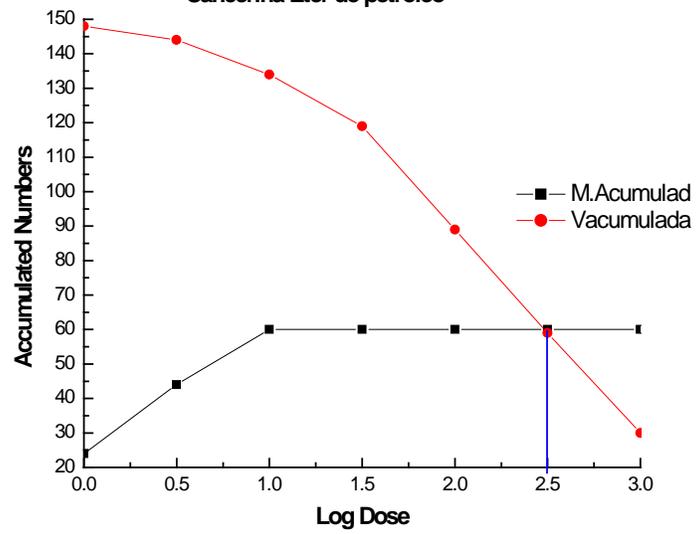


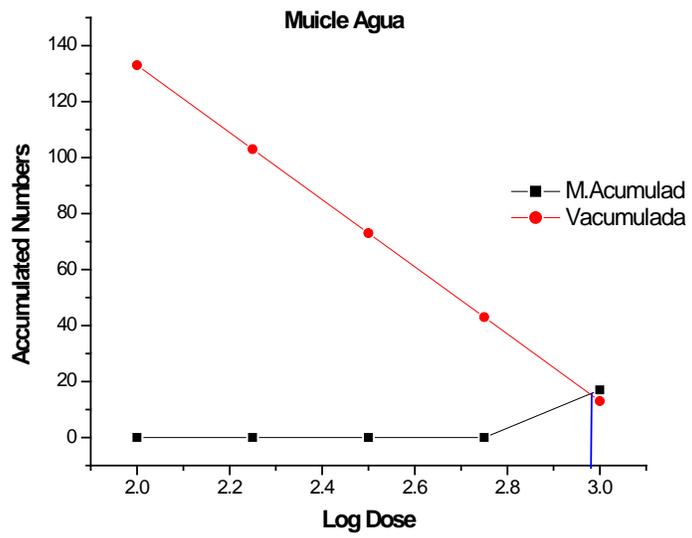
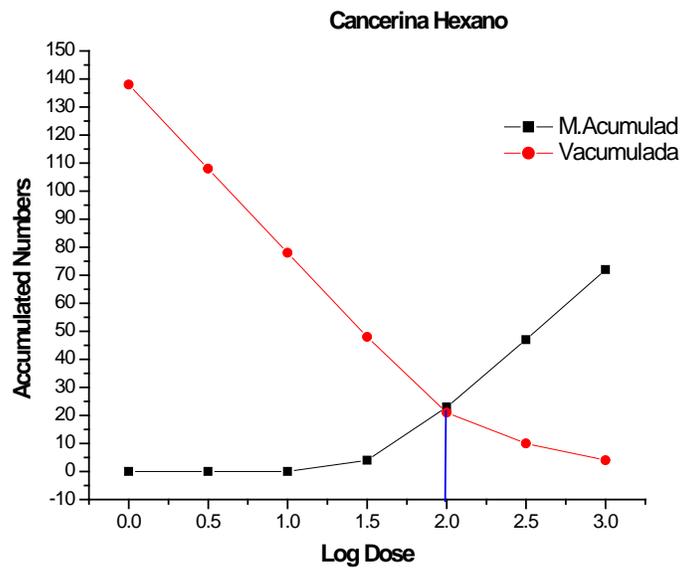


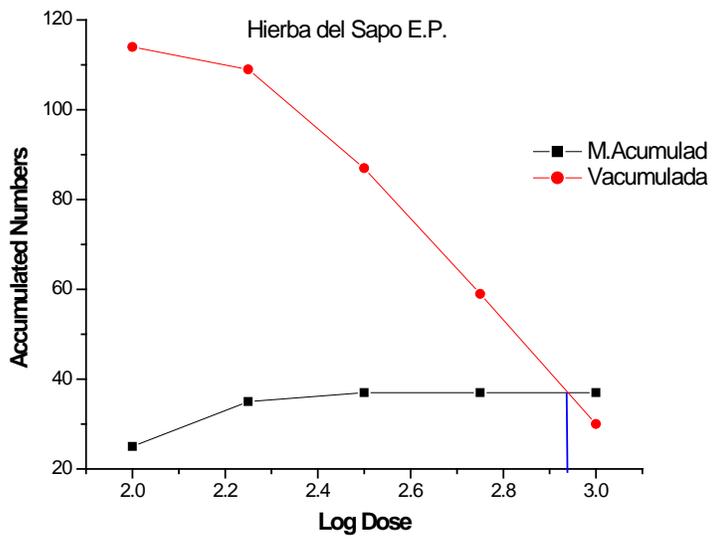
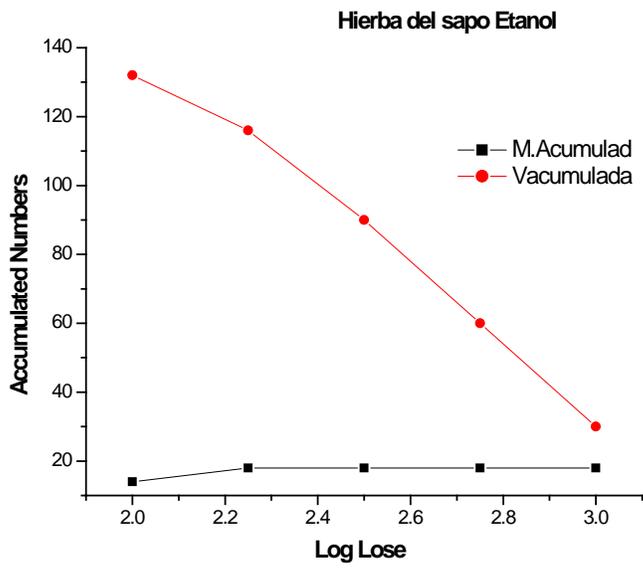
### Cuachalalate Hexano



### Cancerina Éter de petróleo







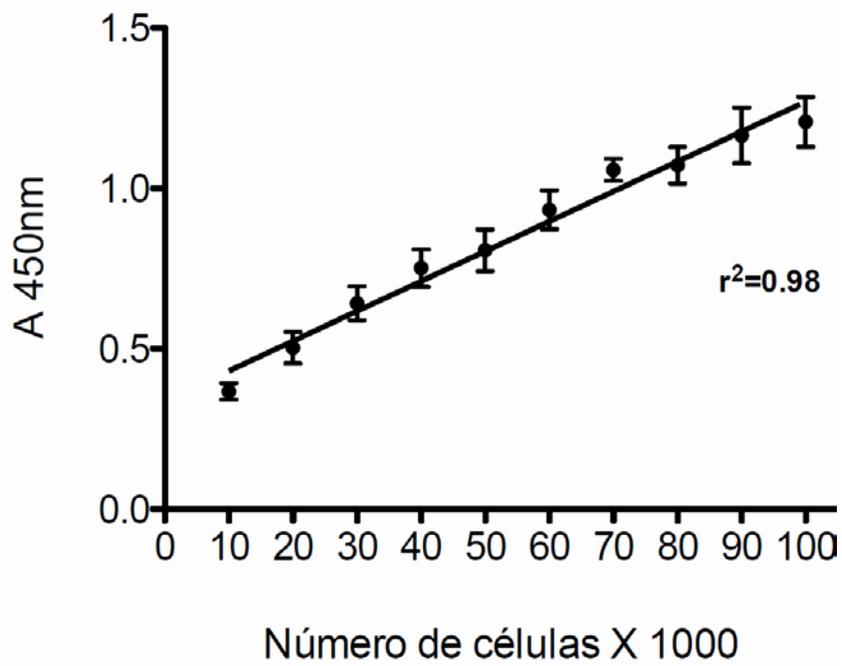


Figura . Curva de calibración celular.